

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ROSANA MACHADO DA MOTA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS BACTÉRIAS PROMOTORAS
DO CRESCIMENTO VEGETAL E BIORREMEDIADORAS DE PETRÓLEO**

PONTA GROSSA

2025

ROSANA MACHADO DA MOTA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS BACTÉRIAS PROMOTORAS
DO CRESCIMENTO VEGETAL E BIORREMEDIADORAS DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, curso de Mestrado da Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Área de Concentração: Ciência do Solo e Recursos Ambientais. Linha de Pesquisa: Uso e manejo dos recursos naturais.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Carolina Weigert Galvão.

Coorientador(a): Prof^a. Dr^a Jesiane Stefania da Silva Batista

PONTA GROSSA

2025

M917 Mota, Rosana Machado da
Seleção e caracterização de potenciais bactérias promotoras do crescimento vegetal e biorremediadoras de petróleo / Rosana Machado da Mota. Ponta Grossa, 2025.
104 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Ciência do Solo e Recursos Ambientais), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão.
Coorientadora: Profa. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista.

1. Biorremediação. 2. Hidrocarbonetos - petróleo. 3. Fitorremediação. 4. Nodulação. 5. Fixação biológica - nitrogênio. I. Galvão, Carolina Weigert. II. Batista, Jesiane Stefania da Silva. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciência do Solo e Recursos Ambientais. IV.T.

CDD: 630



ROSANA MACHADO DA MOTA

**“SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL E BIORREMEIADORAS DE PETRÓLEO”.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Área de Ciência do Solo e
Recursos Ambientais.

Ponta Grossa, 26 de março de 2025.



Documento assinado digitalmente

CAROLINA WEIGERT GALVAO

Data: 16/05/2025 18:29:34-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão
Doutor em Ciências
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Documento assinado digitalmente

NELSON LUIZ COSMO

Data: 17/05/2025 13:21:10-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Nelson Luis Cosmo
Doutor em Engenharia Florestal
Universidade Federal do Paraná



Documento assinado digitalmente

SALOME URREA VALENCIA

Data: 19/05/2025 07:52:35-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Salomé Urrea Valencia
Doutor em Agronomia
3M Experimentação Agrícola

Dedico aos meus pais, irmã, familiares, amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, que me deu força nos momentos de dificuldade, alegria quando a tristeza tomava conta, paciência nos momentos de ansiedade e foi o motivo para eu continuar acreditando que tudo era possível e que, no final, tudo daria certo.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Isaias e Cristiane, e à minha irmã Heloisa, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiaram incondicionalmente durante esse período, incentivaram e acreditaram em mim. Se hoje estou aqui, é por vocês, que me deram o suporte necessário para realizar meus sonhos e atingir meus objetivos.

Agradeço também às minhas avós, Eliane e Alzira, que sempre estiveram próximas e me deram todo o carinho de que precisava.

Um agradecimento muito especial aos meus orientadores, Carolina e Rafael, que me receberam e acolheram no laboratório com muito carinho. Mesmo sem me conhecer, me deram a chance de mostrar meu trabalho, minhas contribuições, minha paixão pela pesquisa e pela microbiologia. Durante esse período, foram incrivelmente presentes e pacientes, me aconselharam, ensinaram, incentivaram e inspiraram em nossas muitas reuniões e conversas.

Agradeço à minha coorientadora, Prof^a Dr^a Jesiane, que por três anos foi minha orientadora e seguiu fazendo parte da minha trajetória acadêmica, sempre me aconselhando e ensinando. Também deixo meus agradecimentos à equipe do Laboratório de Biodiversidade.

Ao grupo LABMOM, digo e repito: vocês são incríveis! Só tenho a agradecer pelas amizades que construí nesses dois anos, pelos momentos que passamos juntos, por todo apoio, ajuda e risadas. Vocês são muito especiais, e com certeza há um pedacinho de cada um de vocês neste trabalho. Às minhas coorientadas e amigas Isabele, Sayuri e Nicolý; aos meus amigos Eduarda, Angelo, Breno, Pedro, Lethicia, Kauane, Henzo, Hely, Calistene, Carol, Paulo, Maria, Mey, Rafa e Cris, que ajudaram desde a simples autoclavação de material e preparo de meio até os sábados de sol na casa de vegetação, as madrugadas de avaliação no laboratório e as coletas de solo, meu muito obrigado.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa, aos docentes, coordenadores, administradores e demais servidores.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária por tornarem este trabalho possível.

RESUMO

MOTA, R. M. **Seleção e Caracterização de Potenciais Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal e Biorremediadoras de Petróleo**. Orientador(a): Carolina Weigert Galvão. Ponta Grossa, 2025. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2025.

O solo é essencial para a sustentação da vida e funções ecossistêmicas, porém a contaminação por hidrocarbonetos, devido à má gestão ambiental e à atividade petrolífera, compromete sua qualidade. Estratégias de remediação, como a fitorremediação associada à biorremediação, têm sido adotadas para mitigar esses impactos. Este estudo teve como objetivo selecionar bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e biorremediadoras de petróleo. Foram caracterizados 36 isolados de *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli*, provenientes de áreas contaminadas, quanto à capacidade de alteração do pH do meio, classificação de Gram, capacidade degradadora de petróleo e promoção de crescimento vegetal em *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*. No estudo, as estirpes identificadas taxonomicamente como *Paraburkholderia* sp. P4N5, P6N10, P15N4 e P27N4 promoveram maior nodulação em *V. unguiculata*, enquanto *Paraburkholderia* sp. P12N7, P27N6, P15N4 e *Bacillus* sp. P7N5 se destacaram em *P. vulgaris*. Essas bactérias, incluem microrganismos acidificantes e alcalinizantes, Gram-positivas e Gram-negativas, com capacidade de tolerar e degradar petróleo em testes *in vitro*. Esses isolados foram também testados em casa de vegetação em solos sem e com 0,3% de petróleo para avaliar promoção de crescimento vegetal nas espécies vegetais e capacidade degradadora das estirpes. Em *P. vulgaris* sem petróleo, não houve diferença significativa nos parâmetros biométricos, mas a nodulação foi reduzida na ausência de inoculação e presença de nitrogênio mineral. Em *V. unguiculata*, *Paraburkholderia* sp. P27N4 destacou-se na formação de nódulos. Entretanto, no solo contaminado, *Paraburkholderia* sp. P15N4 favoreceu o volume radicular de *P. vulgaris*, enquanto *Paraburkholderia* sp. P12N7 promoveu maior nodulação. A degradação de hidrocarbonetos foi confirmada por cromatografia gasosa-espectrometria de massas, sendo *Paraburkholderia* sp. P15N4, P27N6 e *Rhizobium tropici* as mais eficientes. Além disso, *Paraburkholderia* sp. P12N7, P27N4, P27N6 e *Bacillus* sp. P7N5 produziram ácido indol-3-acético *in vitro*, e as duas últimas solubilizaram fosfato. Os resultados evidenciam a capacidade dessas estirpes em promover o crescimento vegetal, formar nódulos radiculares e degradar hidrocarbonetos, destacando seu potencial para aplicação em estratégias de biorremediação.

Palavras-chave: Biorremediação; hidrocarbonetos do petróleo; fitorremediação; nodulação; fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRAT

MOTA, R. M. **Selection and Characterization of Potential Plant Growth-Promoting and Petroleum Bioremediation Bacteria**. Advisor: Carolina Weigert Galvão. Ponta Grossa, 2025. Dissertation (Master in Agronomy) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2025.

Soil is essential for sustaining life and ecosystem functions; however, contamination by hydrocarbons, due to poor environmental management and petroleum activities, compromises its quality. Remediation strategies, such as phytoremediation associated with bioremediation, have been adopted to mitigate these impacts. This study aimed to select plant growth-promoting (PGP) and petroleum-bioremediating bacteria. A total of 36 isolates from *Mimosa oblonga* and *Erythrina crista-galli*, obtained from contaminated areas, were characterized based on their ability to alter the pH of the medium, Gram classification, petroleum degradation capacity, and plant growth promotion in *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris*. In this study, strains taxonomically identified as *Paraburkholderia* sp. P4N5, P6N10, P15N4, and P27N4 promoted greater nodulation in *V. unguiculata*, whereas *Paraburkholderia* sp. P12N7, P27N6, P15N4, and *Bacillus* sp. P7N5 stood out in *P. vulgaris*. These bacteria include acidifying and alkalizing microorganisms, both Gram-positive and Gram-negative, capable of tolerating and degrading petroleum in *in vitro* tests. These isolates were also tested in greenhouse conditions in soils without and with 0.5% petroleum to evaluate plant growth promotion in both species and the degradation capacity of the strains. In *P. vulgaris* grown in non-contaminated soil, no significant differences were observed in biometric parameters; however, nodulation was reduced in the absence of inoculation and the presence of mineral nitrogen. In *V. unguiculata*, *Paraburkholderia* sp. P27N4 was prominent in nodule formation. However, in contaminated soil, *Paraburkholderia* sp. P15N4 enhanced root volume in *P. vulgaris*, whereas *Paraburkholderia* sp. P12N7 promoted greater nodulation. Hydrocarbon degradation was confirmed by gas chromatography-mass spectrometry, with *Paraburkholderia* sp. P15N4, P27N6, and *Rhizobium tropici* being the most efficient. Additionally, *Paraburkholderia* sp. P12N7, P27N4, P27N6, and *Bacillus* sp. P7N5 produced indole-3-acetic acid *in vitro*, with the latter two also solubilizing phosphate. The results highlight the ability of these strains to establish symbiosis, promote plant growth, and degrade hydrocarbons, underscoring their potential for application in bioremediation strategies.

Keywords: Bioremediation; petroleum hydrocarbons; phytoremediation; nodulation; biological nitrogen fixation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Processo de colonização e formação de nódulos radiculares em resposta da simbiose entre planta-bactéria.....	25
FIGURA 2	- Modelo digital indicando os valores de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) nos diferentes grupamentos sobre a Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), Araucária, PR.	32
FIGURA 3	- (A) Esquema da montagem dos tubos de cultivo de feijão comum e feijão-caupi em câmara de cultura de tecido. (B) Inoculação das sementes nos tubos de ensaio. (C) Cultivo de feijão em câmara de cultura de tecido. ...	37
FIGURA 4	- Formação e número de nódulos nas espécies <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Vigna unguiculata</i> inoculadas com estirpes bacterianas isoladas de nódulos das espécies <i>Mimosa oblonga</i> e <i>Erythrina crista-galli</i> na área contaminada por petróleo da REPAR.	49
FIGURA 5	- Formação de nódulos radiculares em (A) <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculado com a estirpe P27N6 e (B) <i>Vigna unguiculata</i> inoculado com a estirpe P27N4.	50
FIGURA 6	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Bacillus</i> sp. P7N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P12N7, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N6 no (A) comprimento da raiz (MFR), (B) número de nódulos, (C) massa fresca de nódulos (MFN) e (D) massa seca de nódulos (MSN) de plantas da espécie <i>Vigna unguiculata</i>	62
FIGURA 7	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Bacillus</i> sp. P7N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P12N7, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N6 na massa fresca de nódulos (MFN) de plantas da espécie <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	66
FIGURA 8	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Bacillus</i> sp. P7N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P12N7, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N6 na massa seca de nódulos (MSN) de plantas da espécie <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	67
FIGURA 9	- Taxa de degradação e recuperação do petróleo no solo após remediação mediada pelas estirpes <i>Bacillus</i> sp. P7N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P12N7,	

	<i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N6 inoculadas na espécie <i>Phaseolus vulgaris</i>	69
FIGURA 10	- Extensão da biodegradação de hidrocarbonetos no solo após inoculação das estirpes <i>Bacillus</i> sp. P7N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P12N7, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N6 na espécie <i>Phaseolus vulgaris</i> ..	70
FIGURA 11	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Paraburkholderia</i> sp. P4N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P6N10, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N4 na massa fresca da parte aérea (MFPA) de plantas da espécie <i>Vigna unguiculata</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	72
FIGURA 12	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Paraburkholderia</i> sp. P4N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P6N10, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N4 no comprimento da parte aérea (CPA) de plantas da espécie <i>Vigna unguiculata</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	73
FIGURA 13	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Paraburkholderia</i> sp. P4N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P6N10, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N4 na massa fresca da raiz (MFR) de plantas da espécie <i>Vigna unguiculata</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	74
FIGURA 14	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Paraburkholderia</i> sp. P4N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P6N10, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N4 na massa seca da raiz (MSR) de plantas da espécie <i>Vigna unguiculata</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	75
FIGURA 15	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Paraburkholderia</i> sp. P4N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P6N10, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N4 no comprimento da raiz (CR) de plantas da espécie <i>Vigna unguiculata</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	75
FIGURA 16	- Taxa de degradação e recuperação do petróleo no solo após remediação das estirpes <i>Paraburkholderia</i> sp. P4N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P6N10,	

Paraburkholderia sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 inoculadas em
Vigna unguiculata 78

FIGURA 17 - Extensão da biodegradação de hidrocarbonetos no solo após inoculação das
 estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10,
Paraburkholderia sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 na espécie
Vigna unguiculata 79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Relação de reagentes do meio <i>Yeast Mannitol</i> (YM), conforme concentrações indicadas pela Instrução normativa DAS/MAPA nº 13, de 24 de março de 2011 34
TABELA 2	- Relação de reagentes do meio Bushnell e Haas (BH)..... 35
TABELA 3	- Relação de reagentes do meio NBRIP 40
TABELA 4	- Análise química do solo e substrato (solo+areia) após correção da calagem do experimento em casa de vegetação 41
TABELA 5	- Identificação e características dos isolados de <i>Mimosa oblonga</i> e <i>Erythrina crista-galli</i> L. coletados na propriedade da Refinaria Presidente Getúlio Vargas- REPAR, recuperados do estoque microbiológico do LABMOM/UEPG 48
TABELA 6	- Número de nódulos radiculares nas espécies <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Vigna unguiculata</i> inoculadas com 36 estirpes bacterianas isoladas de nódulos das espécies <i>Mimosa oblonga</i> e <i>Erythrina crista-galli</i> na área contaminada por petróleo da REPAR. 52
TABELA 7	- Identificação dos isolados com base na comparação de sequência de 16 rRNA obtida com dados depositadas no banco de dados GenBank (análise BLASTn)..... 53
TABELA 8	- Avaliação in vitro das atividades promotoras do crescimento vegetal dos isolados bacterianos dos nódulos de <i>Mimosa oblonga</i> da área contaminada por petróleo na REPAR, testados quanto a capacidade de produção de ácido indól-3-acético (AIA) e solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de fosfato de cálcio 56
TABELA 9	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Bacillus</i> sp. P7N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P12N7, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N6 no número de nódulos, massa fresca de nódulos (MFN) e massa seca de nódulos (MSN) de plantas da espécie <i>Phaseolus vulgaris</i> 58
TABELA 10	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Bacillus</i> sp. P7N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P12N7, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N6 na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da raiz (MSR), comprimento da

	parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR) e volume da raiz (VR) de plantas da espécie <i>Phaseolus vulgaris</i>	59
TABELA 11	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Paraburkholderia</i> sp. P4N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P6N10, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N4 na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA) e volume da raiz (VR) de plantas da espécie <i>Vigna unguiculata</i>	63
TABELA 12	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Bacillus</i> sp. P7N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P12N7, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N6 na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), volume da raiz (VR) e número de nódulos de plantas da espécie <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	65
TABELA 13	- Efeito da inoculação das estirpes <i>Paraburkholderia</i> sp. P4N5, <i>Paraburkholderia</i> sp. P6N10, <i>Paraburkholderia</i> sp. P15N4 e <i>Paraburkholderia</i> sp. P27N4 na massa seca da parte aérea (MSPA) e volume da raiz (VR), número de nódulos, massa fresca de nódulos (MFN) e massa seca de nódulos (MSN) de plantas da espécie <i>Vigna unguiculata</i> cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.....	71

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
AIA	Ácido Indol-3-Acéticos
ATM	Atmosfera
BH	Bushnell e Haas
BPCV	Bactéria Promotoras Do Crescimento Vegetal
(GC-MS)	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
D.O.	Densidade Ótica
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
MFPA	Massa Fresca da Parte Aérea
MFR	Massa Fresca da Raiz
MSN	Massa Seca dos Nódulos
MSPA	Massa Seca da Parte
MSR	Massa Seca da Raiz
NN	Número de Nódulos
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
REPAR	Refinaria Presidente Getúlio Vargas
RPM	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
TPH	Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
YM	<i>Yeast Mannitol</i>
YMA	<i>Yeast Mannitol Agar</i>
μ	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PETRÓLEO	17
2.1.1	Contaminação de Solo Por Hidrocarbonetos Derivados do Petróleo.....	18
2.2	REMEDIÇÃO	19
2.2.1	Biorremediação	20
2.2.2	Fitorremediação.....	22
2.3	BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL.....	23
2.3.1	Mecanismos Bacterianos Para Promoção do Crescimento Vegetal.....	24
2.3.1.1	Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	24
2.3.1.2	Síntese de ácido indol-3-acético (AIA).....	26
2.3.1.3	Solubilização de fosfato (P)	27
2.4	FEIJÃO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	28
2.5	FEIJÃO-CAUPI (<i>Vigna unguiculata</i>)	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	BPCV	32
4.2	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PUREZA DOS ISOLADOS.....	33
4.2.1	Teste de Alteração do pH do Meio de Cultura.....	33
4.2.2	Coloração de Gram.....	34
4.2.3	Crescimento Bacteriano, Tolerância e Degradação de Hidrocarbonetos do Petróleo em Meio de Cultura Líquido	34
4.3	CULTIVO E PREPARAÇÃO DOS INOCULANTES BACTERIANOS	35
4.4	SELEÇÃO DE BACTÉRIAS CAPAZES DE NODULAR FEIJÃO	35
4.4.1	Plantas	35
4.4.2	Inoculação	35
4.5	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	37
4.5.1	PCR e Amplificação do Gene 16S rRNA	37
4.5.2	Sequenciamento Parcial do Gene 16S rRNA e Análise das Sequências.....	38

4.6	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS	39
4.6.1	Produção de Ácido Indol-3-acético (AIA)	39
4.6.2	Solubilização de Fosfato	39
4.6.2.1	Solubilização de fosfato em meio sólido.....	39
4.6.2.2	Solubilização de fosfato em meio líquido	40
4.7	AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS INOCULADOS EM FEIJÃO	41
4.7.1	Capacidade de Promover o Crescimento Vegetal em Casa de Vegetação.....	41
4.7.2	Capacidade de Tolerar e Degradar Petróleo em Casa de Vegetação	42
4.7.2.1	Determinação da degradação dos TPH no solo pela técnica de Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	43
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE FABACEA PRESENTES EM ÁREA DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO.....	45
5.1.2	Capacidade de Alterar o pH do Meio de Cultura e Coloração.....	45
5.1.3	Capacidade de Tolerância e Degradação de Hidrocarbonetos do Petróleo.....	46
5.2	POTENCIAL DE NODULAÇÃO EM FEIJÃO COMUM E FEIJÃO-CAUPI NA AUSÊNCIA DE PETRÓLEO E EM CONDIÇÕES CONTROLADAS	49
5.3	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA PELO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA	53
5.4	CAPACIDADE DE PRODUZIR AIA E SOLUBILIZAR FOSFATO	54
5.5	AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS INOCULADOS EM FEIJÃO	57
5.5.1	Capacidade de Promoção de Crescimento Vegetal na Ausência de Petróleo em Casa de Vegetação.....	57
5.5.1.1	Feijão comum (<i>P. vulgaris</i>)	57
5.5.1.2	Feijão-caupi (<i>V. unguiculata</i>)	59
5.5.2	Capacidade dos Isolados Inoculados em Casa de Vegetação em Tolerar e Degradar Hidrocarbonetos do Petróleo	63
5.5.2.1	Feijão comum (<i>P. vulgaris</i>)	63
5.5.2.2	Feijão-caupi (<i>V. unguiculata</i>)	70
6	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

O solo desempenha função vital na sustentação da vida, estabelecendo diversas funções ecossistêmicas (Baude; Meyer; Schindewolf, 2019). Atualmente, a má gestão dos recursos naturais tem causado impactos negativos na qualidade do solo, principalmente se tratando de poluentes orgânicos persistentes (Borrelli *et al.*, 2017). O rápido crescimento da indústria do petróleo tem causado sérios danos ambientais (Chen *et al.*, 2019), especialmente na superfície do solo (Stepanova *et al.*, 2022). Os poluentes comumente encontrados em contaminação por petróleo são os hidrocarbonetos, que se espalham amplamente, se aderindo às partículas do solo, afetando negativamente a saúde humana e a biodiversidade do solo, consequentemente alterando a diversidade microbiana, a função e os comportamentos ecológicos com suas propriedades tóxicas (Zhao *et al.*, 2022). Para auxiliar, estratégias de remediação desses contaminantes estão sendo adotadas, das quais se destacam as biológicas, por suas características ecológicas e econômicas (Miri *et al.*, 2018).

A utilização simultânea de plantas e microrganismos vem apresentando resultados satisfatórios na remediação de compostos tóxicos do petróleo (Sarma; Nava; Prasad, 2019). Na fitorremediação, processo metabólico no qual se utilizam plantas como remediadoras, a degradação de poluentes pode ser realizada por diferentes mecanismos biológicos, incluindo a biodegradação, processo metabólico de degradação mediado por microrganismos (Polińska *et al.*, 2021). Neste mecanismo, as plantas sintetizam exsudatos radiculares que atuam como atrativos para os microrganismos do solo, incluindo as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que por sua vez aceleram o processo de remediação, utilizando os metabólitos produzidos pela planta e provindos dos poluentes do solo como fonte de energia, reduzindo o efeito tóxico do petróleo e fornecendo em troca nutrientes pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, além de, sintetizar fitormônios e toxinas que garantem proteção contra patógenos e estresse abiótico às plantas (Eze *et al.*, 2022). Nesse contexto, a prospecção de estirpes bacterianas com potencial biorremediador, especialmente em ambientes contaminados ou com histórico de exposição ao poluente, é uma estratégia promissora, pois esses microrganismos tendem a apresentar maior adaptação e eficiência na degradação (Liu *et al.*, 2016).

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp, comumente conhecido como feijão-caupi, tem mostrado resultados positivos em estudos relacionados à remoção de contaminantes tóxicos do petróleo no solo pelo processo de fitorremediação, bem como, pela interação com bactérias degradadoras do petróleo (Jidere; Akamigbo; Ugwuanyi, 2012; Jiao, *et al.*, 2019). A espécie

possui resistência aos hidrocarbonetos do petróleo, capacidade de acumulação de metal, produção de alto rendimento, além de sintetizar elevadas quantidades de exsudatos radiculares, tornando-o atrativo para os microrganismos no processo de degradação (Aliku; Madu; Aliku, 2021; Farouq *et al.*, 2022). Por sua vez, a espécie *Phaseolus vulgaris* L., conhecido como feijão comum, é uma leguminosa de grande importância alimentar no mundo, é comumente utilizada em trabalhos de isolamento de bactérias, em vista da sua elevada promiscuidade com microrganismos do solo que incluem as BPCV (Dall'agnol *et al.*, 2014; Shamseldin; Velázquez, 2020; Moura *et al.*, 2022; Moura *et al.*, 2023). As espécies apresentam interação com bactérias de diferentes gêneros, entre eles *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Paraburkholderia*, entre outros (Castro *et al.*, 2017; Marinho *et al.*, More *et al.*, 2021).

Sabendo dos mecanismos desempenhados pelas BPCV e da necessidade da seleção eficiente de bactérias biorremediadoras de petróleo, estirpes bacterianas isoladas de nódulos das espécies de leguminosas da família Fabaceae, *Mimosa oblonga* Benth. e *Erythrina crista-galli*, L., espécies nativas e típicas de áreas úmidas (Reis-Jr *et al.*, 2010; Mello *et al.*, 2019), presentes em áreas contaminadas por petróleo foram recentemente estudados quanto à sua tolerância ao petróleo (Araújo, 2021). O acidente que resultou na contaminação por petróleo bruto da área em estudo, se deu com a ruptura do oleoduto OSPAR, na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), Araucária, Paraná, em 16 de julho de 2000 (Melo *et al.*, 2003). Quanto às bactérias isoladas dos nódulos das espécies, pouco se sabe sobre suas habilidades simbióticas com outras leguminosas, ou suas capacidades promotoras de crescimento vegetal e degradadoras de petróleo.

Considerando os pontos positivos da utilização da espécie *V. unguiculata* como fitorremediadora de hidrocarbonetos associada a bactérias do solo e a elevada promiscuidade do *P. vulgaris* frequentemente utilizado em estudos de isolamento e identificação de bactérias, as estirpes isoladas das espécies vegetais nativas oriunda da área contaminada com petróleo, foram no presente estudo, inoculadas nas duas espécies de feijão. Diante do exposto, o estudo foi conduzido com base na hipótese de que as BPCV que nodulam *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* dos solos aluviais contaminados por petróleo na REPAR, são capazes também de nodular feijão-caupi e feijão comum, tolerar e/ou degradar petróleo, ainda, as BPCV que apresentam maior capacidade de sintetizar AIA e solubilizar fosfato *in vitro*, possam induzir a maior promoção do crescimento dos feijões em casa de vegetação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PETRÓLEO

O petróleo é um importante e vital recurso energético, precursor de matéria-prima para diversos produtos de processamentos industriais, químicos e de materiais cotidianos, como plásticos e medicamentos (Huba; Huba; Gardinali, 2016). Os componentes do petróleo bruto podem ser divididos em múltiplos compostos e subdivisões com base na composição do petróleo bruto, que normalmente conterá uma porcentagem de gases, líquidos e sólidos dissolvidos (Fakher *et al.*, 2020). Sendo assim, se trata de uma mistura complexa de componentes de hidrocarbonetos e não hidrocarbonetos, que incluem alcanos de cadeia curta, metano e etano, e outras, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, fenantreno e benzopireno, e ainda metais (Yang *et al.*, 2021). De modo geral, a composição química do petróleo bruto varia de acordo com as condições de sua formação nas diferentes partes do mundo, sendo assim, não é uma matéria prima homogênea e a sua caracterização molecular detalhada é um desafio, em vista da sua natureza inerentemente complexa, expressa por um enorme número de compostos (Shishkova *et al.*, 2022).

O crescimento populacional juntamente com a aceleração da industrialização resultaram em um significativo aumento na utilização de combustíveis fósseis, o que consequentemente, levou à um aumento considerável das emissões de diversos tipos de poluentes (Chandra *et al.*, 2013, Mishra *et al.*, 2022). Dentre esses poluentes, o petróleo se destaca devido à demanda crescente e excessiva por produtos petrolíferos e a ocorrência de derramamentos frequentes em todo o mundo (Wan; Chen, 2018). Isso tem gerado impactos negativos na vida de todos os ecossistemas, causando danos significativos aos organismos que habitam o solo e à saúde humana (Zhang *et al.*, 2021; Ghosal *et al.*, 2016). Acidentes com petróleo bruto, podem causar poluição da água potável, diminuição da qualidade da água e do ar, a fertilidade do solo, entre outros (Saeed *et al.*, 2021a).

Acidentes com derramamentos de petróleo ocorrem há anos e seguem ocorrendo em todo o mundo, normalmente no mar, poluindo as águas e comprometendo todo o ecossistema marítimo, resultantes das atividades humanas relacionadas à indústria de petróleo e gás (Galieriková; Materna, 2020; Alotaibi; Arnaud; Hijri, 2022). Os derramamentos em alto mar ocorrem sobretudo durante o transporte em navios-tanque de um país ao outro, pela ruptura de tubulações de extração do petróleo, nas plataformas, em portos e decorrentes de explosões, resultando no seu acúmulo na superfície do mar e nas encostas (Prabowo; Bae, 2019; Ishak *et*

al., 2019; Passow; Overton, 2021). No mar, o petróleo pode causar poluição oceânica generalizada, impactando negativamente o ambiente marinho, a vida marinha, a fotossíntese do fitoplâncton, a respiração de animais marinhos, peixes e mariscos, além de danificar ecossistemas costeiros, mangues e áreas de vida marinha, resultando em perda de biodiversidade e mortalidade em massa da vida marinha (CHEN *et al.*, 2019).

Além dos acidentes marítimos, acidentes em solo também são registrados (Liu; Wang; Liang, 2020; Adeniran; Oladunjoye; Doro, 2023). Normalmente ocorrem durante o processo de perfuração e extração, no armazenamento, em decorrência do rompimento e vazamento de oleodutos, durante o transporte em tanques, ou ainda, em poços abandonados que foram inadequadamente selados, durante o trabalho com máquinas e até descartes deliberados (Bonvicini; Antonioni; Cazzani, 2018; Auti *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2023; Lu; Xi; Qin, 2023). Podem ocorrer também, na agricultura, pela irrigação de áreas cultiváveis com água proveniente de locais contaminados com petróleo e não tratados (Jiao *et al.*, 2019).

Dos contaminantes ambientais derivados das atividades petrolíferas, os hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) são os que geram maior preocupação na maioria dos países em todo o mundo (Hussain *et al.*, 2019). Os TPH são contaminantes orgânicos constituídos por oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, além de, metais pesados como cromo (Cr), zinco (Zn), ferro (Fe) (Khan *et al.*, 2018; Qomariyah *et al.*, 2022). São ainda, compostos por hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, heterocíclicos e asfalteno (Wang *et al.*, 2015). Sua composição fracional é dividida em hidrocarbonetos leves e hidrocarbonetos pesados, sendo que, a fração mais tóxica são os compostos aromáticos, o qual possui ao menos um anel benzênico e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) compostos por anéis aromáticos múltiplos e fundidos (Meištininkas *et al.*, 2023).

2.1.1 Contaminação de Solo Por Hidrocarbonetos Derivados do Petróleo

O lançamento de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) é uma das principais razões para a contaminação dos recursos naturais nas áreas urbanas, semiurbanas e industrializadas ao redor do mundo (Campos *et al.*, 2019). Ao longo do último século, os biomas terrestres passaram por uma transformação significativa em decorrência do aumento da taxa de urbanização, atividades antropogênicas e dependência contínua de fontes de energia baseadas em petróleo, dando espaço a transformação de biomas urbanos (Auti *et al.*, 2019). Quando lançados no solo causam impactos ambientais significativos e representam um risco substancial para humanos e outras formas de vida, devido à sua persistência e natureza recalcitrante, são

duráveis e estáveis e, portanto, permanecem por muito tempo no meio ambiente e não são degradados facilmente (Ossai *et al.*, 2020).

No solo, o vazamento de hidrocarbonetos de petróleo tem o potencial de modificar toda sua estrutura ambiental natural, resultando em alterações tanto sutis quanto significativas na comunidade biótica presente (Galitskaya *et al.*, 2021). O petróleo, devido à sua riqueza em carbono e vestígios de compostos nitrogenados, pode modificar a composição e estrutura da matéria orgânica do solo, impactando na relação C/N, C/P, salinidade, pH e condutividade do solo (Wang *et al.*, 2013). Além disso, os hidrocarbonetos são hidrofóbicos, sendo assim, incapazes de solubilizar em água, sua densidade é baixa e viscosidade alta, o que atribui maior resistência à sua degradação (Farouq *et al.*, 2022). Devido às suas características, o petróleo é facilmente adsorvido na superfície do solo, afetando a permeabilidade e porosidade do mesmo, bloqueando os poros do solo e diminuindo a aeração do mesmo, resultando em impactos toxicológicos e ecológicos nas plantas e na condição natural do campo petrolífero (Saeed *et al.*, 2021a).

Levando-se em consideração todos os problemas causados pelo petróleo, é urgente estabelecer estratégias para mitigar as condições degradadas do meio ambiente (Okonofua; Lasisi; Atikpo, 2021; Rong *et al.*, 2021; Hassain *et al.*, 2022). Para tanto, diferentes tecnologias para remediação de hidrocarbonetos estão sendo estudadas, desenvolvidas e utilizadas a fim de minimizar os problemas decorrentes da contaminação do solo pelo petróleo (Miri *et al.*, 2018). No entanto, as restrições associadas aos métodos tradicionais empregados na redução de poluentes têm impellido os cientistas a investigar alternativas ecologicamente responsáveis e economicamente viáveis. A remediação inclui métodos físicos, químicos, térmicos e métodos biológicos que se destacam por seus processos pouco invasivos, mais ecológicos e econômicos (Meištinkas *et al.*, 2023).

2.2 REMEDIAÇÃO

Considerando os sérios perigos para a saúde humana e os impactos adversos nos ecossistemas terrestres causados pelo vazamento e poluição do solo e da água por petróleo, torna-se essencial desenvolver estratégias de reabilitação e renovação desses ecossistemas (Haider *et al.*, 2021; Johnston; Lim; Roh, 2019). Tais estratégias visam minimizar o risco de exposição, restabelecer a funcionalidade do solo e garantir a prestação de serviços ecossistêmicos, um processo conhecido como ações de remediação de contaminantes (O'Brien *et al.*, 2017). Uma variedade de técnicas de reabilitação, tanto no local quanto fora dele, são

empregadas, abrangendo processos de recuperação e eliminação por meio de abordagens como tratamento ultrassônico, acústico, eletromagnético e elétrico, térmico, físico-químico, químico e biológico, sendo estas técnicas adotadas como estratégias para recuperar solos contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo (Zhang *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2020).

Os métodos físicos e químicos atualmente disponíveis para remediação de locais contaminados são caros, ineficazes e até prejudiciais ao meio ambiente, introduzindo outros produtos químicos tóxicos no processo (Koelmel; Prasad; Pershell, 2015). As principais técnicas de remediação física incluem métodos de isolamento, dessorção térmica, extração de vapor do solo, remediação elétrica e extração de fluidos supercrítico, enquanto os químicos são realizados por lixiviação de surfactante, tecnologia de plasma de baixa temperatura, de oxidação catalítica e redução da oxidação química (Lv; Bao; Zhu, 2022).

Contudo, dentre as alternativas existentes para a remoção de contaminantes, os métodos biológicos, no qual são utilizados plantas e microrganismos como agentes para a restauração de solos contaminados, evidenciam-se como os mais eficazes e economicamente viáveis (García-Sánchez *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021). A aplicação de sistemas envolvendo interações entre plantas e microrganismos para a remoção de contaminantes orgânicos em solos representa uma abordagem inovadora, que resultou na identificação de várias espécies de plantas, bactérias e fungos capazes de converter moléculas tóxicas do petróleo em subprodutos não tóxicos por meio de seus processos fisiológicos e moleculares (Sarma; Nava; Prasad, 2019). A tecnologia de remediação de petróleo no solo associada a microrganismos e plantas, biorremediação e fitorremediação respectivamente, é promissora para as futuras remediações de áreas contaminadas (Yuanfei; Bao; Zhu, 2022).

2. 2. 1 Biorremediação

A biorremediação, uma técnica de remediação de natureza biológica, envolve a remoção de hidrocarbonetos derivados do petróleo pela ação isolada ou combinada de microrganismos, incluindo diferentes gêneros e espécies de fungos e bactérias (Ajona; Vasanthi, 2021). Os hidrocarbonetos simples e compostos que constituem o petróleo bruto são degradados por numerosos microrganismos especialmente nativos, cada qual capaz de quebrar grupos específicos de moléculas (Varjani, 2016). Nos últimos anos, o uso de bactérias especializadas na degradação de hidrocarbonetos ganhou destaque entre os métodos biológicos utilizados em áreas contaminadas com petróleo e seus subprodutos, pois além de serem de baixo custo,

causam poucas mudanças nas características químicas, físicas e biológicas do solo (Wu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022).

A contaminação ambiental pelos componentes químicos do petróleo bruto e seus derivados tem efeitos diretos sobre a estrutura microbiana do solo, devido à sua toxicidade elevada (Ławniczak *et al.*, 2020). Entretanto, alguns microrganismos desenvolveram adaptações tornando-se capazes de usar essas moléculas provenientes da contaminação, diminuindo consequentemente a toxicidade do ambiente e proporcionando condições favoráveis para a sua sobrevivência no meio, como ocorre com as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (Xu *et al.*, 2018). No processo, os microrganismos degradadores têm a capacidade de utilizar os hidrocarbonetos de petróleo como única ou principal fonte de carbono e energia para crescer, já que este é um dos componentes essenciais de todos os constituintes celulares, convertendo-os em produtos químicos atóxicos que são novamente liberados para o meio (Ismail; Kasmuri; Hamzah, 2022).

A grande maioria das bactérias degradadoras de compostos orgânicos sintetizam enzimas extracelulares surfactantes, que medeiam reações de oxidação-redução, emulsificando as moléculas de hidrocarbonetos para formar gotículas ou micelas, que por fim são absorvidas pelo microrganismo e utilizadas como substrato (Abbasian *et al.* 2015; Sarma; Nava; Prasad, 2019). Outras bactérias, chamadas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), desempenham processos como fixação de nitrogênio, síntese de hormônios, sideróforos e solubilização de fósforo, podendo ser também importantes degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo presentes no solo (Ali *et al.*, 2023). Essas podem colonizar o interior das raízes, a rizosfera ou viver perto da superfície radicular das plantas, e possuem mecanismos que incluem a bioacumulação (acúmulo de contaminantes nas células dos microrganismos), biomineralização (transferência de contaminantes do meio aquoso para precipitados cristalinos ou amorfos), biotransformação (transformação de contaminantes de formas tóxicas para menos tóxicas) e biossorção (ligação de contaminantes com proteínas presentes na parede celular de microrganismos) para superar a toxicidade dos contaminantes (Saeed *et al.*, 2021b; Graj *et al.*, 2023).

Existem vários gêneros de bactérias e fungos que degradam cerca de 10% a 99% de hidrocarbonetos, entre eles se destacam os gêneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, *Mesorhizobium* e *Brucella* entre outros (Zhang *et al.*, 2020). Alguns desses gêneros possuem a capacidade de interagir com plantas atingindo níveis ainda maiores de degradação, pelo processo de fitorremediação, a qual vem sendo considerada uma técnica econômica e verde (Jiao *et al.*, 2019; Eze *et al.*, 2022). Apesar do uso

combinado de plantas e BPCV como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo ser um conceito relativamente novo no campo da remediação de solo contaminado, esse se mostra promissor (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016; Ismail *et al.*, 2024; Graj *et al.*, 2023).

2. 2. 2 Fitorremediação

A fitorremediação consiste no uso de espécies vegetais para estabilizar, extrair, acumular e degradar contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes no ambiente, por diferentes mecanismos de forma econômica e ecologicamente correta (Madejón *et al.*, 2018). A utilização da vegetação na remediação de poluentes orgânicos é relativamente recente, originando-se após o reconhecimento da capacidade das plantas em acumular contaminantes prejudiciais (Sarma; Nava; Prasad, 2019). Dentre as formas de remediação dos compostos tóxicos do petróleo no solo, a fitorremediação requer menos esforço de manutenção, minimiza as perturbações do local e além de ser uma abordagem econômica e menos destrutiva comparada aos demais métodos (Alotaibi; Arnaud; Hijri, 2022).

O processo de remoção de poluentes pelas plantas pode ocorrer por diferentes mecanismos e processos biológicos, incluindo a: fitoestabilização, no qual ocorre a imobilização de impurezas nas raízes; fitoacumulação ou fitoextração onde os poluentes se acumulam em diferentes partes da planta; fitodegradação ou fitotransformação onde as plantas metabolizam, usando o mecanismo de degradação dentro da mesma; fitovolatilização no qual as plantas absorvem poluentes e eliminam por meio dos processos de transpiração; e rizofiltração na qual as bactérias são atraídas para perto da raiz e ali realizam a remediação (Polińska *et al.*, 2021). A taxa de remediação de petróleo nessa técnica é potencializada pela liberação de nutrientes e oxigênio no solo pelas raízes das plantas, juntamente com a melhoria na aeração do solo, maior atividade microbiana, indução genética e maior biodisponibilidade de hidrocarbonetos, possibilitando a restauração da produtividade e da fertilidade de solos degradados, promovendo reabilitação dos ciclos biogeoquímicos na rizosfera, enquanto preserva a estrutura e textura naturais do solo (Dehnavi; Ebrahimipour, 2022).

Ao melhorar as condições do solo em consequência da utilização de plantas como remediadoras, estas atraem para a rizosfera microrganismos, incluindo bactérias especializadas, que em interação com as plantas contribuem com a promoção do crescimento da planta e a degradação de hidrocarbonetos presentes no solo (Rafique *et al.*, 2023). No sistema planta-micróbio, os microrganismos convertem compostos orgânicos tóxicos em nutrientes e energia para as plantas, produzindo subprodutos inofensivos, enquanto as plantas acumulam

substâncias tóxicas e resistem à toxicidade por meio de sistemas de defesa antioxidantes, sendo este fenômeno observado em várias espécies, dessa forma, cada componente desempenha papéis diversos, com uma maior resistência ao solo contaminado sendo essencial para uma eficaz fitorremediação (Kuzina *et al.*, 2021). As plantas sintetizam e fornecem exsudatos e fotossintatos aos microrganismos, que por sua vez, sintetizam compostos e nutrientes às plantas auxiliando na promoção do crescimento, promovem maior crescimento e volume das raízes das plantas, além de possibilitar maior resistência, melhorar o sistema de defesa das plantas e reduzir o estresse abiótico (Cheng; Zhou; Yu, 2019).

2. 3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

No solo, existe uma diversidade de bactérias interagindo com as plantas, algumas das quais exercem influência benéfica, como as bactérias que promovem o crescimento das plantas, ou aquelas que atuam de forma prejudicial, como fitopatógenos, enquanto outras estabelecem interações neutras com as plantas (Whipps, 2001; Bulgarelli *et al.*, 2013; Glick; Gamalero, 2021). Dentro dessa gama de microrganismos, as bactérias coletivamente denominadas como promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são atraídas para a rizosfera, uma estreita região de interface entre o solo e as raízes das plantas, onde há elevada síntese de moléculas orgânicas, como açúcares, aminoácidos, flavonóides, esteróides e terpenos provenientes dos exsudatos radiculares (Ahmad; Kibret, 2014; Abdelaal *et al.*, 2021). Ao interagir com as raízes, as bactérias desempenham mecanismos de ciclagem de nutrientes do solo, síntese aumentada de hormônios vegetais, produção de sideróforos aumentando a disponibilidade de ferro na rizosfera e ainda atuam antagonicamente contra fitopatógenos (Ji *et al.*, 2019).

Essas BPCV apresentam a habilidade de estabelecer e assumir uma variedade de associações com as raízes de várias espécies de plantas (Cardoso; Andreote, 2016; Thiebaut *et al.*, 2022). As interações entre bactérias e plantas, incluem interações associativas, endofíticas e simbióticas, cada uma com características distintas (Glick, 2015; Lobo *et al.*, 2022). Nas interações associativas, as bactérias colonizam a rizosfera, sem penetrar nos tecidos vegetais (Franch; Lindström; Elmerich, 2009; Carvalho *et al.*, 2016). Por outro lado, nas interações endofíticas, as BPCV residem dentro dos tecidos vegetais, como caules e folhas, sem causar danos aparentes às plantas (Kneip *et al.*, 2007; Morales-Cedeño *et al.*, 2021). Por fim, nas interações simbióticas, as BPCV estabelecem interações mais específicas, através da formação de nódulos nas raízes de leguminosas (Acosta-Jurado, 2021).

2.3.1 Mecanismos Bacterianos Para Promoção do Crescimento Vegetal

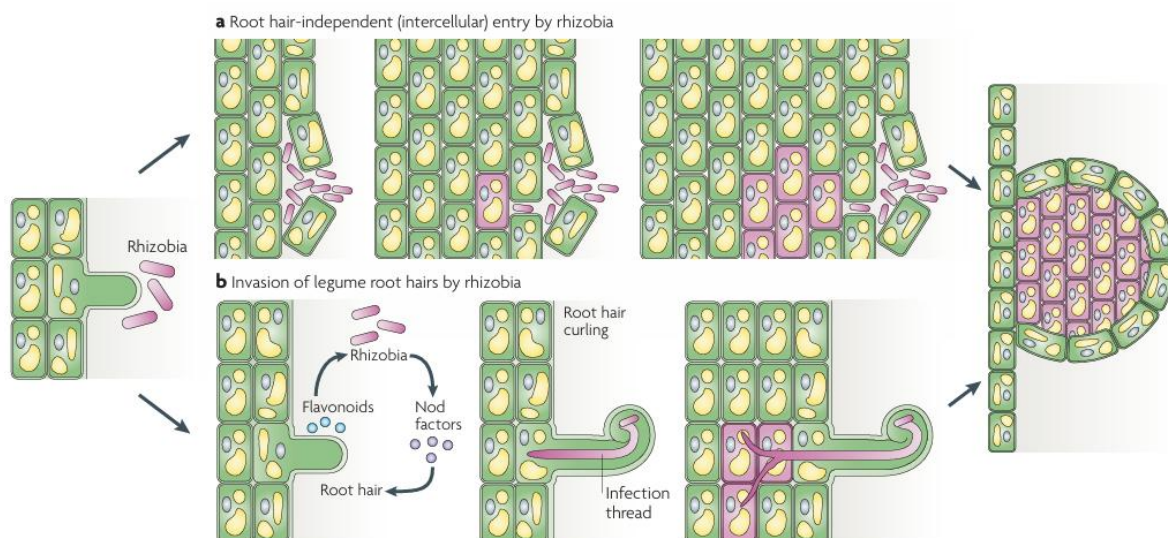
2.3.1.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A partir da fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), as bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio) convertem o dinitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), suprimindoem parte ou integralmente a demanda de N pela planta (Dong; Song, 2020). Este se refere a um processo natural de transformação do N_2 em uma forma simples, solúvel e não tóxica (NH_4^+) assimilável pelas células vegetais para a síntese de várias biomoléculas (Soumaré *et al.*, 2020).

As bactérias diazotróficas podem ser de vida livre, associativas ou endossimbióticas (Mus *et al.*, 2016). Na fixação de N_2 por bactérias endossimbióticas de plantas leguminosas, há formação de um órgão especializado, o denominado nódulo radicular (Etesami, 2022). O órgão formado nessa interação é o local de infecção e colonização da bactéria na planta, no qual recebe fontes de carbono provenientes da planta hospedeira como fonte de energia, converte em ATP e utiliza-o para sua sobrevivência bem como para a realização do processo de FBN, fornecendo às plantas a amônia, numa troca benéfica por recursos (Walker; Lagunas; Gifford, 2022; Cangioli *et al.*, 2022).

Para efetivamente ocorrer a interação simbiótica entre planta e bactérias, um complexo processo de sinalização química ocorre na rizosfera, permitindo o recrutamento e estabelecimento de comunidades microbianas ativas (Lindström; Mousavi, 2019). Nesse processo ocorre a formação de um gradiente químico no solo por diferentes metabólitos exsudados pelas raízes, como ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares, que são utilizados para atrair quimiotaticamente os rizóbios, e compostos fenólicos, como os flavonóides, também responsáveis por induzir a expressão do gene *nod* em rizóbios (Lyu *et al.*, 2022). Sendo assim, a interação simbiótica se inicia com os flavonóides exsudados pelas raízes das plantas (Figura 1), que desempenham o papel de sinalizadores para os rizóbios, que por sua vez, iniciam a produção dos fatores de nodulação (fatores Nod) e são reconhecidos pela planta, ativando a via de sinalização de simbiose (Wang; Liu; Zhu, 2018). Esse processo leva a oscilações de cálcio, a princípio nas células epidérmicas, mas posteriormente nas células corticais, preparando para a colonização subsequente, via células ciliadas da raiz, que crescem e enrolam prendendo a bactéria (Oldroyd, 2013).

Figura 1- Processo de colonização e formação de nódulos radiculares em resposta da simbiose entre planta-bactéria.



Fonte: DEAKIN, W. J.; BROUGHTON, W. J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 312-320, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2091>. Acesso em: 29 jul. 2023.

Quando o rizóbio simbiote é aprisionado no compartimento formado pelo enrolamento, o mesmo entra na raiz, por meio da hidrólise local da parede celular e da invaginação da membrana plasmática, o que dá início ao processo de crescimento da ponta em direção à base do pelo radicular, resultando na formação do fio ou canal de infecção que cresce e se ramifica através do córtex (Ibáñez; Wall; Fabra, 2017). Em uma região mais profunda do córtex, próximo ao xilema, as células corticais se desdiferenciam e iniciam a divisão, formando uma área denominada primórdio nodular, que posteriormente une-se ao canal de infecção que se alongou através do pelo radicular e se funde com a membrana plasmática do hospedeiro, penetrando e liberando as bactérias no citoplasma, que posteriormente se diferenciam em bacteroides fixadores de nitrogênio, formando finalmente o nódulo radicular (Taiz *et al.*, 2021).

Numerosas bactérias simbióticas, colonizam as células vegetais e formam os nódulos e realizam a FBN, dentre elas, representantes dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Ochrobactrum* e *Mesorhizobium* estão incluídas neste grupo e são comumente usadas como inoculantes para leguminosas (Quiza; St-Arnaud; Yergeau, 2015; Hakin *et al.*, 2020). A FBN provê a planta com uma das principais fontes de nitrogênio, sendo então a inoculação com bactérias dizotróficas utilizada como uma alternativa para promover práticas sustentáveis, diminuir ou substituir o uso de fertilizantes químicos agrícolas e agroflorestais (Yeremko *et al.*, 2025). Portanto, desenvolver recursos e aumentar o uso de biológicos em sistemas de cultivo são métodos importantes e necessário para

prevenir a degradação ambiental e a poluição relacionada a insumos agroquímicos (Bagheri *et al.*, 2021).

2.3.1.2 Síntese de ácido indol-3-acético (AIA)

Os fitormônios são responsáveis por regular inúmeras vias metabólicas e processos biológicos nas plantas (Jan *et al.*, 2024). O ácido indol-3-acético (AIA), é um importante hormônio vegetal dentro do grupo das auxinas, responsável por controlar os processos fisiológicos das plantas em quase todas as fases do crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo o aumento e a divisão celular, a diferenciação dos tecidos, alongamento, desenvolvimento dos frutos, senescência, bem como, responder à luz e gravidade (Alemneh *et al.* 2020; Jaiswal *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2022; Lobo *et al.*, 2023). A produção de fitormônio altera as características das raízes, facilitando a absorção de nutrientes, aumentando o tamanho das partes aéreas das plantas, afrouxando suas paredes celulares, bem como, aumentando a exsudação da raiz e fornecendo nutrientes adicionais para apoiar no crescimento das bactérias da rizosfera, de modo a aumentar a atividade microbiana (Etesami, 2022).

A síntese de alguns fitormônios, incluindo o AIA, pode ocorrer por ação de algumas BPCV (Lobo *et al.*, 2022). O AIA é produzido especialmente pelos gêneros bacterianos *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Rhizobium* e *Enterobacter* (Alaylar *et al.*, 2019; Chen; Liu, 2019; Swarnalakshmi *et al.*, 2020). A síntese de AIA por bactérias do solo pode ocorrer na presença ou não de L-triptofano como precursor. As principais vias envolvidas na conversão do triptofano correspondem à via do ácido indol-3-piruvato (IPyA) (L -Trp $\rightarrow$ IPyA $\rightarrow$ indol-3-acetaldeído (IAAld) $\rightarrow$ IAA), a via do indole-3-acetamida (IAM) (L -Trp $\rightarrow$ IAM $\rightarrow$ IAA), a via da triptamina (TAM) (L -Trp $\rightarrow$ TAM $\rightarrow$ IAAld $\rightarrow$ IAA), via da oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) (L -Trp $\rightarrow$ IAAld $\rightarrow$ IAA), e a via do indol-3-acetonitrila (IAN) (L -Trp $\rightarrow$ IAN $\rightarrow$ IAA) (Emenecker *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2023).

Diferentes métodos de detecção e determinação da produção de auxinas por microrganismos são utilizados. Dentre os métodos de maiores eficiência se destacam o método de ensaio imunoenzimático (ELISA), metabolômica baseada em espectrometria de massa, cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e diferentes variantes ou detectores, incluindo o método de Salkowski (Guardado-Fierros *et al.*, 2024). O método de Salkowski, desenvolvido por Gordon e Weber (Gordon; Weber, 1951), é usualmente utilizado

como método de detecção de auxinas produzidas por bactérias e rizobactérias, por se tratar de uma técnica colorimétrica com resultados rápidos, onde a absorbância é medida em um espectrofotômetro em um comprimento de onda fixado em 530 nm (Rahman *et al.*, 2010; Dubey *et al.*, 2021).

2.3.1.3 Solubilização de fosfato (P)

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, fundamental na fotossíntese, respiração, biossíntese de ácidos nucleicos e membranas, além de desempenhar grande importância na regulação de enzimas e na composição da molécula orgânica adenosina trifosfato (ATP) (Billah *et al.*, 2019; Lambers, 2021). Sua assimilação pelas plantas ocorre principalmente como íons ortofosfato primários e secundários carregados negativamente na solução do solo, que embora apresente estoques totais consideráveis de P, apenas uma pequena fração ($< 1\%$) do P inorgânico total (P_i) e do P orgânico (P_o) é dissolvida em qualquer momento e se apresenta prontamente disponível para as plantas (Zhu; Li; Whelan, 2018). A sua limitada assimilação pelas plantas se deve a processos edáficos complexos e interações com componentes do solo, como hidróxidos de ferro (Fe^{3+}) e alumínio (Al^{3+}) em solos ácidos e cálcio (Ca^{2+}) em solos alcalinos, além de ser influenciado pela umidade e pela presença de partículas de argila que fazem a imobilização do P no solo (Bindraban; Dimkpa; Pandey, 2018).

A disponibilização de P para as plantas pode se dar pela incorporação de fertilizantes fosfatados ao solo (Yahaya *et al.*, 2023). No entanto, a maior parte do P disponibilizado através dos fertilizantes fica inacessível, imóvel ou indisponível às plantas, devido à formação de complexos insolúveis de sais de fosfato (Schnug; Haneklaus, 2016). Além disso, o uso recorrente e a elevada quantidade de fertilizantes fosfatados introduzidos no solo causam a acidificação do mesmo, a poluição da água e eutrofização de lagos e rios (Weeks; Hettiarachchi, 2019).

Os microrganismos do solo desempenham um papel fundamental na absorção de nutrientes pelas plantas e estão envolvidos em uma ampla gama de processos biológicos, dos quais inclui a solubilização e mineralização de P insolúvel às plantas (Ji *et al.*, 2019). Numerosos microrganismos do solo e da rizosfera, coletivamente chamados de microrganismos solubilizadores de fosfato, são conhecidos por liberar efetivamente P do solo (Timofeeva; Galyamova; Sedykh, 2022). Os mecanismos de solubilização e mineralização de fosfato mediada por microrganismos nos solos, têm sido amplamente pesquisados, mas não são ainda

completamente compreendidos. Entretanto, os mecanismos de solubilização de P por microrganismos incluem a (I) liberação de compostos complexantes ou de dissolução de minerais, por exemplo, ânions de ácidos orgânicos, prótons, íons hidroxila, CO₂; (II) liberação de enzimas extracelulares (mineralização bioquímica de P); e (III) liberação de P durante a degradação do substrato (mineralização biológica de P) (Sharma *et al.*, 2013).

A solubilização bacteriana do fosfato inorgânico tem sido associada principalmente à liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como ácido cítrico, láctico, glicólico, 2-cetoglucônico, oxálico, glicônico, acético, málico, entre outros, que quelam cátions ligados ao fosfato através de seus grupos hidroxila e carboxila, convertendo-os em formas biodisponíveis (Kalayu, 2019; Mendoza-Arroyo *et al.*, 2020). Os ácidos orgânicos são sintetizados como produtos do metabolismo do carbono, que quando liberados no ambiente diminuem o pH, acidificando o solo pela liberação de H⁺, associada à assimilação de cátions ou da atividade ATPase com translocação de H⁺ (Timofeeva; Galyamova; Sedykh, 2022).

Vários gêneros de bactérias são conhecidos por sua capacidade de realizar a solubilização de fosfato no solo. Dos gêneros solubilizadores se destacam *Achromobacter*, *Aereobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Enterbacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Thiobacillus* (Zhu; Li; Whelan, 2018). Estes por sua vez, se destacam por suas vantagens como segurança para o meio ambiente, baixo custo e alta eficiência, além de promover maior rendimento das plantas e a absorção de fósforo tanto em vasos quanto no campo (Timofeeva; Galyamova; Sedykh, 2022).

2.4 FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma das espécies alimentares mais importantes do mundo (Reinprecht *et al.*, 2020). Uma rica fonte de proteínas, fibra alimentar e amido, especialmente nos países em desenvolvimento (Los *et al.*, 2018). Se trata de uma leguminosa indígena da América Central e do Sul, sendo o México apontado como o berço da domesticação da espécie (Bitocchi *et al.*, 2012).

A espécie pode crescer em diferentes condições edafoclimáticas e dispõe de muitas variedades com tempos de maturação e sementes com grande variedade de características, tamanhos, formas e cores (De Ron *et al.*, 2015). É atualmente cultivada em países de todos os continentes por pequenos agricultores e grandes produtores de grãos (Shamseldin; Velázquez,

2020). A nível nacional, o feijão comum, por possuir como característica uma elevada adaptabilidade edafoclimática, permite o seu cultivo em três safras, denominadas “safra das águas”, “safra da seca” e “safra de outono/inverno” (Silva *et al.*, 2020).

O feijão comum se destaca por suas interações simbióticas com BPCV, que enriquecem o solo através da FBN (Karavidas *et al.*, 2022). A espécie é comumente utilizada em experimentos com isolamento de bactérias do solo, em vista da sua elevada promiscuidade com microrganismos nodulantes (Dall’agnol *et al.*, 2014; Shamseldin; Velázquez, 2020; Moura *et al.*, 2022; Moura *et al.*, 2023; Araújo *et al.*, 2025). Dentre os gêneros que nodulam *P. vulgaris* se destacam *Rhizobium*, *Pararhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Paraburkholderia* (Kawaka *et al.*, 2018; Shamseldin; Velázquez, 2020).

2.5 FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*)

O feijão-caupi conhecido também como feijão-fradinho, é uma planta dicotiledônea, herbácea pertencente à família Fabaceae, uma leguminosa alimentar com altos teores proteicos e de carboidratos (Jayatilake *et al.*, 2018). Historicamente, acredita-se que sua origem seja na África, onde a leguminosa é a mais comumente consumida nas regiões secas de savana (Smykal *et al.*, 2015). No entanto, apesar da sua distribuição global, seu cultivo fica restrito a algumas regiões, em diferentes ecossistemas agrícolas, sendo cultivado principalmente por comunidades agrícolas carentes, que dependem delas para seu sustento e subsistência (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015).

No Brasil, o feijão caupi tem sido uma cultura tradicionalmente importante para pequenos agricultores nas regiões Nordeste e Norte, no entanto, a cultura foi introduzida em algumas áreas da região do cerrado para suceder a cultura principal que normalmente é a soja ou milho (Silva-Junior *et al.*, 2018). Em nível nacional, a cultura é bem adaptada à pouca disponibilidade hídrica, aos solos de várzea e de terra firme, mas se desenvolve melhor em solos leves, profundos, bem arejados e preferencialmente com fertilidade média a alta, podendo ser implantada em solos com baixa fertilidade, desde que manejados com corretivos e fertilizantes (Pereira, 2010). Além disso, para seu bom desenvolvimento e produção de grãos, a cultura exige uma faixa de temperatura de 18 °C a 34 °C, podendo ser cultivado tanto em região de clima seco quanto em região de clima úmido, com aproximadamente 300 mm de precipitação (Oliveira *et al.*, 2019).

As plantas leguminosas, de maneira geral, apresentam boa adaptabilidade em solos degradados e afetados por fatores bióticos e abióticos, desempenhando um papel importante na

regeneração de solos degradados e contaminados (Flores-Duarte *et al.*, 2022; Meištinkas *et al.*, 2024). Entretanto, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) se destaca por seu potencial fitorremediador e associativo com bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (Jidere; Akamigbo; Ugwuanyi, 2012; Jiao, *et al.*, 2019). Para reduzir possíveis efeitos do estresse ambiental e nutricional, o feijão-caupi desenvolve associações mutualísticas com microrganismos benéficos do solo, que por diferentes mecanismos auxiliam no crescimento da planta (Oliveira *et al.*, 2017; Marinho *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2020; Ayalew; Yoseph, 2020). A espécie possui resistência aos hidrocarbonetos do petróleo, capacidade de acumulação de metal, produção de alto rendimento, além de sintetizar elevadas quantidades de exsudatos radiculares, tornando-o atrativo para os microrganismos no processo de fitorremediação (Aliku; Madu; Aliku, 2021; Farouq *et al.*, 2022)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e biorremediadoras de solos contaminados por petróleo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inocular sementes de *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* com BPCV oriundas de nódulos radiculares das espécies nativas *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* de área contaminada por petróleo e cultivá-las em câmara de cultura de tecido;
- Selecionar as BPCV capazes de promover a formação de nódulos radiculares nas cultivares testadas;
- Caracterizar as BPCV quanto à capacidade de alteração do pH do meio e coloração de Gram;
- Identificar as BPCV através do sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Caracterizar as BPCV quanto à produção de ácido indol-3-acético e solubilização de fosfato *in vitro*;
- Avaliar o potencial promotor de crescimento vegetal das estirpes bacterianas inoculadas nas espécies *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*, cultivadas em casa de vegetação;
- Avaliar a tolerância e degradação de petróleo pela técnica de Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), das estirpes bacterianas inoculadas nas espécies *V. unguiculata* e *P. vulgaris* submetidos à crescimento em solo contaminado com petróleo.

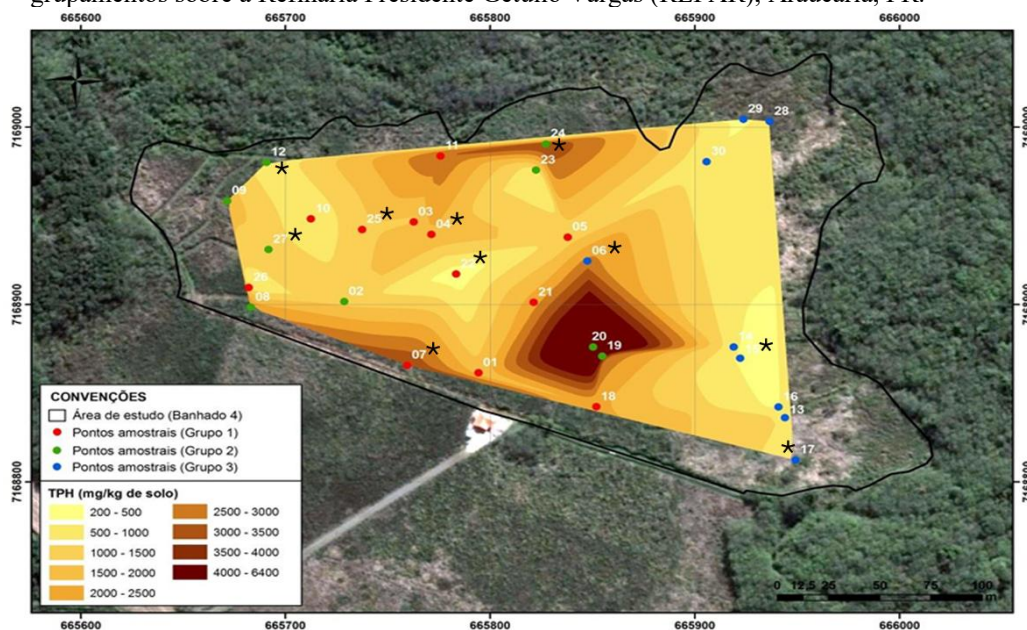
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BPCV

As BPCV utilizadas nesse trabalho fazem parte do estoque de bactérias do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM). Essas BPCV foram originalmente isoladas de nódulos radiculares de exemplares das espécies *Erythrina crista-galli* e *Mimosa oblonga* presentes na área de coleta denominada “Banhado 4” da propriedade da Refinaria Presidente Getúlio Vargas- REPAR, cidade de Araucária- PR (Araújo, 2021). As espécies são nativas da região, que ocorrem naturalmente em solos hidromórficos e que, portanto, são espécies adaptadas a ambientes com exposição solar plena e inundados, tais como as áreas de várzea (Reis-Jr *et al.*, 2010; Mello *et al.*, 2019).

A área do “banhado 4” apresenta aproximadamente 5,5 hectares, localizado nas coordenadas UTM centrais 665.780 Leste e 7.168.868 Norte, em uma altitude próxima de 890 m s.n.m (Figura 2). As BPCV foram coletadas nos pontos 4, 6, 7, 12, 15, 17, 22, 24, 25 e 27, destacados na Figura 2, os quais apresentam concentrações variadas de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) (Silva, 2014).

Figura 2- Modelo digital indicando os valores de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) nos diferentes grupamentos sobre a Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), Araucária, PR.



Fonte: SILVA, M. Y. B. Florística e estrutura de uma Formação Pioneira com Influência Flúvio-lacustre 12 Anos após derramamento de óleo, Araucária, Paraná. 2014. 131f. Tese (Programa de Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2014.

Nota: Os números indicam os pontos de coleta das espécies vegetais *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli*. * pontos de coleta das plantas *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* do presente estudo.

4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PUREZA DOS ISOLADOS

As bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* são mantidas em glicerol 50%, em microtubo, armazenados a -20°C no estoque microbiológico do LABMOM/UEPG. Para sua reativação, uma alíquota de 500 µL do estoque foi coletada e inoculada em 2 mL de meio *Yeast Mannitol* (YM) líquido, meio indicado para o crescimento de rizóbios (Vincent, 1970) (Tabela 1). Este, foi submetido à agitação em incubadora a 120 rpm com temperatura de 28°C até apresentar crescimento, atingindo a D.O.₆₀₀ entre 0,7-1,0.

Os isolados que apresentaram crescimento em meio YM líquido foram transferidos para placas de petri contendo meio *Yeast Mannitol Agar* (YMA) acrescido de vermelho congo. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 28°C, com monitoramento diário até o crescimento de colônias isoladas e puras. O meio YMA permite a identificação visual de contaminantes junto ao cultivo, possibilitando uma melhor comparação da morfologia das colônias bacterianas no meio de cultura (Hungria; Silva, 2011), sendo assim, as placas foram avaliadas quanto à presença de demais microrganismos. Em casos de contaminação, as colônias foram inoculadas em novas placas, até a obtenção de um padrão único de crescimento bacteriano.

4.2.1 Teste de Alteração do pH do Meio de Cultura

Após o isolamento de colônias puras, as estirpes bacterianas foram testadas quanto à capacidade de alterar o pH do meio de cultura em crescimento. Para tanto, os isolados foram cultivados em meio sólido YMA acrescido de azul de bromotimol (Tabela 1) à 28 °C até a obtenção de colônias isoladas para a caracterização de suas condições ácidas ou alcalinas. A alteração da coloração do meio de cultura caracteriza os isolados, onde, a coloração azul indicará isolado alcalino, coloração amarela isolado ácido e a não alteração da cor original do meio isolados neutro (Hungria; Silva, 2011).

Tabela 1- Relação de reagentes do meio *Yeast Mannitol* (YM), conforme concentrações indicadas pela Instrução normativa DAS/MAPA nº 13, de 24 de março de 2011.

Componentes	Quantidade em g/L
Fosfato de potássio bibásico anidro (K_2HPO_4)	0,5
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2
cloreto de sódio (NaCl)	0,1
Manitol	5
Extrato de levedura	0,4
Ágar*	17
Quantidade em mL/L	
Solução de Vermelho Congo 2,5%*	10
Solução Azul de Bromotimol 2,5%**	10

Fonte: a autora.

Nota: *Componentes usados somente no preparo de YMA na condição sólida; **Solução indicadora de mudança no pH do meio; Ajustar o pH do meio para $7,0 \pm 0,2$ com KOH (10%) ou solução H_2SO_4 (5%).

4.2.2 Coloração de Gram

Os isolados foram corados por Gram para determinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias foram determinadas usando uma colônia isolada fixada pelo calor em lâmina de vidro. Esfregaços foram preparados de cada isolado, secos ao ar e posteriormente aquecidos em chama. Sobre o esfregaço na lâmina foi depositado violeta de genciana fenicada, que ficou em repouso por dois minutos, as lâminas foram enxaguadas com água destilada. Após, no esfregaço foi adicionado também lugol, que permaneceu em repouso por um minuto e então lavado novamente com água destilada. As lâminas foram descoloridas com etanol 95%, que permaneceu sobre a lâmina por 20 segundos e após esse tempo foi lavado com água destilada. Por fim, as lâminas foram coradas com safranina por 30 segundos, lavadas com água destilada e secas. Suas reações de Gram foram observadas microscopicamente para confirmar a identidade dos isolados, com lente objetiva de imersão em óleo.

4.2.3 Crescimento Bacteriano, Tolerância e Degradação de Hidrocarbonetos do Petróleo em Meio de Cultura Líquido

Para testar o potencial de tolerância e degradação do petróleo, os isolados foram crescidos em frascos contendo meio líquido *Yeast Mannitol* (YM) (Tabela 1), acrescidos de 1% de petróleo (Sigma Aldrich, 100% de pureza) e meio líquido Bushnell e Haas (BH) (Tabela 2) acrescidos de 1%, 2% e 5% de petróleo sendo realizadas três repetições para cada isolado, em cada uma das condições. Na sequência os isolados foram incubados a 28 °C, com agitação a

180 rpm, por 5 dias. Os resultados foram considerados positivos de acordo com a turbidez do meio, uma vez que o aumento na densidade celular dificulta a passagem da luz, conferindo um aspecto turvo ao meio, relacionado a multiplicação das células em suspensão.

Tabela 2- Relação de reagentes do meio Bushnell e Haas (BH).

Componentes	Quantidade em g/L*
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1,0
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	1,0
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄ H ₂ O)	1,0
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	0,2
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,02
Cloreto de ferro hexahidratado (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,004

Fonte: a autora.

Nota: Ajustar o pH do meio para $7,0 \pm 0,2$ com KOH (10%) ou solução H₂SO₄ (5%).

4.3 CULTIVO E PREPARAÇÃO DOS INOCULANTES BACTERIANOS

Os isolados bacterianos foram cultivados e mantidos em coleção biológica no LABMOM, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em Ponta Grossa, Paraná. A produção de inoculante ocorreu de forma isolada para cada bactéria, em meio de cultura *Yeast Mannitol* (YM) líquido sob agitação a 120 rpm com temperatura de 28°C até a fase exponencial, padronizados a uma concentração celular aproximada de 10^7 UFC mL⁻¹.

4.4 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS CAPAZES DE NODULAR FEIJÃO

4.4.1 Plantas

Foram utilizadas para seleção de isolados promotores de crescimento e degradadores de hidrocarbonetos de petróleo, sementes de feijão-caupi (*V. unguiculata*) cultivar BRS tumucumaque e feijão comum (*P. vulgaris*) cultivar BRS FC310 oriundos de campos experimentais da Embrapa Transferência de Tecnologia, localizada no município de Ponta Grossa.

4.4.2 Inoculação

Os ensaios para avaliação dos isolados quanto à capacidade de formar nódulos em leguminosas, foi desenvolvido em câmara de cultura de tecido da UEPG, nas espécies de feijão

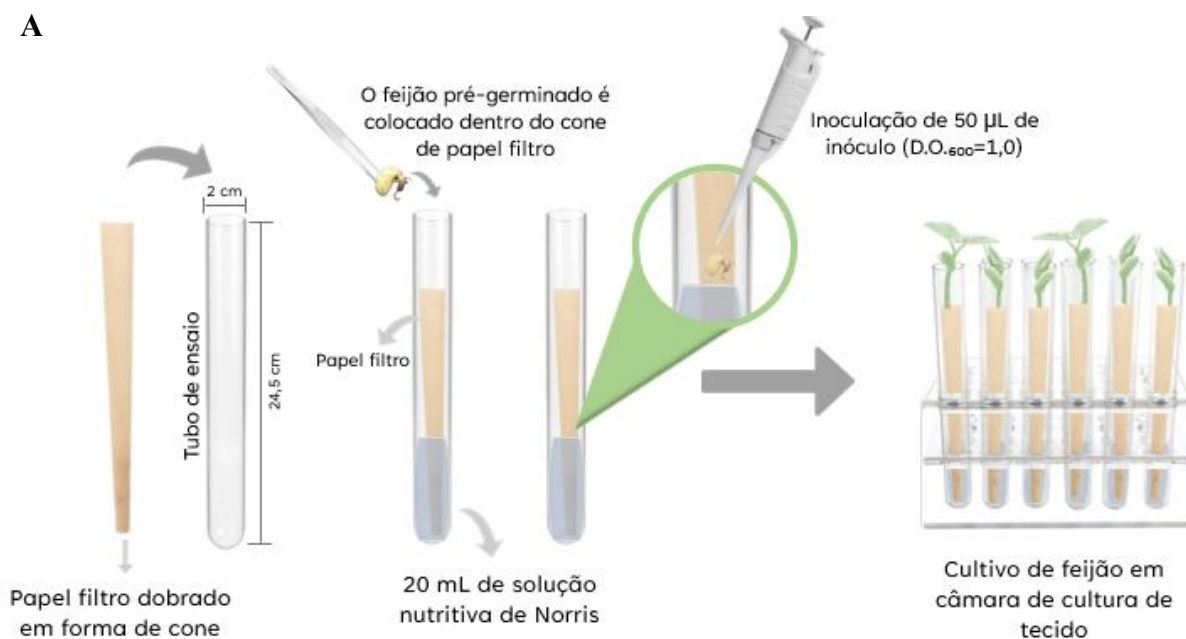
(tópico 5.4.1). Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio de vidro com 24,5 cm de altura e 2 cm de diâmetro, em delineamento aleatorizado em blocos, com três repetições, contendo um controle negativo (sem inoculação) e controle positivo, sendo *Rhizobium tropici* cepa SEMIA 4080 para o feijão comum e *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 como controle positivo do feijão-caupi, conforme recomendado pela Instrução Normativa SDA nº 13 de 24/03/2011.

Para tanto, as sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* foram desinfestadas superficialmente por submersão em etanol 80% por 30 segundos, 2 minutos em hipoclorito de sódio 5%, seguido de lavagens com água destilada estéril (Figueiredo *et al.*, 2008). As sementes desinfestadas foram pré-germinadas em placas de petri contendo meio ágar-água 25% e permaneceram em estufa a 28°C por 48 horas. Completo o período de germinação, foram transferidas para tubos de ensaio de vidro contendo papel germinativo esterilizados em autoclave a 121°C por 40 min à 1 atm, umedecido com 20 mL de solução nutritiva de Norris isenta de nitrogênio (Yates *et al.*, 2016) (Figura 3 A).

Após o preparo do inoculante (Tópico 4.3) e dos tubos de ensaio, foi realizada a inoculação em triplicata das sementes pré-germinadas de feijão-caupi e feijão comum, sendo 50 µL de inóculo por semente logo após o transplante das mesmas para os tubos de ensaio (Figura 3 B). Os tubos contendo as sementes pré-germinadas já inoculadas (10^7 UFC mL⁻¹) foram identificados e alocados em câmara de cultura de tecido com temperatura de 24 °C (Figura 3 C). A nutrição e reposição de água nas plantas ocorreram conforme a necessidade intercalando entre água destilada autoclavada e solução nutritiva de Norris isenta de nitrogênio.

Após 30 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas quanto à presença de nódulos radiculares. Os nódulos foram destacados da raiz e contados. Posteriormente, os resultados foram plotados em planilhas, a média do número de nódulos entre as replicatas foi calculada e por fim comparadas estatisticamente. As bactérias que induziram maior número de nódulos nas espécies de feijão foram selecionadas para os testes posteriores.

Figura 3- (A) Esquema da montagem dos tubos de cultivo de feijão comum e feijão-caupi em câmara de cultura de tecido. (B) Inoculação das sementes nos tubos de ensaio. (C) Cultivo de feijão em câmara de cultura de tecido.



Fonte: a autora.

4.5 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

4.5.1 PCR e Amplificação do Gene 16S rRNA

As estirpes bacterianas isoladas foram crescidas em meio YM líquido sob agitação a 120 rpm com temperatura de 28°C até atingirem a fase exponencial ($D.O_{600}=0,7-0,8$). Para aplicação da técnica de PCR e amplificação do gene 16S rRNA, o DNA bacteriano foi extraído

com o GenElute Bacterial Genomic DNA Kits (Merck), seguindo as instruções do fabricante. A integridade e concentração do DNA total foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram sequencialmente submetidas à técnica de PCR, utilizando os pares de *primers* 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991).

Para amplificação, foram adicionadas a uma reação de 20 µL, 2 µL de tampão de PCR 10x, 0,8 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,4 µL de dNTP (10 mM), 0,6 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 1 µL de DNA na concentração de 10 pmol/ µL e 0,33 µL da enzima Taq DNA polimerase (6 U/µL), por fim, foi completado o volume para 20 µL com água ultrapura estéril. O programa de amplificação foi configurado para realizar 1 ciclo de desnaturação (95°C por 2 minutos), seguido por 25 ciclos ininterruptos (94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e meio) e um ciclo final de extensão (72°C por 10 minutos), seguido por resfriamento (4°C). Na sequência os produtos foram tratados com 5,2 U e 0,77 U de Exonuclease/SAP (*shrimp alkaline phosphatase* – Fermentas), respectivamente, e incubados a 37°C por 1:30 hora, seguindo com a inativação das enzimas a 80°C por 30 minutos. As reações de PCR foram realizadas em triplicata técnica. A avaliação do resultado da PCR, ocorreu por eletroforese em gel de Agarose (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989), composto por gel de agarose 1,8% com tampão TBE 1X.

4.5.2 Sequenciamento Parcial do Gene 16S rRNA e Análise das Sequências

Para o sequenciamento do gene 16S amplificado, foi utilizado o iniciador 27F ou 1492R e o reagente BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (AppliedBiosystems) em um sequenciador de DNA ABI 3500 (AppliedBiosystems).

As sequências obtidas foram analisadas com o programa Geneious v.7.1 (Biomatters) e as sequências consenso geradas pelo alinhamento dos produtos de sequenciamento obtidos com os iniciadores 27F e 1492R foram utilizadas para busca no banco de dados da ferramenta BlastN no “rRNA/ITS” do NCBI (2025). O modelo de substituição de nucleotídeo para análise filogenética foi determinado no programa Mega versão 12 (Tamura *et al.*, 2011).

4.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS

4.6.1 Produção de Ácido Indol-3-acético (AIA)

Para quantificação da produção de ácido indol-3-acético (AIA), as bactérias foram cultivadas em meio YM acrescido de triptofano ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a avaliação de compostos indólicos no sobrenadante será avaliada pelo método de Salkowski (Gordon; Weber, 1951).

Sendo assim, uma colônia isolada cultivada em meio YMA sólido foi transferida para 10 mL de meio YM, agitado a 120 rpm, 28°C até atingir fase exponencial ($\text{D.O.}_{600}=0,7-1,0$) para produção de um pré-inóculo bacteriano. Preparado e crescido o pré-inóculo, 100 microlitros deste foram adicionados em 10 ml do meio YM líquido contendo $100 \mu\text{g/mL}$ de L-Triptofano em triplicata. As bactérias foram cultivadas a 28°C sob agitação de 120 rpm por 96 horas. Completo o período, foi avaliada a produção de auxina no meio de cultura.

Uma alíquota de $500 \mu\text{L}$ foi coletada e transferida para microtubos novos e estéreis, que foram submetidos à centrifugação por 12.000 rpm por 10 minutos, para obter o sobrenadante da cultura. Posteriormente, para quantificação do composto indólico, $300 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo, e a ele adicionado 1,2 mL de reagente de Salkowski, seguido de agitação em vórtex e incubação em temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz. Uma alíquota de 1mL foi lida no espectrofotômetro em 530 nm. Para determinar a concentração de auxina produzida no sobrenadante, foi construída uma curva padrão utilizando ácido indol-3-acético sintético (Sigma-Aldrich) de 0 a 100 μg de AIA, da qual se obteve a equação de regressão para estimar os valores sintetizados pelos isolados bacterianos.

4.6.2 Solubilização de Fosfato

4.6.2.1 Solubilização de fosfato em meio sólido

As bactérias foram inoculadas em meio líquido YM, foram avaliadas no espectrofotômetro em 600 nm até que se obtivessem $\text{D.O.}=0,7$ à 1,0. Quando atingiu-se os valores adequados de densidade ótica, alíquotas de $10 \mu\text{L}$ foram transferidas para placas de Petri contendo o meio sólido NBRIP (Tabela 3) (Nautiyal, 1999) acrescido de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fonte de fosfato em três pontos equidistantes da placa, com duas repetições.

Tabela 3- Relação de reagentes do meio NBRIP.

Tabela 3- Relação de reagentes do meio NBRIP.

Componentes	Quantidade em g/L*
Glicose	10
Cloreto de Magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	5
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,25
Cloreto de potássio (KCl)	0,2
Sulfato De Amônio ($(NH_4)_2SO_4$)	0,1
Fosfato de cálcio ($Ca_3(PO_4)_2$)	5
Ágar**	17

Fonte: a autora.

Nota: * Água destilada; **Somente para preparo do meio sólido; *** Ajustar o pH do meio para 6,8 com KOH (10%) ou solução H_2SO_4 (5%) antes da adição de $Ca_3(PO_4)_2$.

Após a inoculação, as placas de Petri foram mantidas em estufa com temperatura de 28°C por 21 dias. As avaliações ocorreram nos dias 3, 7, 15 e 21 dias de incubação. Para tanto, avaliou-se a capacidade de solubilização de fosfato pelo índice de solubilização (IS), o qual consiste na razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro das colônias.

4.6.2.2 Solubilização de fosfato em meio líquido

A quantificação de solubilização de fosfato pelas estirpes bacterianas foi realizada pelo método do fosfomolibdato (Marra *et al.*, 2012), no qual utiliza meio de cultivo líquido NBRIP acrescido de $Ca_3(PO_4)_2$ como única fonte de P. Foram inoculados 0,2 mL do pré-inóculo em 20 mL de meio NBRIP (Tabela 3) (Nautiyal, 1999) líquido acrescido da fonte de fosfato de cálcio ($Ca_3(PO_4)_2$) e incubados a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm por 96 horas. Na sequência, as amostras foram centrifugadas (1680g/10 minutos) e filtradas (papel Whatman nº 42).

Alíquotas de 0,5 mL do filtrado em triplicata foram misturadas com 1 mL de solução mix composto por 125 mL de ácido sulfúrico (12%), 75 mL de ácido ascórbico (0,099 mol/L), 37,5 mL de molibdato de amônio (0,03 mol/L) e 12,5 mL de tartarato de antimônio-potássio ($4,1071 \times 10^{-3}$ mol/L) e 5 mL de água ultrapura. Após 20 minutos, a intensidade da cor azul foi avaliada em espectrofotômetro (D.O.₈₈₀) e a quantidade de fosfato solubilizado calculada utilizando uma curva padrão, preparada com fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), em oito concentrações (1,2 a 14 mg/L).

4.7 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS INOCULADOS EM FEIJÃO

4.7.1 Capacidade de Promover o Crescimento Vegetal em Casa de Vegetação

O ensaio para avaliação de promoção de crescimento e nodulação dos isolados foi realizado a partir da inoculação nas espécies feijão-caupi e feijão comum, conduzido na casa de vegetação da UEPG em períodos e avaliações distintas. Os experimentos foram conduzidos em vasos de plástico com capacidade de 3 litros, em delineamento aleatorizado em blocos, com cinco repetições. Os tratamentos compreenderam os isolados previamente selecionados a partir dos resultados obtidos nas demais análises, sendo para o feijão comum: bactérias dos códigos P7N5, P12N7, P15N4, P27N6, além dos tratamentos controle positivo *Rhizobium tropici* PRF 81 (SEMIA 4080), controle isento de inoculação e tratamento com adição de nitrogênio na forma de uréia; e para o feijão-caupi: bactérias dos códigos P4N5, P6N10, P15N4 e P27N4, controle positivo *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262, bem como, controle sem inoculação e tratamento com nitrogênio na forma de uréia.

Os vasos foram preenchidos com uma mistura de areia e solo (1:1) coletado do horizonte superficial. Mais informações e características químicas do solo e substrato (solo + areia) estão disponíveis na Tabela 4. Para a correção da acidez do solo foram adicionados 176 kg/ha de calcário (PRNT= 75,2%), visando a elevação da saturação por bases para 70%. A fertilização foi procedida no momento da semeadura, pela aplicação de 0,63 g superfosfato simples (SSP) e 0,13 g de cloreto de potássio por vaso destinados ao cultivo de feijão comum, correspondendo a 210,5 e 41,7 kg. ha⁻¹ de P₂O₅ e K₂O, respectivamente. Para o feijão caupi foi aplicado 0,31 g superfosfato simples (SSP) e 0,15 g de cloreto de potássio por vaso, correspondendo a 105,3 e 50 kg. ha⁻¹ de P₂O₅ e K₂O.

Tabela 4- Análise química do solo e substrato (solo+areia) após correção da calagem do experimento em casa de vegetação.

Amostra	pH	H + Al	Al	Ca	Mg	K	SB	CTC	P Mehlich	C	MO	V	m Al
	(CaCl ₂)								mg/dm ³	g/dm ³		%	
Solo	6,21	30,29	0	35,4	30,2	9,82	75,4	106	24,6	30,7	52,8	71,4	0
Solo + areia	5,68	87,33	0	22,1	15,1	3,32	40,5	128	19,7	11,6	20,1	31,7	0

Fonte: a autora.

Nota: SB= Soma de bases; V= Saturação de bases; m Al= Saturação de Alumínio.

As sementes de feijão-caupi cultivar BRS tumucumaque passaram pelo processo de desinfestação e pré-germinação em ágar-água, devido ao seu baixo índice de germinação, e

posteriormente quatro sementes pré-germinadas foram transplantadas para os vasos. As sementes de feijão comum cultivar BRS FC310 foram semeadas diretamente no solo, sendo quatro sementes por vaso sem o processo de desinfestação. A inoculação ocorreu no sulco de transplântio para as sementes pré-germinadas do feijão-caupi e no sulco de semeadura para o feijão comum, onde foi adicionado 1,0 mL de inóculo (tópico 4.3) padronizado em 10^7 UFC mL⁻¹ ao solo em cada uma das sementes. O desbaste ocorreu 10 dias após a semeadura, deixando ao final uma semente de feijão-caupi e duas sementes de feijão comum em cada vaso. A irrigação ocorreu diariamente, mantendo a umidade do solo entre 70 e 75% da capacidade de campo nos copos.

Completo 40 dias após a inoculação, cinco plantas de feijão-caupi e 10 de feijão comum foram avaliadas quanto: a altura (H), comprimento e volume radicular, massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR); massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR); número de nódulos e massa seca dos nódulos (MSN). Para tal, as plantas foram destacadas dos vasos, expondo o sistema radicular e possibilitando as avaliações das plantas. As raízes foram lavadas em água corrente para avaliação dos parâmetros de nodulação e destinadas à estufa de secagem com circulação e renovação de ar, onde foram mantidas por 48 horas a 60 °C.

4.7.2 Capacidade de Tolerar e Degradar Petróleo em Casa de Vegetação

Para avaliar a capacidade de tolerar petróleo e promover crescimento vegetal das estirpes selecionadas, os isolados foram inoculados em feijão-caupi e comum em solo contaminado por petróleo, em casa de vegetação da UEPG. Os experimentos foram conduzidos em cinco blocos aleatorizados em esquema fatorial 1x2x6 (1- cultivar de feijão; 2- solo com e sem petróleo; 6- cinco estirpes bacterianas inoculadas e um tratamento controle sem inoculação). Os tratamentos inoculados no feijão-comum compreenderam as bactérias dos códigos P7N5, P12N7, P15N4, P27N6 e controle positivo *Rhizobium tropici* PRF 81 (SEMIA 4080) e no feijão caupi as estirpes dos códigos P4N5, P6N10, P15N4 e P27N4, tendo como controle positivo *Bradyrhizobium pachyrrhizi* BR 3262, além dos controles sem inoculação em ambas as espécies.

As plantas foram cultivadas em copos de vidro com capacidade de 190 mL, que foram preenchidos com 150 g de solo de horizonte superficial, características químicas disponíveis na Tabela 4. Para a correção da acidez do solo foram adicionados 176 kg/ha de calcário (PRNT= 75,2%), visando a elevação da saturação por bases para 70%.

No solo foram adicionados e misturados 0,3% (v/m) de petróleo Sigma-Aldrich (aproximadamente 0,5 mL em cada copo). Os copos de vidro preenchidos com solo e petróleo foram acondicionados em casa de vegetação e irrigados, mantendo a umidade do solo entre 70 e 75% da capacidade de campo nos copos. Estes permaneceram na casa de vegetação por 25 dias sem cultivo, para volatilização de compostos e adaptação microbiana (Ismail *et al.*, 2024). O solo recebeu a primeira inoculação sete dias após a adição do petróleo, para tanto, o inoculante foi padronizado em 10^7 UFC mL⁻¹.

Após 15 dias, duas sementes de feijão comum cultivar BRS FC310 e feijão-caupi cultivar BRS tumucumaque previamente desinfestadas (Figueiredo *et al.*, 2008) foram semeadas nos copos de vidro. Cada semente recebeu 1 mL de inoculante padronizado em 10^7 UFC mL⁻¹. A irrigação das plantas ocorreu com alternância de dias, mantendo a umidade do solo entre 70 e 75% da capacidade de campo nos copos. A nutrição foi procedida com aplicação de solução nutritiva de Norris isenta de nitrogênio (Yates *et al.*, 2016) semanalmente, iniciando aos sete dias após a germinação. Aos 4 dias após a germinação foi realizado o desbaste deixando uma planta por copo.

As plantas foram mantidas até completos 30 dias após semeadura, retiradas do solo e avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea, comprimento e volume radicular, massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR); massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR); número de nódulos e massa seca dos nódulos (MSN).

4.7.2.1 Determinação da degradação dos TPH no solo pela técnica de Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Para a análise dos TPH, amostras de solo foram coletadas em cada replicata dos tratamentos. A coleta foi realizada sem o uso de acessórios, uma vez que o solo estava contido em copos de vidro, sendo transferido diretamente para sacos plástico sem contato adicional. As amostras das replicatas foram homogeneizadas e combinadas em proporções iguais para formar uma amostra composta de 150 g para cada tratamento. Após a coleta, foram refrigeradas em temperatura 0-5°C e posteriormente transportadas sob as mesmas condições para o Laboratório Central do Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química, onde foram analisadas por cromatografia gasosa utilizando o método PCR 008, rev. 02, um procedimento interno do instituto.

Para a análise da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), os valores obtidos por GC-MS foram utilizados para calcular a eficiência de biorremediação de acordo com Ismail *et al.* (2024). A taxa de biodegradação (%) foi determinada pela fórmula:

$$\% \text{ biodegradação} = \left(\frac{\text{peso do óleo (controle)} - \text{peso do óleo (degradado)}}{\text{peso do óleo (controle)}} \right) \cdot 100$$

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais obtidos em casa de vegetação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelos testes de Duncan ($p = 0,05$) para comparação entre os tratamentos, usando linguagem R (Versão Windows 4.3.3), e pacote estatísticos ExpDes.pt (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2013). Para os resultados que não apresentaram normalidade, ou seja, nos resultados de nodulação em câmara de cultivo e para os testes bioquímicos de capacidade de promoção de crescimento pela síntese de AIA e solubilização de fosfato foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (Kruskal; Wallis, 1952).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE FABACEA PRESENTES EM ÁREA DE DERRAMAMENTO DE PETROLEO

Bactérias isoladas de nódulos das espécies *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* presentes na Refinaria Presidente Getúlio Vargas- REPAR, cidade de Araucária- PR por Araújo (2021), foram recuperadas do banco do LABMOM/UEPG. Das 78 bactérias originalmente isoladas, apenas 36 (equivalente a 46,15%) bactérias se apresentaram viáveis e sem presença de contaminantes (Tabela 5) quando cultivados em meio YM, após aproximadamente 24 meses em estoque.

5.1.2 Capacidade de Alterar o pH do Meio de Cultura e Coloração

As bactérias recuperadas do estoque microbiológico que se apresentaram viáveis e puras foram testadas quanto à capacidade de alterar o pH do meio de cultura no qual são cultivadas. Das bactérias avaliadas 15 (41,67%) promoveram a alteração do meio para condição alcalina mudando a coloração para azul, outras 16 (44,44%) alteraram para a coloração amarela indicando se tratar de bactérias ácidas e apenas 5 (13,89%) para condição neutra, onde não houve a mudança de coloração inicial do meio (Tabela 5). De fato, algumas bactérias são capazes de alterar o pH do meio ou do solo através da produção de metabólitos secundários, desencadeando reações que acidificam e alcalinizam seus arredores, ajustando seu meio circundante para quase neutralidade como uma forma de sobreviver e se adaptar às condições adversas de pH no solo (Ratzk; Gore, 2018; Msimbira; Smith, 2020; Wang *et al.*, 2024).

O pH é um fator determinante no crescimento, diversidade de espécies e composição da comunidade bacteriana do solo (Zhalnina *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Wan *et al.*, 2020), especialmente quando se trata de ambientes contaminados. Sabendo disso, a avaliação das condições fisiológicas dos isolados em relação à capacidade das reações ácidas e alcalina foi realizada a fim de compreender e associar a capacidade de crescimento, adaptação e resistência desses microrganismos em várias faixas de pH no solo, bem como, suas interações com as plantas, solubilização de fosfato (Marra *et al.*, 2015) e a relação com a tolerância e degradação de petróleo em ambientes contaminados, visto que nessas condições o pH tem um impacto significativo na dinâmica das comunidades de micróbios (Naz *et al.*, 2022).

Os rizóbios capazes de induzir a alcalinidade do meio são dominantes em solos ácidos, enquanto aqueles que produzem ácidos dominam os solos alcalinos, um recurso adaptativo para equilibrar o ambiente externo com suas células (Nakei; Venkataramana; Ndakidemi, 2022). As contaminações por petróleo induzem a alteração de parâmetros físicos e químicos do solo, tendendo à elevação significativa do pH (WANG *et al.*, 2013). No entanto, no presente estudo não houve grandes diferenças no número de isolados acidificantes comparada aos alcalinizantes, em vista das tendências alcalinas do solo contaminado por petróleo no qual estavam submetidos, não foi possível identificar uma relação entre as características dos isolados em alterar o seu meio com as condições nas quais possivelmente se desenvolviam.

A coloração de gram dos isolados foi realizada para a identificação e classificação prévia das estirpes testadas, necessária para a triagem dos isolados e posteriormente para a escolha da metodologia de extração de DNA dos isolados pelo GenElute Bacterial Genomic DNA Kits, que apresenta diferenças entre bactérias gram-positivas e gram-negativas. A coloração de gram revelou que 30 (83,33%) dos isolados testados são Gram-negativos e apenas 6 (16,66%) são bactérias Gram-positivas (Tabela 5). Embora não existam um número grande de trabalhos que tragam uma comparação clara entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas quanto a tolerância, degradação e mecanismos adaptativos de cada um desses grupos, Lăzăroaie (2010) relata que bactérias Gram-negativas foram mais tolerantes à mistura de hidrocarbonetos do que as bactérias Gram-positivas, possivelmente devido a presença de uma membrana externa altamente impermeável desse grupo de bactérias.

5.1.3 Capacidade de Tolerância e Degradação de Hidrocarbonetos do Petróleo

Os resultados da capacidade de crescimento dos isolados bacterianos em meios de cultura acrescido de diferentes concentrações de petróleo foi avaliada e representada na Tabela 5. Observou-se que entre as condições testadas, o meio YM acrescido de 1% de petróleo apresentou ser a melhor fonte de crescimento para os microrganismos. Nessa condição, todos os 36 isolados testados apresentaram crescimento. O meio YM é considerado rico em fontes de nutrientes, possui em sua composição extrato de levedura, que é fonte de carboidratos, proteínas e vitaminas, além do manitol, fonte de carbono que garante melhor crescimento às bactérias (Vincent, 1970; Tao *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2023; Xiao *et al.*, 2024). Isso pode explicar o crescimento de todos os isolados testados nessa condição e a tolerância ao petróleo.

No meio de cultura BH com 1% de petróleo, 32 isolados apresentaram crescimento. Os 4 isolados que apresentaram crescimento apenas em meio YM, se mostraram apenas tolerantes

ao petróleo. Conforme aumentou-se a concentração do petróleo no meio houve a diminuição do crescimento dos isolados. Sendo assim, no meio BH com 2% de petróleo apenas 16 isolados mostraram-se capazes de crescer e no mesmo meio com 5% de petróleo, oito isolados. Das bactérias testadas, as estirpes P6N3, P7N1, P7N4, P12N8, P15N1, P15N3 e P15N4 foram destaque por sua tolerância às concentrações crescentes de petróleo e crescimento em todos os meios de cultura e condições.

A presença de diferentes grupos de isolados nos meios testados evidencia que há variação na capacidade de tolerância ao petróleo, possivelmente associada a características metabólicas específicas de cada bactéria. Esses resultados indicam que a capacidade de crescimento dos isolados bacterianos é influenciada pela concentração de petróleo no meio de cultura. Além disso, no meio BH, o carbono é um fator limitante para o crescimento dos microrganismo, sendo o petróleo a única fonte de carbono disponibilizada às bactérias. Esse meio é comumente utilizado em experimentos para avaliação de tolerância e degradação, por possibilitar que o carbono consumido para o crescimento seja proveniente da fonte de contaminação a ser estudada (Haleyur *et al.*, 2018; Ra; Zhao; Zheng *et al.*, 2019; Araújo *et al.*, 2020; Filipowicz; Cieśliński, 2020). Sendo assim, quando as estirpes apresentam crescimento nessas condições supõe-se que as mesmas utilizam os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo ajudando a aumentar sua taxa de sobrevivência e crescimento, o que por sua vez torna o processo de biorremediação mais eficaz e autossustentável (Omenna *et al.*, 2023).

A presença de isolados em meios com concentrações mais elevadas de petróleo pode indicar um potencial biotecnológico para aplicações em biorremediação de áreas contaminadas. Os resultados reforçam a importância de selecionar isolados com maior potencial de crescimento e tolerância aos compostos tóxicos do petróleo em ambientes contaminados, especialmente para aplicações em biorremediação.

Tabela 5- Identificação e características dos isolados de *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* L. coletados na propriedade da Refinaria Presidente Getúlio Vargas- REPAR, recuperados do estoque microbiológico do LABMOM/UEPG.

Código do isolado	pH do meio de cultura	Gram	Meio [% de petróleo]*	Ponto de coleta conc. de petróleo (mg/Kg de solo)	Isolamento**
P4N2	B	-	BH [1%]	Ponto 4/ 1.983,60	<i>M. oblonga</i>
P4N5	B	-	BH [2%]		
P4N8	B	+	BH [5%]		
P6N2	B	-	BH [1%]	Ponto 6/ 2.696,66	<i>M. oblonga</i>
P6N3	N	+	BH [5%]		
P6N4	B	-	BH [1%]		
P6N5	B	+	BH [2%]		
P6N8	A	+	BH [2%]		
P6N10	B	-	BH [1%]		
P7N1	B	-	BH [5%]	Ponto 7/ 3.528,90	<i>M. oblonga</i>
P7N2	B	-	BH [1%]		
P7N3	A	+	BH [1%]		
P7N4	N	-	BH [5%]		
P7N5	A	+	BH [2%]		
P12N1	B	-	BH [2%]	Ponto 12/ 644,95	<i>M. oblonga</i>
P12N2	B	-	BH [2%]		
P12N3	A	-	BH [1%]		
P12N7	B	-	BH [1%]		
P12N8	A	-	BH [5%]		
P15N1	B	-	BH [5%]	Ponto 15/ 439,00	<i>M. oblonga</i>
P15N2	B	-	BH [1%]		
P15N3	B	-	BH [5%]		
P15N4	A	-	BH [5%]		
P15N5	N	-	BH [1%]		
P17N1	A	-	YM [1%]	Ponto 17/ 761,59	<i>E. crista-galli</i> L.
P17N3	A	-	YM [1%]		
P17N4	N	-	YM [1%]		
P17N5	A	-	YM [1%]		
P25N5	A	-	BH [1%]	Ponto 25/ 1.352,86	<i>M. oblonga</i>
P27N3	A	-	BH [1%]	Ponto 27/ 1.284,02	<i>M. oblonga</i>
P27N4	N	-	BH [1%]		
P27N5	A	-	BH [2%]		
P27N6	A	-	BH [1%]		
P27N8	A	-	BH [2%]		
P27N9	A	-	BH [1%]		
P27N10	A	-	BH [1%]		

Fonte: a autora.

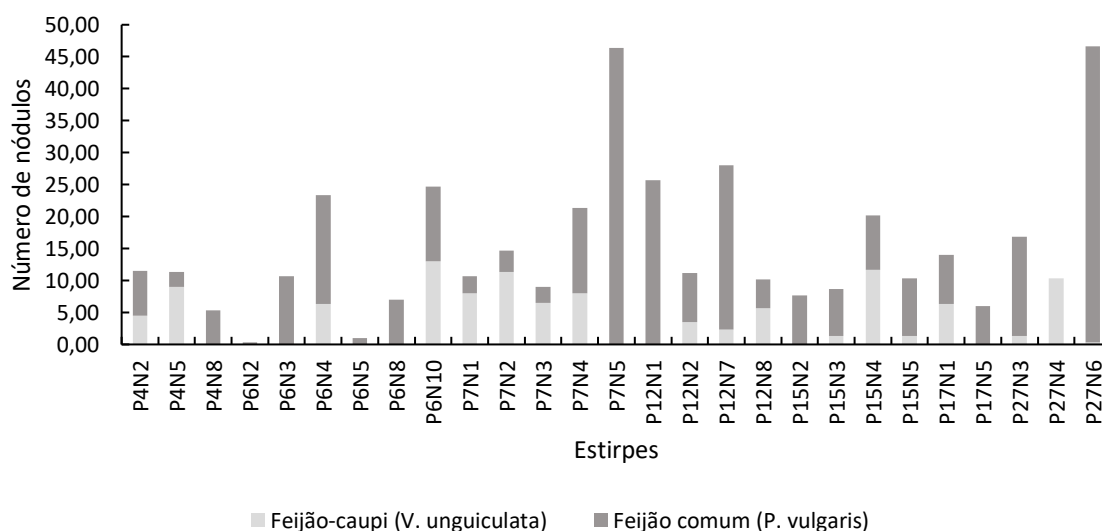
Nota: Isolados destacados com a cor azul indicam nodulação somente em *Phaseolus vulgaris*; Isolados destacados com a cor amarelo indicam nodulação somente em *Vigna unguiculata*; Isolados destacados com a cor verde indicam nodulação em *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*; Isolados sem destaque não apresentaram nodulação nas espécies; A: ácido; B: básico; N: neutro; “+” gram-positivo; “-” gram-negativo. *Condição mais extrema de crescimento. ** Plantas de cujos nódulos foi feito o Isolamento.

5.2 POTENCIAL DE NODULAÇÃO EM FEIJÃO COMUM E FEIJÃO-CAUPI NA AUSÊNCIA DE PETRÓLEO E EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

Com o objetivo de selecionar e analisar a capacidade de interação simbiótica dos isolados, estes foram inoculados nas espécies *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*. Dos 36 isolados inoculados, 29 foram responsivos em pelo menos uma das espécies de feijão (Figura 3). Destes, 19 (52,8%) foram capazes de nodular ambos os feijões, mostrando-se eficazes e pouco específicos na interação com as diferentes espécies (Figura 4).

Estirpes específicas para cada feijão testado foram menos frequentes no estudo. Destas, apenas a estirpe P27N4 nodulou somente em *V. unguiculata* e as estirpes P4N8, P6M2, P6N3, P6N5, P6N8, P7N5 e P12N1 nodularam apenas em *P. vulgaris*. Observou-se ainda, que nove estirpes não promoveram a formação de nódulos em nenhuma das espécies testadas, são elas P12N3, P15N1, P17N3, P17N4, P25N5, P27N5, P27N8, P27N9 e P27N10, sugerindo diferenças na compatibilidade simbiótica e alta especificidade das estirpes para interação e inoculação em plantas diferentes das que foram isoladas. As demais estirpes nodularam em ambas as espécies.

Figura 4- Formação e número de nódulos nas espécies *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* inoculadas com estirpes bacterianas isoladas de nódulos das espécies *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* na área contaminada por petróleo da REPAR.



Fonte: a autora.

Por se tratar de isolados provenientes de outras espécies vegetais, diferentes das testadas no presente estudo, o grande número de isolados compatíveis com ambas as espécies de feijão é de grande interesse, devido à sua ampla interação com leguminosas, destacando seu potencial como inoculantes generalistas. Sendo assim, nessa condição o reconhecimento entre planta e bactéria se mostrou pouco específico. Essa característica ocorre provavelmente devido à um elevado polimorfismo no gene *nod* (Cangioli *et al.*, 2022). Essa especificidade simbiótica é resultante da troca de sinais da planta hospedeira e da bactéria, ativação da expressão de um grupo de genes de nodulação bacteriana (*nod*) levando à síntese do fator Nod (Lyu *et al.*, 2022). Essa indução da expressão do gene *nod* é mediada pelas proteínas NodD, que são adaptadas para reconhecer diferentes flavonóides secretados por diferentes leguminosas, e essa especificidade de reconhecimento define um ponto de verificação da simbiose e consequentemente a formação dos nódulos (Wang; Liu; Zhu, 2018) (Figura 5). Sendo assim, quando não há esse reconhecimento, não há simbiose entre planta e bactéria, assim como observado entre algumas estirpes e as espécies de feijão.

Figura 5- Formação de nódulos radiculares em (A) *Phaseolus vulgaris* inoculado com a estirpe P27N6 e (B) *Vigna unguiculata* inoculado com a estirpe P27N4.



Fonte: a autora.

A análise isolada do comportamento das diferentes estirpes inoculadas nas espécies *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, com relação ao número de nódulos formados, foi avaliada. A inoculação das 36 estirpes revelou diferenças estatísticas significativas em ambas as espécies vegetais, determinadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que utiliza as médias dos

ranks para comparações entre grupos. No entanto, na Tabela 6 as médias reais dos tratamentos foram apresentadas para facilitar a interpretação prática dos resultados.

Na espécie *P. vulgaris* a análise estatística mostrou diferença significativa entre os tratamentos ($H = 88,10$; $gl = 35$; $pp < 0,001$), destacando os isolados P7N5 e P27N6 como os mais eficientes, promovendo a formação do maior número de nódulos entre as estirpes, com a média de 46,33 nódulos para ambos, não se diferenciando estatisticamente entre eles. Seguido pelos tratamentos P12N1 e P12N7, com a média de 25,67 nódulos. Além disso, todas as bactérias que apresentaram melhores resultados de nodulação são isoladas de nódulos de *M. oblonga*. Essa capacidade de isolados de *Mimosa* também formarem nódulos e fixar N_2 em *P. vulgaris* já é relatado em trabalhos de isolamentos, que reforçam o grande potencial biotecnológico das estirpes (Paulitsch *et al.*, 2019; Tapia-García *et al.*, 2020).

A análise das inoculações das estirpes bacterianas na espécie *V. unguiculata* também revelou diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis ($H = 69,94$; $gl = 35$; $pp < 0,0004078$). No feijão-caupi as estirpes que apresentaram maiores médias de nódulos foram as estirpes P6N10, P15N4 e P27N4, com 13; 11,67 e 10,33 respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 6). Dos isolados inoculados em *V. unguiculata*, 18 estirpes (50%) não apresentaram interações simbióticas com a espécie, número maior comparado ao feijão comum, que foi de 10 isolados (27,78%).

Apesar da espécie *V. unguiculata* apresentar maior número de isolados não nodulantes comparado à espécie *P. vulgaris*, o feijão-caupi é conhecido por sua capacidade de se associar com uma gama diversificada de bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo considerada uma planta bastante promíscua e frequentemente usada em trabalhos de isolamento bacteriano (Chidebe; Jaiswal; Dakora, 2018; Sena *et al.*, 2020; Moura *et al.*, 2025), o que é confirmado no presente estudo com a nodulação da metade das bactérias inoculadas. Assim como observado em feijão comum, os isolados promissores na formação de nódulos em feijão-caupi são também isolados de *M. oblonga*. No trabalho publicado por Moura *et al.* (2016), bactérias de solos provenientes de áreas de mineração de carvão foram isoladas, utilizando feijão-caupi como planta isca e posteriormente inoculadas em plantas arbóreas, incluindo espécies do gênero *Mimosa*, que mostraram ser capazes de promover nodulação e fixar N de forma eficiente em simbiose com as espécies testadas. Esse trabalho reforça a capacidade de bactérias interagirem com diferentes espécies e principalmente da possibilidade de bactérias nodularem *V. unguiculata* e *Mimosa* sp..

Tabela 6- Número de nódulos radiculares nas espécies *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* inoculadas com 36 estirpes bacterianas isoladas de nódulos das espécies *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* na área contaminada por petróleo da REPAR.

Isolado bacteriano	Número de nódulos	
	Feijão comum	Feijão-caupi
P4N2	7,00 ± 6,08 cdefg	4,50 ± 2,50 abc
P4N5	2,33 ± 0,58 ghi	9,00 ± 15,59 bcdef
P4N8	5,33 ± 5,03 efgh	0,00 ± 0,00 f
P6N2	0,33 ± 0,58 ij	0,00 ± 0,00 f
P6N3	10,67 ± 6,51 bcdef	0,00 ± 0,00 f
P6N4	17,00 ± 11,79 abcd	6,33 ± 6,03 abcde
P6N5	1,00 ± 1,00 hij	0,00 ± 0,00 f
P6N8	7,00 ± 3,61 cdefg	0,00 ± 0,00 f
P6N10	11,67 ± 3,51 bcde	13,00 ± 3,00 a
P7N1	2,67 ± 1,53 fghi	8,00 ± 4,00 a
P7N2	3,33 ± 4,04 fghi	11,33 ± 19,63 bcdef
P7N3	2,50 ± 0,50 ghi	6,50 ± 6,50 abcde
P7N4	13,33 ± 5,13 abcd	8,00 ± 13,86 bcdef
P7N5	46,33 ± 4,93 a	0,00 ± 0,00 f
P12N1	25,67 ± 4,73 ab	0,00 ± 0,00 f
P12N2	7,67 ± 7,51 defgh	3,50 ± 2,50 abcd
P12N3	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f
P12N7	25,67 ± 4,04 ab	2,33 ± 4,04 cdef
P12N8	4,5 ± 1,50 defgh	5,67 ± 5,69 ab
P15N1	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f
P15N2	7,67 ± 9,07 cdefg	0,00 ± 0,00 f
P15N3	7,33 ± 12,70 ghij	1,33 ± 2,31 def
P15N4	8,50 ± 7,50 cdefg	11,67 ± 9,07 a
P15N5	9,00 ± 7,94 defg	1,33 ± 2,31 def
P17N1	7,67 ± 5,51 cdefg	6,33 ± 10,97 bcdef
P17N3	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f
P17N4	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f
P17N5	6,00 ± 2,00 cdefg	0,00 ± 0,00 f
P25N5	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f
P27N3	15,50 ± 2,50 abc	1,33 ± 2,31 def
P27N4	0,00 ± 0,00 j	10,33 ± 4,93 a
P27N5	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f
P27N6	46,33 ± 13,20 a	0,33 ± 0,58 ef
P27N8	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f
P27N9	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f
P27N10	0,00 ± 0,00 j	0,00 ± 0,00 f

Fonte: a autora.

Nota: Letras diferentes mostram valores significativamente diferentes, conforme avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis. Os valores representam as médias de três plantas, juntamente com seu valor ± DP ($n = 3$).

Com base nos resultados da capacidade de alteração do pH do meio, coloração de gram, tolerância aos diferentes níveis de petróleo nos meios de cultura testados e a simbiose com as espécies de feijão, foi possível realizar a triagem das estirpes mais promissoras na degradação do petróleo e promoção do crescimento vegetal, para as etapas posteriores do trabalho. Para tanto, foram selecionadas as estirpes P4N5, P6N10, P27N4, P15N4, P7N5, P12N7 e P27N6, todas isoladas de nódulos da espécie *M. oblonga* na área da contaminada da REPAR. Destas, as estirpes P4N5, P6N10 e P27N4 e 15N4 foram selecionadas principalmente pela elevada capacidade de induzir formação de nódulos em feijão-caupi, além de incluir isolados capazes de desencadear reações ácidas e alcalinas, gram-positivos e negativos, e tolerantes até 5% de petróleo, como o isolado P15N4, que foi selecionado para os testes em ambas as espécies nos experimentos em casa de vegetação. Os isolados selecionados para o feijão comum foram P7N5, P12N7 e P27N6, que também se destacaram nas nodulações na espécie e se diferenciam nas demais características analisadas.

5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA PELO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA

A partir do sequenciamento da região do gene 16s rRNA os isolados foram identificados a nível de gênero. Os resultados do BLASTn estão apresentados na Tabela 7. As bactérias identificadas pertencem a dois filos principais, a Proteobacteria (=Pseudomonadota) representado pelo gênero *Paraburkholderia* e Firmicutes representado pelo gênero *Bacillus*.

Tabela 7- Identificação dos isolados com base na comparação de sequência de 16 rRNA obtida com dados depositadas no banco de dados GenBank (análise BLASTn).

Isolado bacteriano	Resultado BlastN	Identidade (%)	Número de acesso
P4N5	<i>Paraburkholderia</i> sp.	99,3	MN244870.1
P6N10	<i>Paraburkholderia</i> sp.	97,4	MN244873.1
P7N5	<i>Bacillus</i> sp.	99,9	PQ226718.1
P12N7	<i>Paraburkholderia</i> sp.	99,1	MN244873.1
P15N4	<i>Paraburkholderia</i> sp.	98,8	PQ180213.1
P27N4	<i>Paraburkholderia</i> sp.	100	MK960530.1
P27N6	<i>Paraburkholderia</i> sp.	98,7	PQ180213.1

Fonte: a autora.

Estudos de isolamento e identificação de bactérias noduladoras de *Mimosa* sp. destacam o gênero *Paraburkholderia* e *Bacillus* como frequentes nas espécies (Dall'Agnol *et al.*, 2017; Abdullahi *et al.*, 2020; Tapia-García *et al.*, 2020; Paulitsch *et al.*, 2020) As espécies que

compreendem o gênero *Paraburkholderia* auxiliam na fixação biológica de nitrogênio e contribuem para a saúde do solo ao estabelecer interações simbióticas com plantas do gênero *Mimosa* (Souza *et al.*, 2020). O gênero *Bacillus*, por sua vez, é associado a ambientes diversos, incluindo solos contaminados, no qual muitas espécies possuem potencial para bioremediação de hidrocarbonetos (Elumalai *et al.*, 2019; Menna *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023).

5.4 CAPACIDADE DE PRODUZIR AIA E SOLUBILIZAR FOSFATO

A análise de síntese de ácido indol-3-acético (AIA) pelo método de Salkowski revelou que apenas os isolados *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P27N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 foram capazes de sintetizar o hormônio *in vitro*. Esse resultado sugere que estas estirpes podem induzir alterações morfológicas nas plantas, especialmente no sistema radicular, aumentando o comprimento da raiz e o número de pelos radiculares quando inoculadas, visto que esse hormônio é o mais estudado entre as auxinas por seus benefícios significativos no desenvolvimento radicular lateral e primário da plantas (Zhang *et al.*, 2022; Lobo *et al.*, 2023). A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas na capacidade de síntese de AIA entre as três estirpes ($H = 19,77$; $gl = 6$; $pp = 0,003$). O teste de comparações múltiplas agrupou as estirpes em diferentes grupos como apresentado na Tabela 8, juntamente com as médias originais obtidas na síntese de AIA. Dentre as bactérias positivas para o teste, a estirpe *Paraburkholderia* sp. P27N6 apresentou o melhor resultado na capacidade de síntese do hormônio, seguido de *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P27N4 e *Paraburkholderia* sp. P12N7 com a menor média entre as bactérias testadas.

A capacidade de síntese de AIA pelos isolados provenientes de uma área contaminada por hidrocarbonetos de petróleo é de grande interesse nesse estudo. Isso se deve ao fato da auxina aumentar a taxa de sobrevivência das bactérias frente à situações de estresse ambiental, além de desempenhar um papel importante na quimiotaxia das bactérias, movimento utilizado para que as bactérias alcancem as raízes das plantas (Lobo *et al.*, 2022). O IAA pode proteger as plantas da ação de muitos fatores de estresse que acompanham o estresse oxidativo, uma vez que esse hormônio é conhecido por ser capaz de ativar o sistema antioxidante da planta (Kuzina *et al.*, 2021).

Sabendo disso, o bom desempenho de *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 na formação de nódulos radiculares, especialmente nas condições tóxicas do petróleo, pode estar associado à capacidade de síntese de AIA das estirpes

visto que esse garante maior sobrevivência e proteção às bactérias. Além disso, o AIA é importante em todas as fases do crescimento e desenvolvimento vegetal, atuando no aumento e a divisão celular, na diferenciação dos tecidos, alongamento, tendo efeitos direto no crescimento radicular das plantas (Alemneh *et al.* 2020; Jaiswal *et al.*, 2021; Flores-Duarte *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022; Lobo *et al.*, 2023). Isso também pode explicar o melhor desenvolvimento radicular, nas variáveis CR e VR, em feijão comum e feijão-caupi inoculados com as estirpes *Paraburkholderia* sp. P27N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 produtoras de AIA.

Na análise de solubilização de fosfato, nenhuma estirpe testada mostrou resultados de formação de halos em meio NBRIP sólido acrescido de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Entretanto, quando avaliadas no mesmo meio de cultura e fonte de fosfato em condição líquida, as bactérias *Bacillus* sp. P7N5 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 mostraram-se eficientes na solubilização do fosfato fornecido (Tabela 8). Apesar de ambas mostrarem resultados positivos, as avaliações estatísticas revelaram diferenças significativas entre as estirpes pelo teste de Kruskal-Wallis ($H= 19,84$; $gl= 6$; $pp= 0,003$), com destaque para a *Bacillus* sp. P7N5, com maior solubilização de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

Além disso, as estirpes que mostraram-se eficientes no consumo de fosfato, desencadearam uma reação acidificante no meio de cultura, diferente das demais que tornaram o alcalino. O mesmo resultado foi obtido nos testes com o meio YM acrescido de azul de bromotimol, confirmando a característica acidificante dessas estirpes. A diminuição do pH do meio de cultura também é relatado em experimentos de avaliação de solubilização de fosfato por bactérias, com valores próximos dos obtidos no presente estudo (Collavino *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2022). Essa alteração pode estar atrelada ao mecanismo utilizado pelas estirpes para a dissolução do fósforo. Dentre os vários mecanismos de solubilização de fosfato, a acidificação do meio pela produção de ácidos orgânicos e a liberação de prótons é o principal mecanismo envolvido na solubilização de fosfato (Marra *et al.*, 2015). A fermentação, respiração de compostos orgânicos de carbono ou a oxidação direta são as principais vias metabólicas para a síntese de ácidos orgânicos que resultam em acidificação do meio, liberando fosfatos de complexos pela substituição de prótons por cátions como Fe^{+3} e Al^{+3} , ou pela troca de fosfato (PO_4^{2-}) por ânions ácidos (Rawat *et al.*, 2021).

Tabela 8- Avaliação *in vitro* das atividades promotoras do crescimento vegetal dos isolados bacterianos dos nódulos de *Mimosa oblonga* da área contaminada por petróleo na REPAR, testados quanto a capacidade de produção de ácido indól-3-acético (AIA) e solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de fosfato de cálcio.

Isolado bacteriano	Ácido Indol-3-acético (AIA)	Solubilização de fosfato (P)	
	mg mL ⁻¹	pH do meio	mg L ⁻¹
P4N5	-	8,30	-
P6N10	-	8,33	-
P7N5	24,84 ± 0,60 b	5,72	3,61 ± 0,03 a
P12N7	1,24 ± 0,36 d	8,02	-
P15N4	-	8,31	-
P27N4	23,10 ± 1,06 c	8,19	-
P27N6	149,26 ± 5,56 a	5,83	1,15 ± 0,07 b

Fonte: a autora.

Nota: Letras diferentes nas colunas mostram valores significativamente diferentes, conforme avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis. Os valores representam as médias de três repetições ± DP ($n = 3$).

Dos quatro isolados que apresentaram potencial promotor de crescimento vegetal, três foram identificados como *Paraburkholderia*. O gênero é estudado e conhecido por suas habilidades em produzir auxina e solubilizar fosfato (Dias *et al.*, 2019; Vio *et al.*, 2020; Bellés-Sancho *et al.*, 2023; Chhetri *et al.*, 2023; Oh; Ra; Kim, 2024). Além disso, bactérias *Paraburkholderia* spp. isoladas também de nódulos de *Mimosa* spp. são relatadas em trabalhos como produtoras de AIA e solubilizadoras de fosfato, mostrando resultados promissores na promoção do crescimento e como biofertilizantes (Nascimento; Glick; Rossi, 2019; Souza *et al.*, 2020; Bonatelli *et al.*, 2021; Megu; Paul; Deb, 2024; Nascimento *et al.*, 2024). Além do gênero *Paraburkholderia* identificado no presente estudo como PCV, a bactéria P7N5 identificada como *Bacillus* sp. também apresentou resultados positivos com relação à solubilização de P e síntese de AIA, o que é relatado em isolados de nódulos de *Mimosa* spp. (Abdullahi *et al.*, 2020).

Levando em consideração os dois testes de promoção de crescimento realizados, as estirpes P7N4 e P27N6 se sobressaíram em relação às demais. Estas apresentaram dois mecanismos promotores de crescimento das plantas. É relatado que bactérias que sintetizam AIA, tendem a aumentar também a capacidade de solubilizar fosfato, sugerindo que a produção de AIA na zona radicular da planta pode não apenas melhorar o crescimento radicular na interação planta-micróbio, mas também aumentam a solubilização de P na zona radicular (Alemneh *et al.*, 2021). Esse resultado destaca o uso dessas estirpes como promissoras na promoção de crescimento de plantas.

5.5 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS INOCULADOS EM FEIJÃO

5.5.1 Capacidade de Promoção de Crescimento Vegetal na Ausência de Petróleo em Casa de Vegetação

5.5.1.1 Feijão comum (*P. vulgaris*)

Na avaliação de promoção de crescimento do feijão comum em casa de vegetação, a inoculação das estirpes selecionadas para a espécie vegetal (*Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6) apresentaram diferenças estatísticas significativas na formação de nódulos entre as plantas inoculadas e as plantas sem inoculação em relação ao tratamento sem inoculação com nitrogênio, conforme apresentado na Tabela 9. O número de nódulos, massa fresca (MFN) e massa seca de nódulos (MSN) no tratamento com N foi estatisticamente inferior aos demais tratamentos. Apesar dos tratamentos sem inoculação (controle) e sem inoculação com N mineral não tivessem recebido bactérias, houve formação de nódulos nas plantas, possivelmente colonizados por bactérias presentes no solo, que não passou pelo processo de esterilização, ou provenientes da água da irrigação, sementes não desinfestadas, e ainda, no manuseio de materiais usados no decorrer do experimento (Góes *et al.*, 2015).

O resultado inferior no número de nódulos no tratamento com N comparado ao sem inoculação reforça o efeito inibitório da nodulação pela presença de uma fonte de N disponível (Nanjareddy *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2020). De fato, a presença de N pode reduzir as infecções das bactérias do solo nas raízes das plantas, o número e a massa dos nódulos, além de prejudicar a eficiência na fixação de N pelas bactérias (Zoffoli *et al.*, 2021). Quando há nitrogênio proveniente da adubação prontamente disponível, é provável que a planta use o N do solo diretamente, em vez de investir na fixação simbiótica de nitrogênio, que demanda maior gasto energético à planta (Li; Pan; Yao, 2019; Yermenko *et al.*, 2025). Foi observada também diferença estatística em MFN entre a estirpe *Paraburkholderia* sp. P27N6 em comparação com os demais tratamentos.

Tabela 9- Efeito da inoculação das estirpes *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 no número de nódulos, massa fresca de nódulos (MFN) e massa seca de nódulos (MSN) de plantas da espécie *Phaseolus vulgaris*.

Tratamento	Número de nódulos	MFN	MSN
		----- mg -----	
Sem inoc.	58,70 a	170 a	20 a
Sem inoc. + N	6,20 b	0,00 b	0,00 b
<i>R. tropici</i>	55,56 a	200 a	30 a
P7N5	88,30 a	220 a	30 a
P12N7	82,10 a	190 a	30 a
P15N4	62,00 a	200 a	30 a
P27N6	63,30 a	120 ab	20 a
<i>P > F</i>	0,00	0,03	0,03
CV (%)	47,71	64,09	62,33

Fonte: a autora.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de 10 réplicas biológicas.

Embora tenham apresentado diferenças significativas na formação e massa dos nódulos, não houve diferenças estatísticas significativas nos parâmetros aéreos da planta pelo teste de Duncan (Tabela 10). Os parâmetros incluem massa fresca (MFPA), massa seca (MSPA) e comprimento da parte aérea (CPA) das plantas. Também não houve, diferenças estatísticas das estirpes em relação às plantas sem inoculação, às inoculadas com *R. tropici*, estirpe comercial indicada para inoculação de feijão comum e com o tratamento com nitrogênio fornecido em uréia.

Assim como para os parâmetros aéreos, a inoculação das estirpes selecionadas não mostrou resposta estatisticamente significativa nos parâmetros radiculares em *P. vulgaris* (Tabela 10). Os parâmetros avaliados foram massa fresca (MFR), massa seca (MSR), comprimento (CR) e volume (VR) das raízes. Além de não apresentarem diferenças entre as estirpes não apresentaram também diferenças entre os demais tratamentos sem inoculação e com N mineral.

Tabela 10- Efeito da inoculação das estirpes *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR) e volume da raiz (VR) de plantas da espécie *Phaseolus vulgaris*.

Tratamento	MFPA	MSPA	MFR	MSR	CPA	CR	VR
	----- g -----				-- cm --	--	cm ⁻³
Sem inoc.	5,57	1,43	7,33	0,43	16,23	41,87	9,00
Sem inoc. + N	6,65	1,32	6,94	0,42	17,13	42,48	10,33
<i>R. tropici</i>	4,61	1,19	6,97	0,40	15,03	37,73	9,79
P7N5	5,81	1,36	8,80	0,48	15,76	39,12	9,94
P12N7	5,52	1,29	8,42	0,46	16,27	42,33	10,30
P15N4	6,21	1,49	9,36	0,51	16,39	42,38	9,78
P27N6	5,40	1,24	5,73	0,36	16,41	38,55	9,64
P > F	0,37	0,87	0,27	0,16	0,85	0,94	0,45
CV (%)	23,79	27,85	31,59	19,27	13,60	21,4	10,29

Fonte: a autora.

Nota: Os resultados apresentados representam médias de 10 réplicas biológicas.

5.5.1.2 Feijão-caupi (*V. unguiculata*)

A inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 no feijão-caupi em casa de vegetação mostraram efeitos significativos nos parâmetros comprimento radicular (CR), número de nódulos, massa fresca de nódulos (MFN) e massa seca de nódulos (MSN) no cultivo de feijão-caupi. No CR as estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, P6N10, P15N4, P27N4 e a bactéria *B. pachyrizi* não diferiram significativamente no crescimento radicular, bem como em relação ao sem inoculação (Figura 6 A). Entretanto, todas essas condições apresentaram incrementos radiculares significativamente maiores do que o tratamento com nitrogênio mineral, que resultou no menor crescimento radicular entre os tratamentos.

Esse resultado sugere que a interação entre bactérias, com seus diferentes mecanismos promotores de crescimento, pode ser mais eficiente no desenvolvimento radicular das plantas do que a suplementação mineral no solo. De fato, a suplementação com N mineral pode afetar a taxa de crescimento e a arquitetura radicular (Kiba; Krapp, 2016). Uma maior concentração de N próximo às raízes resulta em uma menor exploração do volume do solo em busca de recursos nitrogenados (McCoy *et al.*, 2018), como pode ser observado nos resultados do presente estudo.

Nos tratamentos inoculados, o maior comprimento da raiz pode estar atrelado à necessidade de exploração do solo em busca de fontes nitrogenadas, a qual não foi disponibilizada no momento do plantio com o objetivo das plantas priorizarem as interações

com as bactérias. Quando há déficit de nitrogênio no solo, as plantas apresentam maior alongamento radicular, com crescimento lateral e axial das raízes na busca por recursos (Xiong *et al.*, 2021), especialmente nos primeiros dias do seu desenvolvimento quando ainda não há interações do feijão com as bactéria fixadoras de N. Esse alongamento radicular além de aumentar a aquisição de recursos, também proporciona melhores interações da planta com os microrganismos do solo (Baudson *et al.*, 2023).

Com relação ao número de nódulos, conforme apresentado na figura 6 B, a estirpe *Paraburkholderia* sp. P27N4 e *Paraburkholderia* sp. P15N4 apresentaram as maiores médias de nodulação, estatisticamente semelhante à *B. pachyrhizi*, mas significativamente superior ao tratamento sem inoculação e ao tratamento com N, que apresentaram os menores valores. Esses resultados indicam que algumas estirpes testadas foram tão eficientes quanto *B. pachyrhizi* na nodulação do feijão-caupi, estirpe indicada e usualmente utilizada para a inoculação na espécie vegetal (Santos *et al.*, 2024). A estirpe *Paraburkholderia* sp. P6N10 resultou em um número intermediário de nódulos, com resultado estatisticamente semelhantes às plantas sem inoculação e as demais estirpes testadas. A estirpe *Paraburkholderia* sp. P4N5, obteve a média de nódulos mais baixa entre as estirpes inoculadas.

As plantas que apresentaram maior número de nódulos foram aquelas que também apresentaram maior comprimento radicular. Conforme Herms *et al.* (2022), raízes mais desenvolvidas e maiores possuem uma área superficial maior disponível para colonização bacteriana. Sabendo disso, é possível que o maior número de nódulos seja também relacionado ao melhor desenvolvimento radicular das plantas.

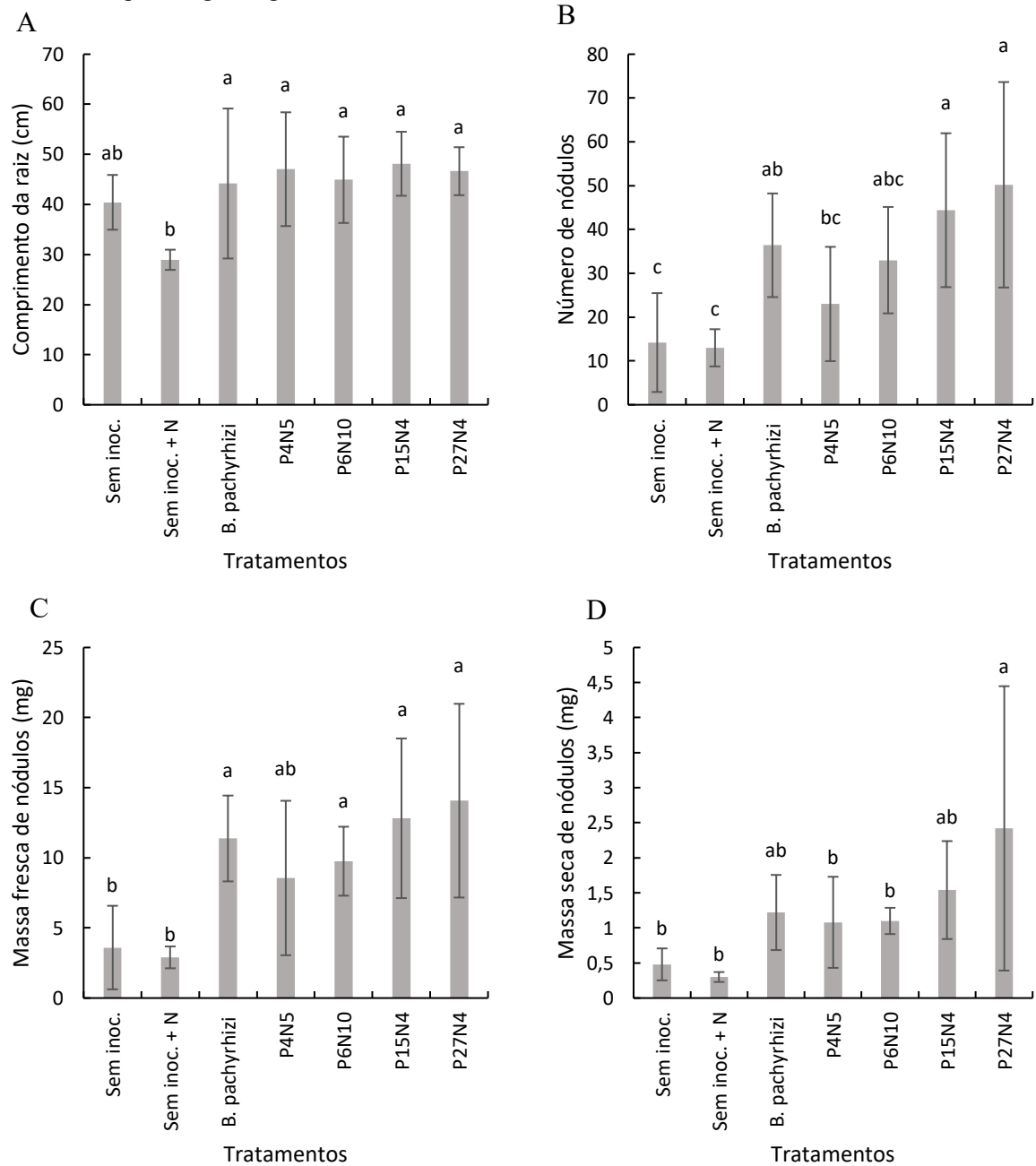
Os resultados de MFN mostraram que as plantas inoculadas com as estirpes *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 e *B. pachyrhizi* apresentaram valores significativamente superiores ao tratamento sem inoculação e ao tratamento com N (Figura 6 C). A estirpe P4N5 embora tenha apresentado média elevada como os demais tratamentos inoculados, não diferiu estatisticamente dos tratamentos sem inoculação e sem inoculação com N. O tratamento sem inoculação, bem como, as plantas suplementadas com N mineral apresentaram as menores médias de massa fresca de nódulos, não diferindo entre si. A significância dos resultados revela que as estirpes testadas foram eficazes na formação de biomassa nodular, sendo comparáveis ao inoculante comercial.

A análise estatística dos resultados de MSN revelou que a estirpe *Paraburkholderia* sp. P27N4 se destacou entre as médias obtidas (Figura 6 D). Ainda que apresentem resultados estatisticamente semelhantes à *Paraburkholderia* sp. P27N4 que obteve a maior média, as bactérias *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *B. pachyrhizi* também não diferiram estatisticamente

das plantas inoculadas com as bactérias *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, bem como as plantas sem inoculação e sem inoculação suplementadas com N mineral. As bactérias *Paraburkholderia* sp. estirpes P4N5 e P6N10 tiveram valores estatisticamente semelhantes ao tratamento sem inoculação e ao tratamento com N. Esses resultados indicam que a estirpe *Paraburkholderia* sp. P27N4 teve um desempenho superior na promoção da biomassa nodular. A massa dos nódulos é um parâmetro importante nas avaliações com bactérias fixadoras de nitrogênio, visto que nódulos com maior massa demonstraram ter uma proporção maior de tecido fixador de nitrogênio em relação ao volume total do nódulo do que nódulos menores, isso consequentemente fornece nitrogênio de forma mais eficiente para a planta hospedeira (Nett; Bender; Peters, 2022), o que traz vantagens significativas às estirpes inoculadas.

Embora tenham apresentado resultados significativos nos parâmetros CR e nodulação, não houve diferenças estatísticas significativas em nenhum dos parâmetros biométricos aéreos avaliados pelo teste de Duncan (Tabela 11). Os tratamentos inoculados também não diferenciaram estatisticamente nos parâmetros radiculares MFR, MSR e VR (Tabela 11). Além das estirpes não apresentarem diferenças significativas entre elas, também não apresentaram diferenças entre as plantas sem inoculação, as inoculadas com *B. pachyrhizi*, estirpe recomendada comercialmente para o cultivo de feijão-caupi, e o tratamento com incremento de nitrogênio em forma de uréia.

Figura 6- Efeito da inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 no (A) comprimento da raiz (MFR), (B) número de nódulos, (C) massa fresca de nódulos (MFN) e (D) massa seca de nódulos (MSN) de plantas da espécie *Vigna unguiculata*.



Fonte: a autora.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de cinco réplicas biológicas.

Tabela 11- Efeito da inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA) e volume da raiz (VR) de plantas da espécie *Vigna unguiculata*.

Tratamentos	MFPA	MSPA	MFR	MSR	CPA	VR
	-----	g	-----		cm	cm ³
Sem inoc.	4,96	0,83	4,85	0,20	22,00	5,00
Sem inoc. + N	6,18	0,90	5,00	0,18	21,35	5,50
<i>B. pachyrhizi</i>	5,72	0,85	3,86	0,27	23,28	4,20
P4N5	5,40	0,71	4,51	0,17	19,66	5,00
P6N10	5,47	0,78	4,64	0,16	20,66	4,80
P15N4	7,76	1,14	5,12	0,20	23,12	6,00
P27N4	6,44	0,93	4,14	0,20	26,80	5,20
P > F	0,16	0,30	0,84	0,15	0,41	0,70
CV (%)	28,64	30,28	33,59	28,89	9,1	30,97

Fonte: a autora.

Nota: Os resultados apresentados representam médias de cinco réplicas biológicas.

Embora os diferentes isolados testados tenham apresentado resultados significativos especialmente em relação à nodulação em *V. unguiculata* e também *P. vulgaris* (dados apresentados no tópico 5.5.1.1), estes não foram evidentes, implicando na necessidade de testar novos métodos e condições de cultivo para as plantas e bactérias. Sendo assim, estas foram inoculadas em solo contaminado com petróleo. Neste, foi avaliado o comportamento das estirpes frente ao estresse causado pelo petróleo no solo, bem como suas características promotoras de crescimento.

5.5.2 Capacidade dos Isolados Inoculados em Casa de Vegetação em Tolerar e Degradar Hidrocarbonetos do Petróleo

5.5.2.1 Feijão comum (*P. vulgaris*)

O experimento conduzido em casa de vegetação com feijão comum inoculado com as estirpes bacterianas *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 com o objetivo de avaliar a capacidade de promoção de crescimento vegetal, tolerância e degradação de petróleo nos diferentes tratamentos não apresentou diferenças estatísticas nos parâmetros MFPA e MSPA em relação aos tratamentos inoculados e às condições com e sem petróleo no solo (Tabela 12). Por outro lado, o CPA foi significativamente reduzido na presença de 0,3% de petróleo no solo, enquanto as plantas

cultivadas sem petróleo apresentaram um CPA médio superior. No entanto, a inoculação bacteriana não influenciou significativamente esse parâmetro (Tabela 12).

Com relação ao desenvolvimento radicular das plantas, os parâmetros MFR e o CR não foram significativamente influenciados pelos fatores testados. Por outro lado, a MSR e o VR apresentaram diferenças significativas nas condições do solo e inoculação, respectivamente. A MSR foi significativamente maior na presença de 0,3% de petróleo no solo. Esse resultado se destaca, visto que o petróleo é tóxico e comumente limita o desenvolvimento radicular das plantas (Alotaibi; Arnaud; Hijri, 2022). Embora incomum, resultados semelhantes foram obtidos por Langer *et al.* (2010), em estudos envolvendo a avaliação do crescimento radicular e morfologia da raiz de *P. vulgaris* em condições de contaminação por petróleo bruto. No trabalho, os autores atribuíram a maior biomassa seca das raízes ao estresse do petróleo causado por toxicidade e déficit hídrico, visto que o petróleo afeta a disponibilidade de água. Para amenizar esse estresse, a planta aumenta a demanda por carbono para as raízes que fica alocado nessa região da planta, estimulando o aumento do crescimento e da biomassa das raízes. Ainda, a MSR não apresentou diferenças entre as inoculações. Esse resultado mostra que os efeitos da contaminação e da inoculação ocorreram de forma independentes.

Por sua vez, o VR foi significativamente influenciado pela inoculação bacteriana, evidenciando que algumas estirpes favoreceram o crescimento radicular, mesmo nas condições tóxicas do petróleo (Tabela 12). Entre os tratamentos, as plantas inoculadas com *Paraburkholderia* sp. P15N4 apresentaram os maiores valores de VR, seguido da estirpe *Paraburkholderia* sp. P27N6, que se diferenciam estatisticamente do tratamento sem inoculação, sugerindo que essas estirpes podem ter contribuído para um melhor desenvolvimento do sistema radicular do feijão comum. Esse resultado pode estar atrelado à uma resposta dos possíveis mecanismos promotores de crescimento vegetal desempenhados pelas bactérias, visto que o gênero *Paraburkholderia* já é conhecido e estudado por sua capacidade de fixar nitrogênio, sintetizar AIA e solubilizar fosfato, promissor para a inoculação e crescimento das plantas (Zhao *et al.*, 2021; Solanki; Gurjar; Sharma, 2023; Rojas-Rojas *et al.*, 2025). No entanto, a interação entre inoculação e o fator petróleo não foi significativa no VR.

Com relação à formação de nódulos no feijão comum, houve diferenças estatísticas entre as estirpes inoculadas. A bactéria *Paraburkholderia* sp. P12N7 apresentou a maior média de número de nódulos, estatisticamente superior aos demais tratamentos, exceto pela estirpe *Bacillus* sp. P7N5 que também apresentou resultado estatisticamente maior que as plantas sem inoculação, mas igual aos tratamentos com *R. tropici*, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e P27N6

(Tabela 12). Além disso, a presença do petróleo no solo não teve influência na formação dos nódulos nas plantas.

Tabela 12- Efeito da inoculação das estirpes *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 na massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), volume da raiz (VR) e número de nódulos de plantas da espécie *Phaseolus vulgaris* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.

Tratamento	MFPA	MSPA	MFR	MSR	CPA	CR	VR	Número de nódulos
	-----	-----	g	-----	-- cm	--	cm ³	
Inoculação (F1)								
Sem inoc.	4,68	4,68	6,88	0,57	14,84	20,86	5,10 c	10,20 c
<i>R. tropici</i>	4,37	4,37	7,27	0,57	14,81	23,00	6,20 abc	42,23 bc
P7N5	4,20	4,20	6,22	0,61	13,93	22,03	5,40 bc	59,30 ab
P12N7	4,30	4,30	7,38	0,62	14,64	24,34	6,50 abc	79,68 a
P15N4	4,48	4,48	7,49	0,62	13,98	24,50	6,95 a	38,40 bc
P27N6	4,45	4,45	7,08	0,59	14,14	23,52	6,80 ab	43,00 bc
Petróleo (F2)								
Sem petróleo	4,35	4,35	7,27	0,54 b	17,34 a	22,03	6,45	44,91
Com petróleo	4,48	4,48	6,84	0,64 a	11,44 b	24,06	5,87	46,03
P > F								
Inoculação (F1)	0,39	0,34	0,06	0,68	0,92	0,64	0,03	0,01
Petróleo (F2)	0,71	0,98	0,09	0,00	0,00	0,15	0,12	0,91
F1 x F2	0,49	0,21	0,55	0,54	0,81	0,78	0,22	0,23
CV (%)	15,46	16,91	13,52	14,54	17,13	23,20	23,40	82,02

Fonte: a autora.

Nota: Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de cinco réplicas biológicas.

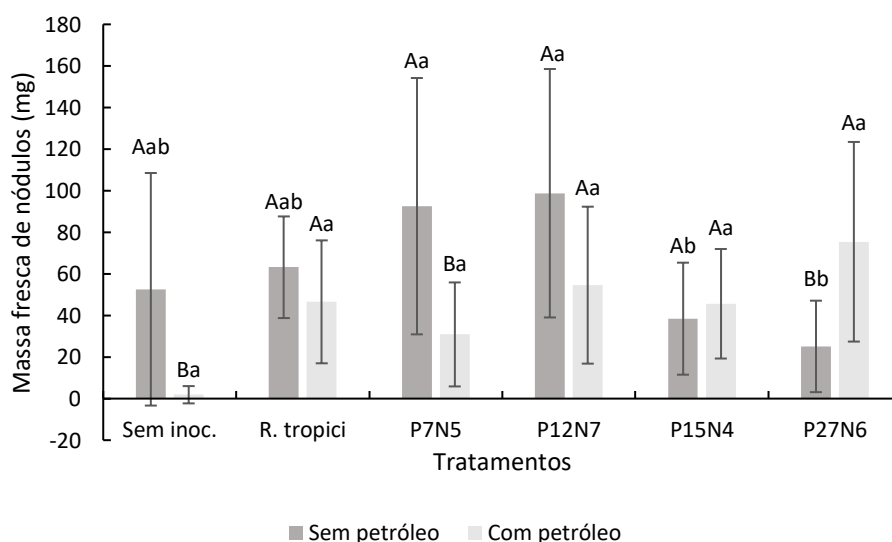
Nos parâmetros MFN e MSN houve desdobramento dos fatores. Na MFN houve diferenças significativas entre os tratamentos inoculados na condição sem petróleo, no qual as estirpes *Paraburkholderia* sp. P12N7 e *Bacillus* sp. P7N5 obtiveram as maiores médias entre os tratamentos inoculados, estatisticamente superiores às inoculações com *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6, mas sem diferenças estatísticas com os tratamentos *R. tropici* e sem inoculação (Figura 7). Nos tratamentos inoculados com *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P27N6 e no tratamento sem inoculação a condição do solo teve influência na MFN. O petróleo afetou negativamente o incremento de massa nos nódulos das plantas inoculadas com *Bacillus* sp. P7N5 e sem inoculação, mas não afetou a massa dos nódulos no tratamento com *Paraburkholderia* sp. P27N6, que foi estatisticamente maior nessa condição.

No parâmetro MSN a diferença estatística entre os tratamentos inoculados ocorreu no solo com 0,3% de petróleo (Figura 8). Nessa condição se destacaram as inoculações com as

estirpes *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P27N6 e *R. tropici* com as maiores médias e estatisticamente superiores às plantas sem inoculação, indicando a tolerância das bactérias ao petróleo e a capacidade de nodulação mesmo em condições de estresse para a planta e para os microrganismos. Além dessas diferenças, a estirpe *Paraburkholderia* sp. P27N6 apresentou resultados significativamente diferentes nas duas condições de solo, se destacando na condição com 0,3% de petróleo.

O uso de bactérias na remediação de compostos tóxicos surge com uma alternativa sustentável e econômica (Wu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022). Isso se deve ao fato de que alguns microrganismos desenvolveram adaptações tornando-se capazes de usar moléculas provenientes da contaminação, diminuindo consequentemente a toxicidade do ambiente e proporcionando condições favoráveis para a sua sobrevivência no meio, utilizando os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de energia (Ismail; Kasmuri; Hamzah, 2022; Ismail; Kasmuri; Hamzah, 2022). As bactérias promotoras de crescimento vegetal, por sua vez, são aliadas das plantas no processo de remediação, garantindo melhores condições de sobrevivência para ambas (Saeed *et al.*, 2021b; Graj *et al.*, 2023; Ali *et al.*, 2023). Os resultados positivos das estirpes na presença de petróleo, especialmente da *Paraburkholderia* sp. P27N6, revelam a estirpe como possível tolerante ou degradadora dos TPH presentes no solo e ainda promotora de crescimento. O gênero *Paraburkholderia* já é estudado e mostra resultados promissores na degradação de hidrocarbonetos e promoção de crescimento quando inoculada na espécie leguminosa *Medicago sativa*, também da família Fabaceae (Eze *et al.*, 2022a; Eze *et al.*, 2022b).

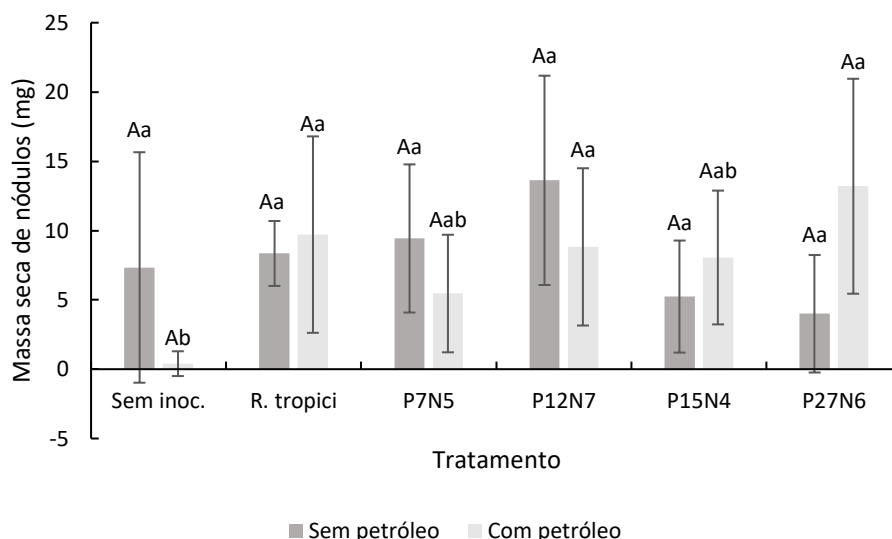
Figura 7- Efeito da inoculação das estirpes *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 na massa fresca de nódulos (MFN) de plantas da espécie *Phaseolus vulgaris* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.



Fonte: a autora.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre as inoculações/estirpes representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes entre as condições do solo sem e com 0,3% de petróleo da mesma inoculação representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de cinco réplicas biológicas.

Figura 8- Efeito da inoculação das estirpes *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 na massa seca de nódulos (MSN) de plantas da espécie *Phaseolus vulgaris* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.



Fonte: a autora.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre as inoculações/estirpes representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes entre as condições do solo sem e com 0,3% de petróleo da mesma inoculação representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de 5 réplicas biológicas.

Esses resultados positivos na massa dos nódulos nas plantas inoculadas sugerem vantagens consideráveis para as bactérias como biorremediadoras e promotoras de crescimento vegetal, visto que mesmo em condições desfavoráveis apresentaram capacidade de desenvolver nódulos maiores. Segundo Alotaibi; Arnaud e Hijri (2022), essa capacidade de fixar nitrogênio proporciona uma vantagem seletiva para bactérias degradadoras de hidrocarbonetos usadas em conjunto com a fitorremediação, isso devido à falta de nutrientes suficientes, especialmente N em solos contaminados com TPH, que se torna um fator limitante para a biodegradação e crescimento das plantas. Sendo assim, selecionar bactérias que apresentem tal capacidade é o sucesso para a degradação eficiente e sustentável em solos contaminados com petróleo.

A concentração dos TPH no solo após o cultivo de *P. vulgaris* e do processo de biorremediação foi detectada pelo método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Segundo Xiang; Morgan; Watt (1995), a técnica separa compostos voláteis por volatilidade e interação com a coluna cromatográfica, identificando e quantificando-os pela detecção de íons característicos, dessa forma, o método permite a análise

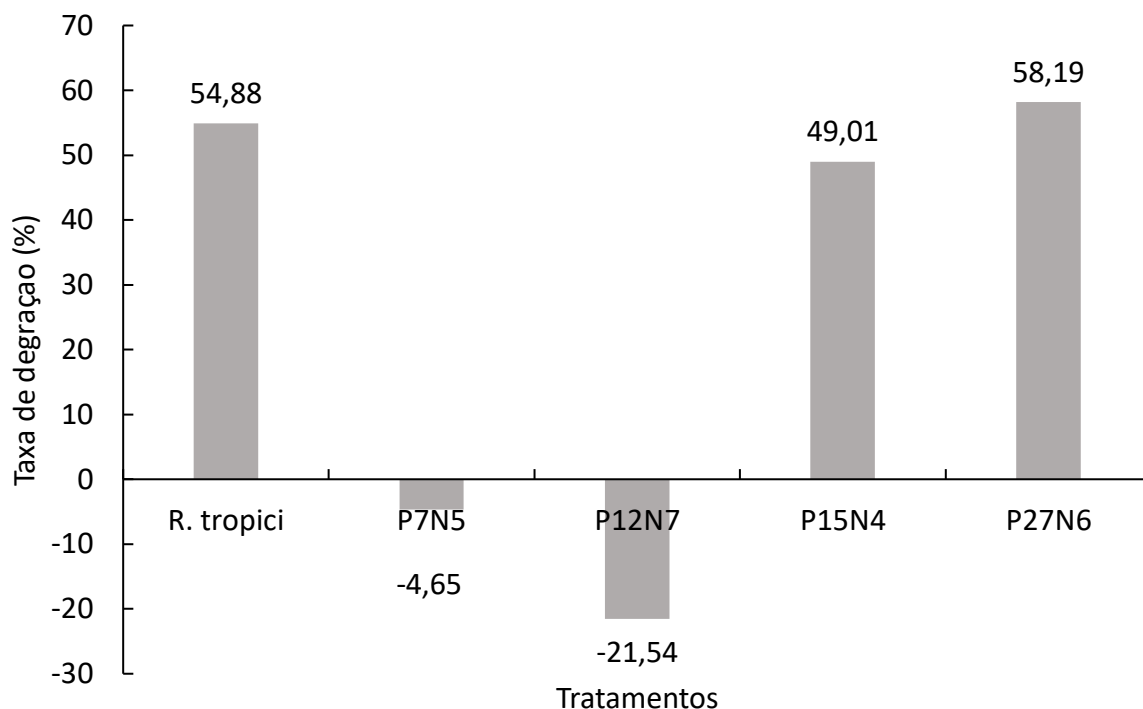
sensível e precisa de hidrocarbonetos em solos contaminados. Nesse método, as cadeias carbônicas C9-C40 representam hidrocarbonetos de petróleo, variando em tamanho e estrutura a depender do número de átomos de carbono presentes, o que influencia na volatilidade e persistência desses compostos no meio (Uyizeye; Thiet; Knorr, 2019). Em solos contaminados por hidrocarbonetos, são analisadas para avaliar a contaminação e a eficácia da remediação.

Ao avaliar a taxa de degradação do contaminante em cada tratamento, o resultado revelou que a inoculação da bactéria *Paraburkholderia* sp. P27N6 no solo contaminado apresentou a maior taxa de degradação entre os tratamentos, seguido pelo tratamento com *R. tropici* e *Paraburkholderia* sp. P15N4 (Figura 9). Os resultados positivos das bactérias *Paraburkholderia* sp. P27N6 e P15N4 na contaminação do solo corroboram com os resultados positivos no teste *in vitro*, que mostram as estirpes como degradadoras de petróleo e tolerantes as concentrações de 1% e 5% de petróleo, respectivamente (Tabela 5).

O gênero *Paraburkholderia* tem se mostrado eficaz em trabalhos de degradação de hidrocarbonetos e de derivados do petróleo (Cui *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2021; Vanwijnsberghe *et al.*, 2021; Ramírez *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2024). Estes trabalhos buscam compreender quais são os mecanismos de degradação e adaptações do gênero aos contaminantes. No estudo publicado por Lee; Lee; Jeon (2019), no qual realizaram o isolamento de bactérias em solo contaminado com hidrocarbonetos alifáticos curtos, destacam uma estirpe bacteriana do gênero *Paraburkholderia* como promissora na degradação do contaminante, sugerindo que sua capacidade de biodegradação pode ter sido adquirida por meio de: (I) ganho de plasmídeo, (II) transferência horizontal de genes (III) e/ou alterações genéticas sob as condições de solo contaminado, resultando em maior aptidão ecológica.

No entanto, os tratamentos com *Bacillus* sp. P7N5 e *Paraburkholderia* sp. P12N7 embora tenham apresentado resultados satisfatórios na nodulação do feijão comum, resultaram em taxas de degradação negativas entre os tratamentos. Esse resultado sugere que esses microrganismos podem ter menor capacidade de degradar os hidrocarboneto, mais ainda assim, apresentam elevada tolerância às condições tóxicas do petróleo, em vista do seu crescimento nos testes *in vitro* e às condições em que estavam submetidos na REPAR.

Figura 9- Taxa de degradação e recuperação do petróleo no solo após remediação mediada pelas estirpes *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 inoculadas na espécie *Phaseolus vulgaris*.



Fonte: a autora.

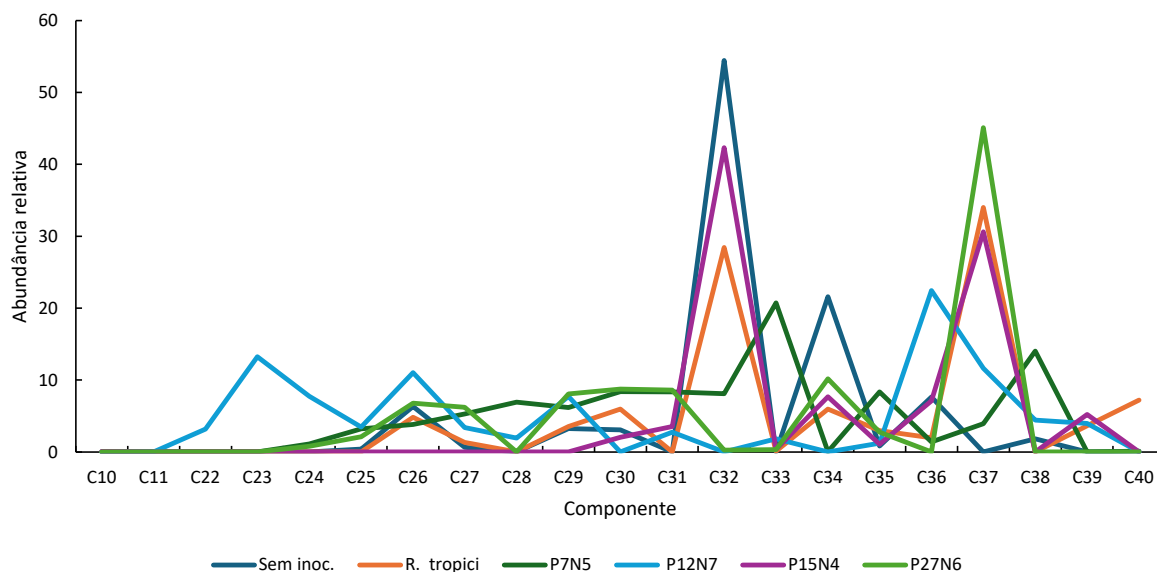
A extensão da biodegradação das frações de hidrocarbonetos saturados no feijão comum foi determinada, e os resultados são apresentados no cromatograma (Figura 10). Um total de 21 compostos foram detectados nas amostras de solo, variando de C10 a C40. Os valores do gráfico representam a concentração dos diferentes hidrocarbonetos analisados após o processo de biorremediação, sendo que picos mais baixos indicam uma menor presença desses compostos na amostra. Na avaliação da degradação microbiana, os n-alcenos (alcenos lineares) têm sido frequentemente referidos como de cadeia curta (C1 para C4), de cadeia média (C5 para C9), de cadeia longa (C10 para C17) e n-alcenos de cadeia muito longa (mais de C18), de acordo com o comprimento de sua cadeia carbônica linear (Matsui *et al.*, 2014).

No cromatograma é possível perceber que os maiores picos foram obtidos nos componentes C32 e C37, que ocorreram nos tratamentos sem inoculação e *Paraburkholderia* sp. P27N6, respectivamente. A maior abundância relativa no tratamento com a bactéria *Paraburkholderia* sp. P15N4, embora tenha sido também em C32 e C37, ficou abaixo do tratamento sem inoculação no C34 e abaixo do tratamento com *Paraburkholderia* sp. P27N6 e *R. tropici* em C37. Ainda, no tratamento com *Bacillus* sp. P7N5, o componente com maior

abundância relativa foi em C33, seguido de C38. No tratamento com *Paraburkholderia* sp. P12N7 os maiores picos foram obtidos em C23 e C36.

De forma geral, a inoculação bacteriana apresentou uma redução na abundância relativa de diversos compostos, demonstrando que os isolados testados possuem potencial degradador de hidrocarbonetos. Além disso, no cromatograma há uma concentração de picos acentuados nos componentes com n-alcanos de cadeia muito longa (C32-C37). Isso ocorre com uma grande diversidade de bactérias degradadoras de petróleo, que podem usar parcialmente n-alcanos de cadeia média ou longa mas poucas são conhecidas por terem a capacidade de biodegradar uma ampla gama de n-alcanos, particularmente n-alcanos de cadeia muito longa (Liu *et al.*, 2020).

Figura 10- Extensão da biodegradação de hidrocarbonetos no solo após inoculação das estirpes *Bacillus* sp. P7N5, *Paraburkholderia* sp. P12N7, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N6 na espécie *Phaseolus vulgaris*.



Fonte: a autora.

5.5.2.2 Feijão-caupi (*V. unguiculata*)

Os resultados obtidos na avaliação do desenvolvimento aéreo do feijão-caupi sob diferentes condições de inoculação bacteriana e presença de petróleo no solo revelou que, a MSPA do feijão-caupi foi significativamente influenciada pela inoculação, enquanto a presença de petróleo no solo não teve efeito significativo sobre esse parâmetro (Tabela 13). A avaliação estatística indica que a inoculação pode variar dependendo da estirpe utilizada, com algumas promovendo melhor desenvolvimento de MSPA e outras não demonstrando efeitos positivos no peso da parte aérea, visto que, as plantas sem inoculação apresentaram médias estatisticamente semelhantes às plantas inoculadas com as bactérias *Paraburkholderia* sp.

estirpes P15N4, P27N4 e *B. pachyrhizi* e superiores às bactérias *Paraburkholderia* sp. estirpes P4N5 e P6N10. Por outro lado, com relação ao desenvolvimento radicular, o parâmetro VR não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, sugerindo que a inoculação bacteriana e a presença de petróleo não afetaram significativamente esse parâmetro no feijão-caupi (Tabela 13).

Com relação à formação de nódulos na espécie, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos na avaliação do número de nódulos e MFN, sugerindo que a inoculação bacteriana e a presença de petróleo não tiveram influência nesses parâmetros. A inoculação também não induziu diferenças no incremento de MSN nas plantas (Tabela 13). Contudo, na condição com 0,3% de petróleo houve redução significativa na MSN.

Tabela 13- Efeito da inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 na massa seca da parte aérea (MSPA), volume da raiz (VR), número de nódulos, massa fresca de nódulos (MFN) e massa seca de nódulos (MSN) de plantas da espécie *Vigna unguiculata* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.

Tratamento	MSPA g	VR cm ³	Número de nódulos	MFN ----- mg -----	MSN
Inoculação (F1)					
Sem inoc.	1,20 a	1,75	12,33	10,00	3,10
<i>B. pachyrhizi</i>	0,82 abc	1,50	24,00	3,30	0,93
P4N5	0,73 bc	1,08	15,67	7,20	1,80
P6N10	0,55 c	1,67	14,17	10,00	2,20
P15N4	0,97 abc	1,67	20,17	9,00	3,80
P27N4	1,04 ab	1,50	27,08	14,00	2,20
Petróleo (F2)					
Sem petróleo	0,88	1,47	19,89	10,00	3,40 a
Com petróleo	0,90	1,58	17,91	7,80	1,30 b
P > F					
Inoculação (F1)	0,05	0,32	0,74	0,71	0,63
Petróleo (F2)	0,84	0,53	0,76	0,53	0,04
F1 x F2	0,09	0,35	0,37	0,24	0,54
CV (%)	39,70	34,38	103,06	125,32	124,25

Fonte: a autora.

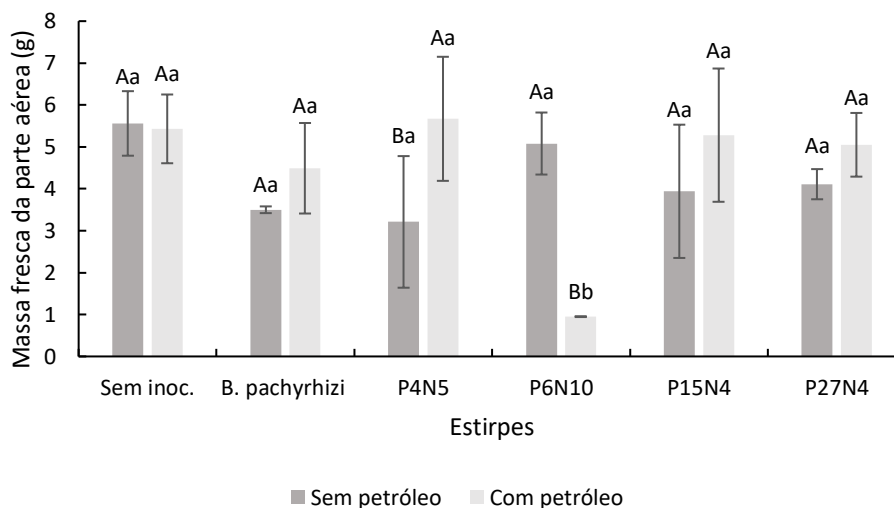
Nota: Os resultados são médias de três plantas. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

A MFPA do feijão-caupi, diferente dos parâmetros anteriormente apresentados, mostrou desdobramento dos fatores, sendo influenciada tanto pela inoculação das estirpes bacterianas quanto pela presença de petróleo no solo (Figura 11). O tratamento sem inoculação e a maioria das estirpes não apresentaram diferenças significativas entre as condições com e sem petróleo,

sugerindo que o peso da parte aérea foi relativamente estável mesmo na presença do contaminante, exceto nos tratamentos com as bactérias *Paraburkholderia* sp. estirpes P4N5 e P6N10. A estirpe *Paraburkholderia* sp. P4N5 apresentou um aumento significativo na MFPA em solo contaminado, enquanto em solo sem petróleo o incremento em massa foi inferior, sugerindo que essa bactéria pode ter contribuído para a adaptação da planta ao estresse ambiental, potencialmente por mecanismos de promoção do crescimento ou mitigação da toxicidade dos hidrocarbonetos. Contudo, a estirpe *Paraburkholderia* sp. P6N10 demonstrou o efeito oposto, com uma redução expressiva na MFPA na condição contaminada, sugerindo uma possível sensibilidade ao estresse causado pelo petróleo ao qual foi submetida no presente estudo.

Na condição com 0,3% de petróleo no solo foi possível observar a diferença entre os tratamentos inoculados. A bactéria *Paraburkholderia* sp. P6N10 apresentou a menor média em incremento de MFPA entre todos os tratamentos. Os demais não apresentaram diferenças significativas, mesmo em relação ao tratamento sem inoculação.

Figura 11- Efeito da inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 na massa fresca da parte aérea (MFPA) de plantas da espécie *Vigna unguiculata* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.



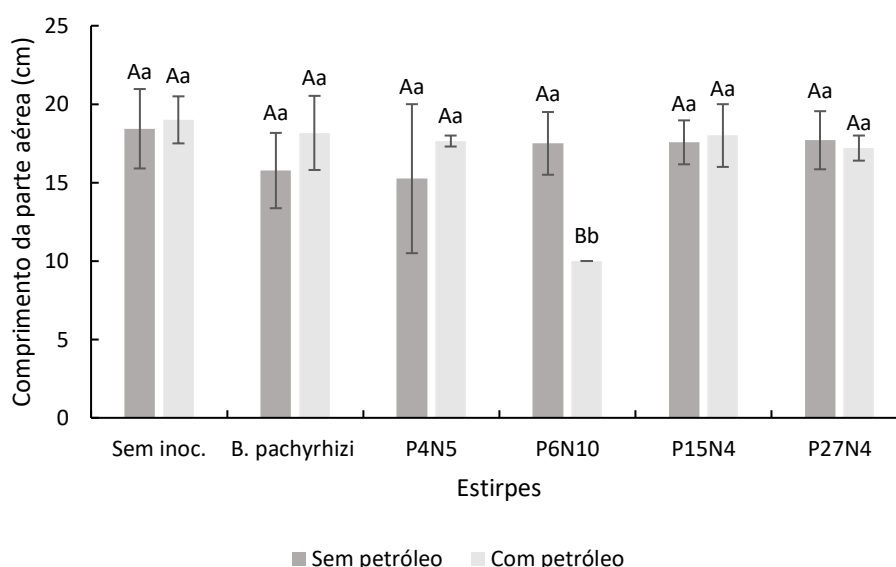
Fonte: a autora.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre as inoculações/estirpes representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes entre as condições do solo sem e com 0,3% de petróleo da mesma inoculação representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de 3 réplicas biológicas.

No parâmetro CPA também houve desdobramento, indicando influência dos dois fatores no crescimento em altura aérea do feijão-caupi (Figura 12). De maneira geral, a maioria das estirpes e o tratamento sem inoculação não apresentaram diferenças significativas entre as

condições com e sem petróleo, indicando uma relativa estabilidade no crescimento da planta mesmo na presença do contaminante. No entanto, um efeito significativo foi observado na estirpe *Paraburkholderia* sp. P6N10, que apresentou uma redução expressiva do CPA em solo contaminado. Além disso, a comparação entre as inoculações na condição do solo contaminado com 0,3% de petróleo mostra uma redução expressiva nas plantas inoculadas com *Paraburkholderia* sp. P6N10 em solo contaminado. As demais não apresentaram diferenças estatísticas nessa condição de solo.

Figura 12- Efeito da inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 no comprimento da parte aérea (CPA) de plantas da espécie *Vigna unguiculata* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.



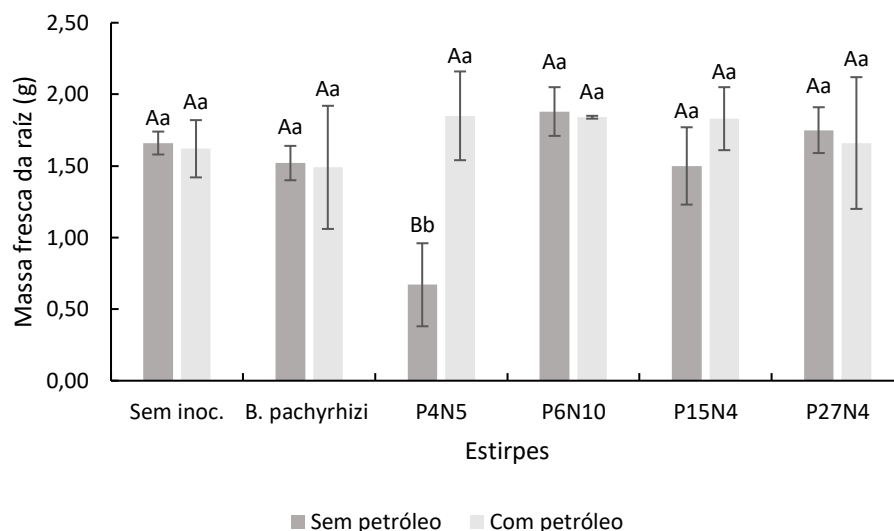
Fonte: a autora.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre as inoculações/estirpes representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes entre as condições do solo sem e com 0,3% de petróleo da mesma inoculação representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de 3 réplicas biológicas.

O desdobramento dos fatores mostrou que houve influência da inoculação e da presença de petróleo no parâmetro MFR em feijão-caupi (Figura 13). Observou-se que a estirpe *Paraburkholderia* sp. P4N5 apresentou um efeito significativo da interação entre os fatores, com menor MFR em solo sem petróleo e um aumento significativo na presença de 0,3% de petróleo, sugerindo que essa estirpe tende a tolerar o petróleo, assim como observado nos testes *in vitro*. As demais estirpes, incluindo o tratamento sem inoculação e *B. pachyrhizi*, não apresentaram variação significativa entre as condições de solo quando avaliadas isoladamente. Entretanto, na condição sem petróleo houve diferença significativa entre a estirpe

Paraburkholderia sp. P4N5, que apresentou a menor média de MFR, comparada aos demais tratamentos.

Figura 13- Efeito da inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 na massa fresca da raiz (MFR) de plantas da espécie *Vigna unguiculata* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.



Fonte: a autora.

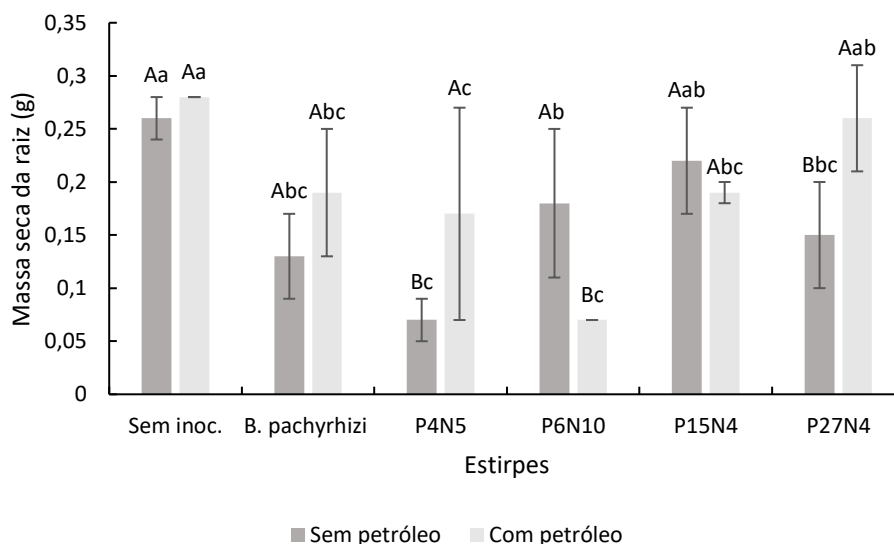
Nota: Letras minúsculas diferentes entre as inoculações/estirpes representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes entre as condições do solo sem e com 0,3% de petróleo da mesma inoculação representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de 3 réplicas biológicas.

A MSR do feijão-caupi também apresentou desdobramento dos fatores e foi influenciada tanto pela inoculação das estirpes quanto pela presença de petróleo no solo, como apresentado na Figura 14. Sendo assim, os desdobramentos estatísticos revelam que, a MSR das plantas inoculadas com as bactérias *Paraburkholderia* sp. estirpes P4N5 e P27N4 apresentaram um aumento expressivo na MSR na presença de 0,3% de petróleo, indicando que essas estirpes possuem mecanismos de tolerância aos compostos tóxicos do petróleo e que essa condição não afeta seu metabolismo. No entanto, as plantas inoculadas com a estirpe *Paraburkholderia* sp. P6N10 foram afetadas negativamente pela presença do contaminante no solo.

Ainda, dentro de cada condição de solo também foram observadas diferenças entre as estirpes. Em solo sem petróleo, o resultado obtido nas plantas sem inoculação foi estatisticamente superiores às bactérias *Paraburkholderia* sp. estirpes P4N5, P6N10, P27N4 e *B. pachyrhizi*, não diferenciando estatisticamente da bactéria *Paraburkholderia* sp. P15N4. Enquanto na condição com petróleo, apesar das plantas sem inoculação também apresentar média elevada, não foi estatisticamente diferente da estirpe *Paraburkholderia* sp. P27N4, que

se apresentou superior ao tratamento com a bactéria *Paraburkholderia* sp. P4N5 e P6N10, mas não diferente do tratamento com *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *B. pachyrhizi*.

Figura 14- Efeito da inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 na massa seca da raiz (MSR) de plantas da espécie *Vigna unguiculata* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.



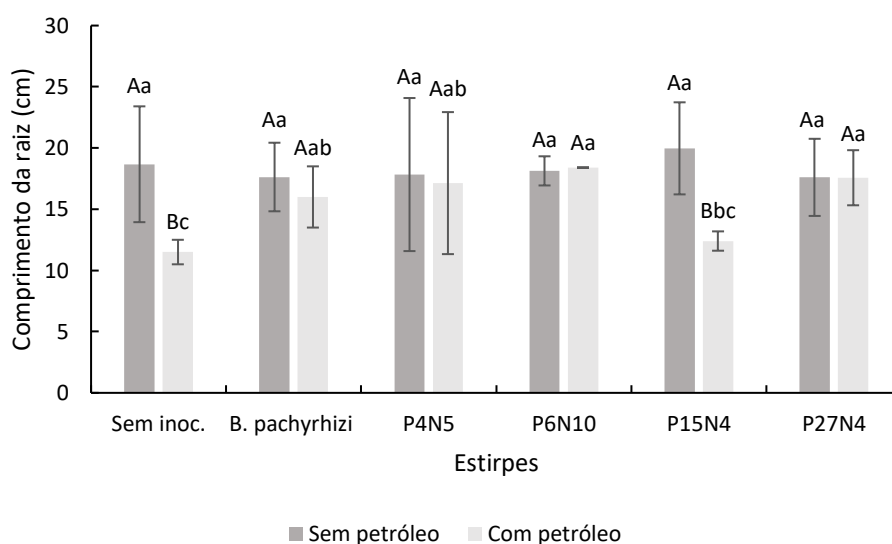
Fonte: a autora.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre as inoculações/estirpes representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes entre as condições do solo sem e com 0,3% de petróleo da mesma inoculação representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de 3 réplicas biológicas.

O CR do feijão-caupi foi significativamente influenciado tanto pela inoculação das estirpes bacterianas quanto pela presença de petróleo no solo (Figura 15). O tratamento sem inoculação apresentou uma redução expressiva do crescimento da raiz na presença de petróleo, evidenciada pela diferença estatística entre as condições de cultivo. Esse resultado negativo do crescimento radicular na ausência de inoculação mostra que, de fato, a contaminação do solo por hidrocarbonetos de petróleo é altamente tóxica, especialmente no desenvolvimento e crescimento das plantas (Galitskaya *et al.*, 2021; Haider *et al.*, 2021). No sistema radicular a presença de óleo dificulta a capacidade de absorção de água e nutrientes resultando em raízes atrofiadas, além de causar ruptura das membranas celulares nas células em crescimento, dificultando sua capacidade de reter água, e inibe o metabolismo das organelas celulares, impedindo a expansão celular (Silva *et al.*, 2022). Além do tratamento sem inoculação, a estirpe *Paraburkholderia* sp. P15N4 também apresentou redução significativa no CR quando cultivado em solo contaminado, sugerindo que essa estirpe não foi eficiente em mitigar os efeitos negativos do petróleo sobre o sistema radicular.

Por outro lado, as bactérias *Paraburkholderia* sp. P4N5, P6N10 e P27N4 não apresentaram diferenças significativas entre as condições sem e com 0,3% de petróleo. Além disso, na condição com petróleo observou-se uma diferenciação significativa entre os tratamentos inoculados, no qual as plantas sem inoculação apresentaram menor CR, enquanto as demais estirpes apresentaram valores superiores e estatisticamente distintos, indicando possível tolerância das estirpes à contaminação por hidrocarbonetos, exceto pela estirpe *Paraburkholderia* sp. P15N4.. A grande área de superfície radicular pode ser otimizada para aquisição de nutrientes, melhorando a capacidade das raízes de detectar sinais de flutuação de nutrientes no ambiente externo, maximizando assim a exploração de recursos externos para garantir o desenvolvimento geral da planta (Hu *et al.*, 2021), especialmente em solos contaminados, onde a aquisição de nutrientes é prejudicada (Cheng; Zhou; Yu, 2019).

Figura 15- Efeito da inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 no comprimento da raiz (CR) de plantas da espécie *Vigna unguiculata* cultivados em solo sem petróleo e solo com 0,3% de petróleo.



Fonte: a autora.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre as inoculações/estirpes representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes entre as condições do solo sem e com 0,3% de petróleo da mesma inoculação representam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados apresentados representam médias de 3 réplicas biológicas.

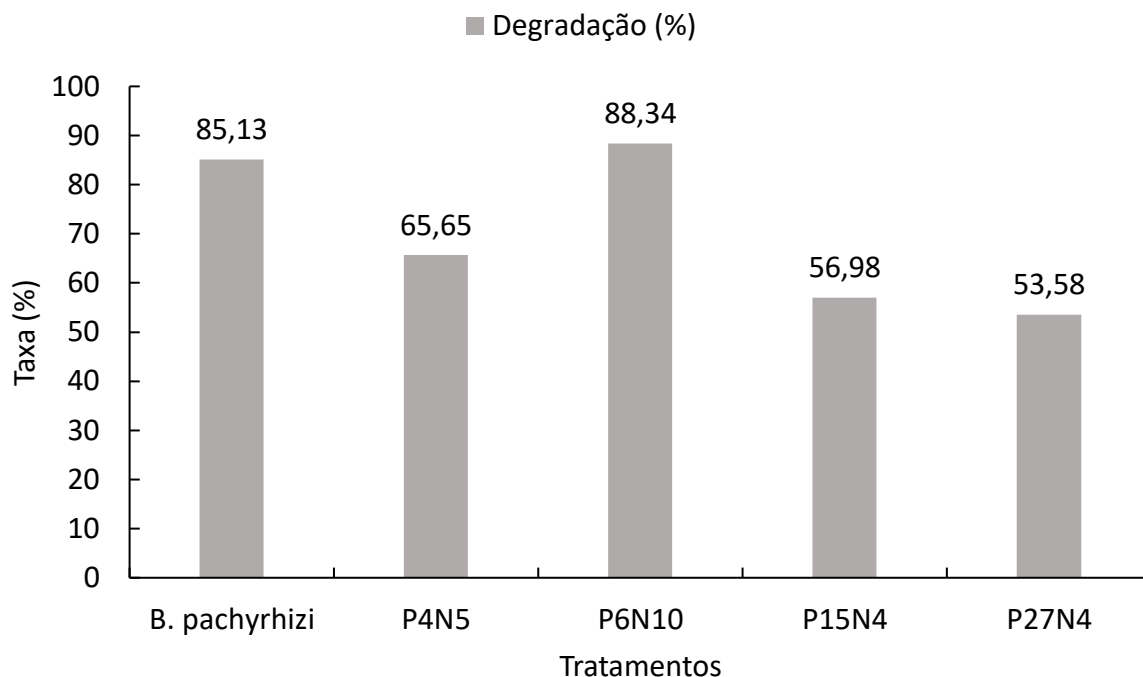
Esses resultados indicam que algumas estirpes podem ter desempenhado um papel protetor sobre o crescimento radicular em condições de estresse, possivelmente devido à capacidade de tolerar, degradar hidrocarbonetos ou promover o crescimento vegetal. A menor redução do comprimento radicular em plantas inoculadas com determinadas estirpes sugere que essas bactérias podem ter contribuído para a mitigação dos efeitos tóxicos do petróleo,

favorecendo a adaptação das plantas ao ambiente contaminado. Entretanto, estudos adicionais acerca dos mecanismos envolvidos nessa interação são necessários para confirmar a capacidade dessas estirpes em promover a tolerância ao estresse por petróleo e seu potencial para aplicação em estratégias de biorremediação. Esses estudos podem incluir análises da expressão gênica relacionada à degradação de TPH, produção enzimática, quantificação de compostos orgânicos no solo, além de estudos de metagenômica e metabolômica para caracterizar alterações no microbioma e nos perfis metabólicos no solo (Deng *et al.*, 2024; Rajguru; Shri; Bhatt, 2024).

A concentração dos TPH no solo após o cultivo de *V. unguiculata* e do processo de biorremediação também foi detectada pelo método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A avaliação da porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos e a quantidade de óleo residual para cada tratamento revela que o tratamento com a bactéria *Paraburkholderia* sp. P6N10 apresentou a maior taxa de degradação, seguido pelo tratamento com *B. pachyrhizi*, sugerindo que esses microrganismos possuem alta eficiência na degradação dos hidrocarbonetos presentes no solo contaminado (Figura 16). Por outro lado, os tratamentos com *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 apresentaram as menores taxas de degradação, o que se reflete na maior quantidade de óleo residual nesses tratamentos.

Esses achados reforçam a importância da seleção de microrganismos adequados para processos de biorremediação, sendo *Paraburkholderia* sp. P6N10 a opção com características desejáveis, visto que foi isolada de um ponto com altas concentrações de petróleo no solo, apresentou tolerância ao petróleo nas condições *in vitro* e degradação quando inoculadas no solo, reforçando suas habilidades promissoras na biorremediação. Ainda, essas reduções significativas verificadas podem ser atribuídas, principalmente, a dois fatores: (I) decomposição de compostos de cadeia molecular mais simples e, consequentemente, mais facilmente biodegradáveis, (II) e também ao maior potencial de volatilização destes compostos (WANG *et al.*, 2016).

Figura 16- Taxa de degradação e recuperação do petróleo no solo após remediação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 inoculadas em *Vigna unguiculata*.



Fonte: a autora.

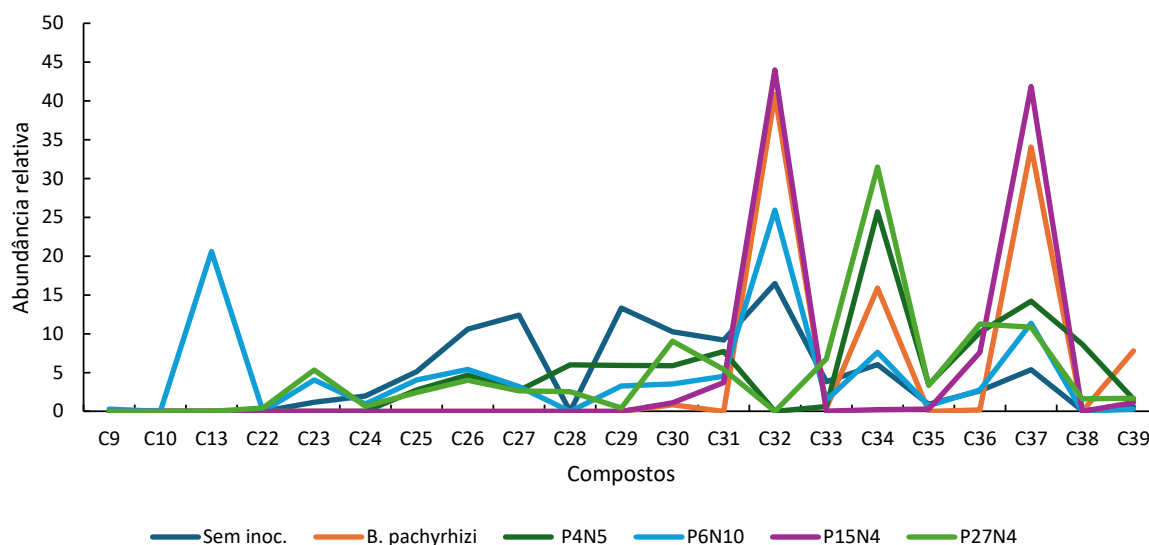
A extensão da biodegradação das frações de hidrocarbonetos saturados no feijão-caupi foi determinada, e os resultados são apresentados na Figura 17. Um total de 21 componentes foram detectados nas amostras, variando de C9 a C39. A análise cromatográfica dos diferentes tratamentos revela variações significativas na intensidade dos picos, refletindo distintas capacidades de degradação dos componentes presentes no solo contaminado. No cromatograma obtido, os tratamentos apresentaram padrões distintos de degradação, com destaque para os componentes identificados nos tempos de retenção correspondentes a C32 e C37, os quais exibiram os picos de maior intensidade. Nestes, os tratamentos *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Bradyrhizobium pachyrhizi* apresentaram as maiores concentrações residuais dos hidrocarbonetos, conforme evidenciado nos picos. Esse resultado sugere que, sob essas condições experimentais, a degradação desses componentes foi menos eficiente nesses tratamentos.

Os tratamentos com *Paraburkholderia* sp. P4N5 e *Paraburkholderia* sp. P6N10 demonstraram menores intensidades de pico ao longo do cromatograma, indicando uma potencial degradação mais efetiva dos hidrocarbonetos presentes no petróleo. No entanto, as maiores abundâncias relativa no tratamento com *Paraburkholderia* sp. P6N10 foi observada também no C32 e diferente dos demais no C13. No tratamento com *Paraburkholderia* sp. P4N5

os maiores picos ocorreram em C37 e C34, que também foi o maior para o tratamento com a bactéria *Paraburkholderia* sp. P27N4. O tratamento sem inoculação também apresentou picos elevados em diversas regiões do cromatograma, especialmente em C13 e C31, sugerindo uma menor degradação natural do petróleo em ausência de inoculação de bactérias com potencial para degradação.

Assim como observado com as bactérias inoculadas em feijão comum, no feijão-caupi também houve uma concentração de picos maior em componentes com n-alcenos de cadeias muito longas (C32-C37). Esse resultado também reforça a capacidade das bactérias testadas em degradar hidrocarbonetos de cadeias mais curtas.

Figura 17- Extensão da biodegradação de hidrocarbonetos no solo após inoculação das estirpes *Paraburkholderia* sp. P4N5, *Paraburkholderia* sp. P6N10, *Paraburkholderia* sp. P15N4 e *Paraburkholderia* sp. P27N4 na espécie *Vigna unguiculata*.



Fonte: a autora.

A partir dos gráficos de concentração das cadeias de hidrocarbonetos comparando as duas espécies de feijões, pode-se observar que a bactéria P15N4 foi utilizada em ambos os experimentos, demonstrando maior eficiência na degradação do petróleo quando associada ao feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Esse resultado deve-se à já conhecida capacidade de fitorremediação da espécie, conforme apontado em estudos anteriores que destacam o feijão-caupi a espécie como eficiente para a fitorremediação (Jidere *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015; Sun; Crowley; Wei, 2015; Orji-Oraemesi *et al.*, 2022; Ismail *et al.*, 2024). Essa característica se deve ao fato da espécie possuir resistência aos hidrocarbonetos do petróleo, capacidade de acumulação de metal, produção de alto rendimento, além de sintetizar elevadas quantidades de exsudatos radiculares, tornando-o atrativo para os microrganismos no processo de

fitorremediação (Aliku; Madu; Aliku, 2021; Farouq *et al.*, 2022). Quando associado a bactérias, sua capacidade de remediação é potencializada, pois a bactéria pode promover o crescimento da biomassa da planta e auxiliar na biorremediação do solo contaminado, tornando a interação entre planta e bactéria uma estratégia promissora para o tratamento de solos contaminados (Narayanan *et al.*, 2021).

6 CONCLUSÃO

Os resultados dos testes de nodulação revelam que a maioria dos isolados provenientes dos nódulos das espécies *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli*, são capazes de promover formação de nódulos em *Phaseolus vulgaris* ou *Vigna unguiculata*, destacando o potencial dos isolados para a FBN. As bactérias que apresentaram mecanismos promotores de crescimento vegetal e degradadoras de petróleo *in vitro* tiveram também os melhores resultados em casa de vegetação.

As estirpes *Paraburkholderia* sp. P27N6, P27N4 e P15N4 se destacaram pelos efeitos benéficos no crescimento do feijão em diferentes condições. A *Paraburkholderia* sp. P27N6 favoreceu VR e MSN no feijão comum com petróleo, além de degradar petróleo, produzir AIA e solubilizar fosfato. A *Paraburkholderia* sp. P27N4 promoveu NN, MFN e MSN no feijão-caupi sem petróleo e maior CR com petróleo, também apresentando capacidade de degradação, produção de AIA e solubilização de fosfato. Já a estirpe *Paraburkholderia* sp. P15N4 aumentou NN e MFN na condição sem petróleo e VR em condição de contaminação por petróleo, sendo ainda, tolerante e degradadora em altos níveis de contaminação.

Sendo assim, as estirpes testadas podem ser alternativas viáveis e promissoras na sustentabilidade e biorremediação de solos contaminados por petróleo, por suas potenciais aplicações na FBN, na promoção do crescimento vegetal e degradação de petróleo quando inoculadas. Os resultados reforçam a relevância de prospectar organismos capazes de trazer benefícios ambientais e agrícolas, em vista da necessidade de conservação desses ecossistemas. Contudo, estudos aprofundados para compreensão do processo de degradação de hidrocarbonetos e promoção de crescimento ainda são necessários para compreender os mecanismos das estirpes, bem como, a possibilidade de inoculação em outras espécies.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, F. *et al.* A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 670–699, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>. Acesso em: 17 set. 2023.
- ABDELAAL, K. *et al.* The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants. **Biology**, v. 10, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology10060520>. Acesso em: 17 set. 2023.
- ABDULLAHI, S. *et al.* Beneficial bacteria associated with *Mimosa pudica* and potential to sustain plant growth-promoting traits under heavy metals stress. **Bioremediation Journal**, v. 25, n. 1, p. 1-21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10889868.2020.1837724>. Acesso em: 12 out. 2024.
- ACOSTA-JURADO, S. *et al.* Rhizobial Exopolysaccharides: Genetic Regulation of Their Synthesis and Relevance in Symbiosis with Legumes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22126233> 2021. Acesso em: 19 set. 2023.
- ADENIRAN, M. A.; OLADUNJOYE, M. A.; DORO, K. O. Soil and groundwater contamination by crude oil spillage: A review and implications for remediation projects in Nigeria. **Frontiers in Environmental Science**, v. 11, 1137496, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1137496>. Acesso em: 12 out. 2024.
- AHMAD, A. A. *et al.* Remediation Methods of Crude Oil Contaminated Soil. **Journal of Agriculture and Soil Science**, v. 4, n. 3, 2020. Disponível em: [10.33552/WJASS.2020.04.000595](https://doi.org/10.33552/WJASS.2020.04.000595). Acesso em: 05 set. 2023.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>. Acesso em: 12 nov. 2023.
- AJONA, M.; VASANTHI, P. Bio-re mediation of crude oil contaminated soil using recombinant native microbial strain. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101635>. Acesso em: 24 out. 2023.
- ALAYLAR, B. *et al.* Rapid detection of phosphate-solubilizing bacteria from agricultural areas in Erzurum. **Current Microbiology**, v. 76, p. 804–809, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01688-7>. Acesso em: 20 set. 2023.
- ALEMNEH, A. A. *et al.* Ability to produce indole acetic acid is associated with improved phosphate solubilising activity of rhizobacteria. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 3825–3837, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02364-w>. Acesso em: 24 out. 2024.
- ALEMNEH, A. A. *et al.* Mechanisms in plant growth-promoting rhizobacteria that enhance legume–rhizobial symbioses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1133-1156, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14754>. Acesso em: 20 set. 2023.

ALI, M. H. *et al.* Microbe-Assisted Rhizoremediation of Hydrocarbons and Growth Promotion of Chickpea Plants in Petroleum Hydrocarbons-Contaminated Soil. **Sustainability**, v. 15, n. 7, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su15076081>. Acesso em: 24 out. 2024.

ALIKU, C. B.; MADU, C. N.; ALIKU, O. Organic stimulants for enhancing phytoremediation of crude oil polluted soil: A study on cowpea. **Environmental Pollution**, v. 287, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117674>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ALOTAIBI, F. ST-ARNAUD, M.; HIJRI, M. In-Depth Characterization of Plant Growth Promotion Potentials of Selected Alkanes-Degrading Plant Growth Promoting Bacterial Isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 863702, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.863702>. Acesso em: 24 out. 2024.

ARAÚJO, R. H. F. **Caracterização de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli* em solo contaminado com petróleo**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2021.

ARAÚJO, T. G. F. *et al.* Soil and climatic conditions determine the rhizobia in association with *Phaseolus vulgaris* in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 601–610, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-025-01621-0>. Acesso em: 02 mar. 2025.

ARAÚJO, W. J. *et al.* Microbial Culture in Minimal Medium With Oil Favors Enrichment of Biosurfactant Producing Genes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00962>. Acesso em: 03 nov. 2024.

AUTI, A. M. *et al.* Microbiome and imputed metagenome study of crude and refined petroleum-oil-contaminated soils: Potential for hydrocarbon degradation and plant-growth promotion. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 5, p. 1-16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9936-9>. Acesso em: 28 set. 2023.

AYALEW, T.; YOSEPH, T. Symbiotic effectiveness of inoculation with *Bradyrhizobium* isolates on Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) varieties. **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1845495>. Acesso em: 14 set. 2023.

BAGHERI, A. *et al.* Use of biologic inputs among cereal farmers: application of technology acceptance model. **Environment, Development and Sustainability**, v. 23, p. 5165–5181, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10668-020-00808-9>. Acesso em: 29 mai. 2025.

BAUDE, M.; MEYER, B. C.; SCHINDEWOLF, M. Land use change in an agricultural landscape causing degradation of soil based ecosystem services. **Science of The Total Environment**, v. 659, p. 1526-1536, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.455>. Acesso em: 04 nov. 2023.

BAUDSON, C. *et al.* Triggering root system plasticity in a changing environment with bacterial bioinoculants- Focus on plant P nutrition. **Plant Soil**, v. 484, p. 49-63, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05809-3>. Acesso em: 04 nov. 2024.

BELLÉS-SANCHO, P. *et al.* Nitrogen-Fixing Symbiotic *Paraburkholderia* Species: Current Knowledge and Future Perspectives. **Nitrogen**, v. 4, p. 135-158, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nitrogen4010010>. Acesso em: 04 jul. 2024.

BILLAH, M. *et al.* Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 10, p. 904-916, 2019. Disponível em: [10.1080/01490451.2019.1654043](https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043). Acesso em: 20 set. 2023.

BINDRABAN, P.S.; DIMKPA, C.O.; PANDEY, R. Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 299–317, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01430-2> . Acesso: 08 out. 2024.

BITOCCHI, E. *et al.* Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytologist**, v. 197, n. 1, p. 300-313, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x>. Acesso em: 20 set. 2023.

BONVICINI, S.; ANTONIONI, G.; COZZANI, V. Assessment of the risk related to environmental damage following major accidents in onshore pipelines. **Journal of Loss Prevention in the Process Industries**, v. 56, p. 505-516, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2018.11.005>. Acesso em: 04 out. 2024

BONATELLI, M. L. *et al.* Beneficial Plant-Associated Microorganisms From Semiarid Regions and Seasonally Dry Environments: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 553223, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.553223>. Acesso em: 19 nov. 2024.

BORRELLI, P. *et al.* An assessment of the global impact of 21st century land use change on soil erosion. **Nature Communications**, v. 8, p. 1-13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02142-7>. Acesso em: 24 set. 2023.

BULGARELLI, D. *et al.* Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807–838, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>. Acesso em: 19 set. 2023.

CAMPOS, J. R. *et al.* Bioremediation of soil contaminated by hydrocarbons with the combination of three technologies: bioaugmentation, phytoremediation, and vermiremediation. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, p. 1981–1994, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2213-y>. Acesso em: 24 set. 2023.

CANGIOLI, L. *et al.* Scent of a Symbiont: The Personalized Genetic Relationships of Rhizobium- Plant Interaction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, 3358, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23063358>. Acesso em: 26 nov. 2024.

CAO, J. *et al.* Genome, metabolic pathways and characteristics of cometabolism of dibenzothiophene and the biodiesel byproduct glycerol in *Paraburkholderia* sp. C3. **Bioresource Technology**, v. 326, 124699, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124699>. Acesso em: 01 mar. 2025.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. São Paulo, ESALQ, 2016.

CASTRO, J. L. *et al.* Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20160525>. Acesso em: 25 set. 2023.

CARVALHO, T. L. G. Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p. 561–574, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0435-1>. Acesso em: 17 set. 2023.

CHANDRA, S. *et al.* Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 417–431, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>. Acesso em: 24 nov. 2024.

CHHETRI, G. *et al.* *Paraburkholderia tagetis* sp. nov., a novel species isolated from roots of *Tagetes patula* enhances the growth and yield of *Solanum lycopersicum* L. (tomato). **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 1140484. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1140484>. Acesso em: 29 dez. 2024.

CHEN, J. *et al.* Oil spills from global tankers: Status review and future governance. **Journal of Cleaner Production**, v. 227, p. 20–32, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.020>. Acesso em: 21 set. 2023.

CHEN, Q.; LIU, S. Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea* sp. S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02171>. Acesso em: 20 set. 2023.

CHENG, L.; ZHOU, Q.; YU, BINBIN. Responses and roles of roots, microbes, and degrading genes in rhizosphere during phytoremediation of petroleum hydrocarbons contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, n. 12, p. 1161–1169, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1612841>. Acesso em: 21 set. 2023.

CHIDEBE, I. N.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. Distribution and Phylogeny of Microsymbionts Associated with Cowpea (*Vigna unguiculata*) Nodulation in Three Agroecological Regions of Mozambique. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01712-17>. Acesso em: 27 nov. 2024.

COLLAVINO, M. M. *et al.* Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, p. 727–738, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>. Acesso em: 27 dez. 2024.

CORREA, H. S. *et al.* Effects of oil contamination on plant growth and development: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.29, p. 43501–43515, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19939-9>. Acesso em: 25 ago. 2024.

CUI, J. *et al.* Comparison of bacterial community structure and function under different petroleum hydrocarbon degradation conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 303–313, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02227-1>. Acesso em: 01 mar. 2025.

DALL'AGNOL, R. F. *et al.* Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix027>. Acesso em: 26 jan. 2025.

DALL'AGNOL, R. F. *et al.* *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 9, 2014. Disponível em: [10.1099/ijs.0.064543-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.064543-0). Acesso em: 23 jul. 2023.

DEHNAVI, S. M.; EBRAHIMPOUR, G. Comparative remediation rate of biostimulation, bioaugmentation, and phytoremediation in hydrocarbon contaminants. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, p. 11561–11586, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04343-0>. Acesso em: 02 set. 2023.

DENG, C. *et al.* Enhancement of repeated inoculation strategy with a domesticated bacterial consortium on the biodegradation of high-level crude oil in soil. **Science of The Total Environment**, v. 955, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176863>. Acesso em: 18 abr. 2025.

DE RON, A. *et al.* Common Bean. In: DE RON, A. **Grain Legumes: Handbook of Plant Breeding**. New York: Springer v 10, 2015. 1-36 p. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2797-5_1. Acesso em: 21 set. 2023.

DIAS, G. M. *et al.* Comparative genomics of *Paraburkholderia kururiensis* and its potential in bioremediation, biofertilization, and biocontrol of plant pathogens. **MicrobiologyOpen**, v. 8. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mbo3.801>. Acesso em: 05 jan. 2025.

DONG, W.; SONG, Y. The Significance of Flavonoids in the Process of Biological Nitrogen Fixation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n.16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21165926>. Acesso em: 30 abr 2024.

DUBEY, A. *et al.* Bacterial Root Endophytes: Characterization of Their Competence and Plant Growth Promotion in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under Drought Stress. **International Journal of Environmental Research and Public Health is a transdisciplinary**, v. 18, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph18030931>. Acesso em: 10 jan. 2025.

ELUMALAI, P. *et al.* Role of thermophilic bacteria (*Bacillus* and *Geobacillus*) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment. **3 Biotech**, v. 9, n. 79, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1604-0>. Acesso em: 28 dez. 2024.

ETESAMI, H. Root nodules of legumes: A suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. **Current Research in Biotechnology**, v. 4, p. 78-86, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.003>. Acesso em: 20 set. 2023.

EZE, M. O. *et al.* Bacteria-plant interactions synergistically enhance biodegradation of diesel fuel hydrocarbons. **Commun Earth Environ**, v. 3, n. 192, 2022a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43247-022-00526-2>. Acesso em 22 jan. 2025.

EZE, M. O. *et al.* Enhancing rhizoremediation of petroleum hydrocarbons through bioaugmentation with a plant growth-promoting bacterial consortium. **Chemosphere**, v. 289, 2022b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133143>. Acesso em: 03 jul. 2023.

FAKHER, S. *et al.* Critical review of asphaltene properties and factors impacting its stability in crude oil. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 10, p. 1183–1200, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13202-019-00811-5>. Acesso em: 24 out. 2024.

FAROUQ, A. A. *et al.* Cowpea induced physicochemical and biological rhizosphere changes in hydrocarbon contaminated soil. **Plant Soil**, v. 477, p. 759–777, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05460-y>. Acesso em: 16 out. 2024.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. ExpDes: an R package for anova and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952–2958, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280>. Acesso em: 13 out. 2024.

FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1187–1193, 2008. Disponível em: <https://doi.org.ez82.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11274-007-9591-4>. Acesso em: 06 ago. 2023.

FILIPOWICZ, N., CIEŚLIŃSKI, H. A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms with a Potential for Catechol Biodegradation. **International Journal of Environmental Research**, v. 14, p. 87–92, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00239-z>. Acesso em: 23 jan. 2025.

FLORES-DUARTE, N. J. *et al.* Enhanced legume growth and adaptation to degraded estuarine soils using *Pseudomonas* sp. nodule endophytes. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1005458>. Acesso em: 24 jan. 2025.

FRANCHE, C., LINDSTRÖM, K. & ELMERICHE, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, p. 35–59, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>. Acesso em: 26 jul. 2023.

GALIERIKOVÁ, A.; MATERNA, M. World Seaborne Trade with Oil: One of Main Cause for Oil Spills? **Transportation Research Procedia**, v. 44, p. 297–304, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trpro.2020.02.039>. Acesso em: 21 set. 2023.

GALITSKAYA, P. *et al.* Response of bacterial and fungal communities to high petroleum pollution in different soils. **Scientific Reports**, v. 11, n. 164, 2021.

GARCÍA-SÁNCHEZ, M. *et al.* A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**,

v. 147, p. 165-174, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.012>. Acesso em: 03 set. 2023.

GHOSAL, D. *et al.* Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Frontiers in Microbiology**, p. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>. Acesso em: 17 jun. 2024.

GLICK, B. R. **Beneficial Plant-Bacterial Interactions**. 2. ed. Springer: Heidelberg, Alemanha, 2020; 383 p.

GLICK, B. R.; GAMALERO, E. Recent Developments in the Study of Plant Microbiomes. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071533>. Acesso em 18 set. 2023.

GORDON, S. A.; WEBER R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1951. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>. Acesso em: 28 jul. 2023.

GRAJ, W. *et al.* Bioaugmentation with Petroleum-Degrading Consortia Has a Selective Growth-Promoting Impact on Crop Plants Germinated in Diesel Oil-Contaminated. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, n. 1676, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1676-0>. Acesso em: 25 jan. 2025.

GUARDADO-FIERROS B. G. Comparative study between Salkowski reagent and chromatographic method for auxins quantification from bacterial production. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 1378079, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1378079>. Acesso em: 27 dez. 2024.

GÓES, G. S. *et al.* Effects of inoculation with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization on growth and quality of *Inga laurina* (SW.) Willd. (Fabaceae) seedlings. **Árvore**, v. 39, n. 6, p. 1031-1038, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-67622015000600005>. Acesso em: 28 dez. 2024.

HAIDER, F. U. *et al.* Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts and remediation strategies. **Environmental Research**, v. 197, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111031>. Acesso em: 03 set. 2023.

HAKIM, S. *et al.* Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan. **Microbiological Research**, v. 231, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126356>. Acesso em: 19 set. 2023.

HALEYUR, N. *et al.* Assessing the degradation efficacy of native PAH-degrading bacteria from aged, weathered soils in an Australian former gasworks site. **Geoderma**, v. 321, p. 110-117, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.02.004>. Acesso em: 29 jan. 2025.

HASSAIN, M. F. *et al.* Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 211-216, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.069>. Acesso em: 03 set. 2023.

HERMS, C. H. *et al.* Back to our roots: exploring the role of root morphology as a mediator of beneficial plant–microbe . interactions. **Environmental Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 3264–3272, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15926>. Acesso em: 24 dez. 2024.

HORN, L. N.; SHIMELIS, H. Production constraints and breeding approaches for cowpea improvement for drought prone agro-ecologies in Sub-Saharan Africa. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 1, p. 83-91, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.03.002>. Acesso em: 23 jan. 2025.

HUBA, A. K.; HUBA, K.; GARDINALI, P. R. Understanding the atmospheric pressure ionization of petroleum components: The effects of size, structure, and presence of heteroatoms. **Science of The Total Environment**, v. 568, p. 1018-1025, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.044>. Acesso em: 28 out. 2024.

HUNGRIA, M. *et al.* Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 10, p. 1349-1361, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00040-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00040-2). Acesso em: 03 set. 2023.

HU, Q. Q. *et al.* Role of Auxin and Nitrate Signaling in the Development of Root System Architecture. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 690363, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.690363>. Acesso em: 28 nov. 2024.

HUSSAIN, I. *et al.* Differentiation between physical and chemical effects of oil presence in freshly spiked soil during rhizoremediation trial. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 18, p. 18451–18464, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04819-6>. Acesso em: 24 ago. 2024.

IBÁÑEZ, F.; WALL, L.; FABRA, A. Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 8, p. 1905–1918, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erw387>. Acesso em: 20 set. 2023.

ISHAK, I.C. *et al.* A Study of Oil Spill at Marine Companies: Factors and Effects. In: Saw, C. *et al.* **Advancement in Emerging Technologies and Engineering Applications**. Singapore: Springer, 2020. p. 1-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-15-0002-2>. Acesso em: 28 nov. 2023.

ISMAIL, H. Y. *et al.* Phytoremediation of crude oil-contaminated soil using *Vigna Unguiculata* and associated rhizosphere bacteria. **International Journal of Phytoremediation**, v. 26, n. 14, p. 2325–2335, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15226514.2024.2389559>. Acesso em: 18 nov. 2024.

ISMAIL, N. A.; KASMURI, N.; HAMZAH, N. Microbial Bioremediation Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs)- a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 233, n. 124, p. 1-27, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05598-6>. Acesso em: 28 ago. 2024.

JAISWAL, S. *et al.* Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 2021. Disponível em: doi: 10.3389/fsufs.2020.619676. Acesso em: 20 set. 2023.

JAN, M. *et al.* Modulating root system architecture: cross-talk between auxin and phytohormones. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 1343928, 2024. doi: 10.3389/fpls.2024.1343928. Acesso em: 04 jun 2024.

JAYATHILAKE, C. Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **Science of Food and Agriculture**. Doi:10.1002/jsfa.9074, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9074>. Acesso em: 28 ago. 2024.

JIANG, Y. *et al.* Evaluation of beneficial and inhibitory effects of nitrate on nodulation and nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Legume Science**, v. 2, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/leg3.45>. Acesso em: 06 jan. 2025.

JL, S. H. *et al.* Enhancement of vitality and activity of a plant growth-promoting bacteria (BPCP) by atmospheric pressure non-thermal plasma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38026-z>. Acesso em: 28 ago. 2024.

JIAO, S. *et al.* Complexity of bacterial communities within the rhizospheres of legumes drives phenanthrene degradation. **Geoderma**, v. 353, p. 1-10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.06.019>. Acesso em: 04 jun. 2024.

JIDERE, C.M.; AKAMIGBO, PARA; UGWUANYI, JO. Phytoremediation Potentials of Cowpea (*Vigna Unguiculata*) and Maize (*Zea Mays*) for Hydrocarbon Degradation in Organic and Inorganic Manure-Amended Tropical Typic Paleustults. **International Journal of Phytoremediation**, v. 14, p. 362-373, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.620652>. Acesso em: 08 out. 2024.

JOERGENSEN, R. G. Phospholipid fatty acids in soil—drawbacks and future prospects. **Biology and Fertility of Soils**, v. 58, p. 1–6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-021-01613-w>. Acesso em: 04 set. 2023.

JOHNSTON, J. E.; LIM, E; ROH, H. Impact of upstream oil extraction and environmental public health: A review of the evidence. **Science of The Total Environment**, v. 657, p. 187-199, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.483>. Acesso em: 04 set. 2023.

KALAYU, G. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>. Acesso: 08 out. 2024.

KARAVIDAS, I. *et al.* Agronomic Practices to Increase the Yield and Quality of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A Systematic Review. **Agronomy**, v. 12, n. 271, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy12020271>. Acesso em: 20 set. 2023.

KAWAKA, F. *et al.* Genetic diversity of symbiotic bacteria nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. **Plos One**, v. 13, n. 11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207403>. Acesso em: 08 out. 2024.

KHAN, I. *et al.* Phosphate solubilizing epilithic and endolithic bacteria isolated from clastic sedimentary rocks, Murree lower Himalaya, Pakistan. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 332, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02946-2>. Acesso em: 08 out. 2024.

KHAN, M. A. I. *et al.* Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. **Chemosphere**, v. 212, p. 755-767, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.094>. Acesso em: 04 set. 2023.

KLEPA, M. S. *et al.* Molecular diversity of rhizobia nodulating native *Mimosa* of Brazilian protected areas. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 5533-5545, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02537-7>. Acesso em: 24 out. 2024.

KIBA, T.; KRAPP, A. Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 707–714, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw052>. Acesso em: 24 out. 2024.

KNEIP, C. *et al.* Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 55, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-55>. Acesso em: 26 jul. 2023.

KOELMEL, J.; PRASAD, M. N. V.; PERSHELL, K. Bibliometric Analysis of Phytotechnologies for Remediation: Global Scenario of Research and Applications. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, n. 2, p. 145–153. Disponível em: [doi:10.1080/15226514.2013.862207](https://doi.org/10.1080/15226514.2013.862207). Acesso em: 04 set. 2023.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 621, dez. 1952. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/2280779>. Acesso em: 22 out. 2024.

KUZINA, E. *et al.* Influence of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria on the Growth, Biochemical Characteristics, and Hormonal Status of Barley Plants and the Content of Petroleum Hydrocarbons in the Soil. **Plants**, v. 10, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants10081745>. Acesso em: 16 jan. 2024.

LAMBERS, H. Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 73, p. 17-42, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102720-125738>. Acesso em: 12 jul. 2024.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M.. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York (Wiley), 1991. p. 115-148.

LANGER, I. *et al.* Plant growth and root morphology of *Phaseolus vulgaris* L. grown in a split-root system is affected by heterogeneity of crude oil pollution and mycorrhizal colonization. **Plant and Soil**, v. 332, p. 339–355, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0300-y>. Acesso em: 24 fev. 2025.

LAZARIDI, E. *et al.* Diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) local populations from Greece. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 64, p. 1529-1551, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0452-6>. Acesso em: 25 out. 2024.

ŁAWNICZAK, Ł. *et al.* Microbial Degradation of Hydrocarbons- Basic Principles for Bioremediation: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 1-19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25040856>. Acesso em: 27 jul. 2024.

LĂZĂROAIE, M. M. Multiple responses of gram-positive and gram-negative bacteria to mixture of hydrocarbons. **Brazilian Journal of Microbiology**; v. 41, n. 3, p. 649-67, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300016>. Acesso em: 24 jan. 2025.

LEE, K. *et al.* Proposal of Construction Method of Smart Liner to Block and Detect Spreading of Soil Contaminants by Oil Spill. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 2, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph20020940>. Acesso em: 02 set. 2023.

LEE, Y.; LEE, Y.; JEON, C. O. Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. **Scientific**, v. 9, n. 860, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36165-x>. Acesso em: 01 fev. 2025.

LI, J. *et al.* Responses of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium, *Paraburkholderia fungorum* JT-M8, to Cd (II) under P-limited oligotrophic conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 465, 133123, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133123>. Acesso em: 01 mar. 2025.

LIU, B. *et al.* Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, p. 301-307, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.053>. Acesso em: 24 mai. 2025.

LIU, S.; WANG, Y.; LIANG, Y. Environmental consequence analysis of oil spills from onshore pipelines with parametric uncertainty. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 141, p. 123-134, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.04.032>. Acesso em: 18 dez. 2024.

LIU, Y. *et al.* Biodegradation of n-alkanes in crude oil by three identified bacterial strain. **Fuel**, v. 275, 117897, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117897>. Acesso em: 03 mar. 2025.

LI, Y., PAN, F.; YAO, H. Response of symbiotic and asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms to nitrogen fertilizer application. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, p. 1948-1958, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2192-z>. Acesso em 28 nov. 2024.

LINDSTRÖM, K.; MOUSAVI, S. A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, v. 13, n. 5, p. 1314-1335, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>. Acesso em: 29 out. 2024.

LOBO, L. L. B. *et al.* Effect of Indole-3-Acetic Acid on Tomato Plant Growth. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, 2212, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112212>. Acesso em: 05 jun 2024.

LOBO, L. L. B. *et al.* The Negative Effect of Coinoculation of Plant Growth-Promoting Bacteria Is Not Related to Indole-3-Acetic Acid Synthesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 2317–2326, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10706-1>. Acesso em: 05 jun 2024.

LOS, F. G. B. *et al.* Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 63-71, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.010>. Acesso em: 21 set. 2023.

LUA, H.; XI, D.; QIN, G. Environmental risk of oil pipeline accidents. **Science of the Total Environment**, v. 874, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162386>. Acesso em: 07 jan 2023.

LV, Y. BAO, J.; ZHU, L.. A comprehensive review of recent and perspective technologies and challenges for the remediation of oil-contaminated sites. **Energy Reports**, v. 8, p. 7976-7988, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2022.06.034>. Acesso em: 02 set. 2023.

LYU, X. *et al.* Systemic regulation of soybean nodulation and nitrogen fixation by nitrogen via isoflavones. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.968496>. Acesso: 16 out. 2024.

MADEJÓN, P. *et al.* Evaluation of amendment addition and tree planting as measures to remediate contaminated soils: The Guadiamar case study (SW Spain). **Catena**, v. 166, p. 34-43, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.03.016>. Acesso em: 12 set. 2023.

MATSUI, T. *et al.* Degradation of oil tank sludge using long-chain alkane-degrading bacteria. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 391–395, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0643-8>. Acesso em: 04 fev. 2025.

MÁRQUEZ-QUIROZ, C. *et al.* Biofortification of cowpea beans with iron: iron's influence on mineral content and yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 839-847, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000058>. Acesso em: 24 set. 2023.

MARINHO, R. C. N. *et al.* Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, n. 2, p.273–281, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.003>. Acesso em: 12 set. 2023.

MARRA, L. M. *et al.* Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 367–375, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246246220131102>. Acesso em: 12 ago, 2024.

MARTIN, W.; NELSON, Y. M.; HOFFMAN, K. Investigation of Hydrocarbon Phytoremediation Potential of *Lupinus chamissonis* in laboratory microcosms. **Proceedings of the Water Environment Federation**, v. 14; p. 13-38, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2175/193864704784137143>. Acesso em: 07 fev. 2025.

MCCOY, J. M. *et al.* Nitrogen Fertilization of Soybean Affects Root Growth and Nodulation on Two Soil Types in Mississippi. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 49, n. 2, p. 181-187, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1421649>. Acesso em: 28 jan. 2025.

MEENA, K. R. *et al.* Purification and identification of a surfactin biosurfactant and engine oil degradation by *Bacillus velezensis* KLP2016. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 26, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01519-0>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MEGU, M.; PAUL, A.; DEB, C. R. Isolation and screening of stress tolerant and plant growth promoting root nodulating rhizobial bacteria from some wild legumes of Nagaland, India. **South African Journal of Botany**, v. 168, p. 260-269, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.03.021>. Acesso em: 10 fev. 2025.

MEIŠTININKAS, R. *et al.* Biosurfactant-Assisted Phytoremediation of Diesel-Contaminated Soil by Three Different Legume Species. **Environments**, v. 11, n. 4, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3298/11/4/64>. Acesso em: 26 jun. 2023.

MEIŠTININKAS, R. *et al.* Potential of Eight Species of Legumes for Heavy Fuel Oil-Contaminated Soil Phytoremediation. **Sustainability**, v. 15, n. 5, p. 1-13, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su15054281>. Acesso em: 04 jun. 2024.

MELLO, L. M. *et al.* Ancient and Current Distributions of *Erythrina crista-galli* L. (Fabaceae) in South America. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.114417>. Acesso em: 16 mai. 2025.

MELO, C. L. *et al.* Contaminação do Lençol Freático pelo Vazamento de Óleo na Refinaria Presidente Getúlio Vargas - REPAR, Município de Araucária, Paraná. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 8, n. 1, p. 13-19, 2003. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/232857>. Acesso em 10 abr. 2025.

MENDOZA-ARROYO, G. E. *et al.* Inorganic Phosphate Solubilization by a Novel Isolated Bacterial Strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and Its Application Potential as Biofertilizer. **Agriculture**, v. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture10090383>. Acesso em: 20 set. 2023.

MENDOZA-SUÁRES, M. *et al.* Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.690567>. Acesso em: 09 dez. 2023.

MIRI, S. *et al.* Recent biotechnological advances in petroleum hydrocarbons degradation under cold climate conditions: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 7, p. 553-586, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1552070>. Acesso em: 24 jun. 2023.

MISHRA, S. *et al.* The emergence of nanotechnology in mitigating petroleum oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 178, p. 1-15, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113609>. Acesso em: 12 set. 2023.

MORALES-CEDENO, L. R. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, v. 242, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>. Acesso em: 17 set. 2023.

MORE, M. M. M. S. *et al.* Symbiotic efficiency and genetic characterization of rhizobia and non rhizobial endophytes associated with cowpea grown in semi-arid tropics of Kenya. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06867>. Acesso em: 25 set. 2023.

MOURA, F. T. *et al.* So many rhizobial partners, so little nitrogen fixed: The intriguing symbiotic promiscuity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Symbiosis**, v. 86, p. 169–185, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13199-022-00831-6>. Acesso em: 29 dez. 2024.

MOURA, F. T. *et al.* The outstanding diversity of rhizobia microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mato Grosso do Sul, central-western Brazil, revealing new *Rhizobium* species. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 325, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03667-w>. Acesso em: 23 jul. 2023.

MOURA, F. T. *et al.* Unveiling remarkable bacterial diversity trapped by cowpea (*Vigna unguiculata*) nodules inoculated with soils from indigenous lands in Central-Western Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 545-562, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-025-01622-z>. Acesso em: fev. 2025.

MOURA, G. G. D. *et al.* Rhizobia Isolated from Coal Mining Areas in the Nodulation and Growth of Leguminous Trees. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, e0150091, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20150091>. Acesso em: 28 dez. 2024.

MSIMBIRA, L. A.; SMITH, D. L. The Roles of Plant Growth Promoting Microbes in Enhancing Plant Tolerance to Acidity and Alkalinity Stresses. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, n. 106, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00106>. Acesso em: 12 dez. 2024.

MULIK, J. *et al.* Tracing the impact and recovery trajectory of oil spill affected tropical rocky intertidal macrobenthic communities using the BOPA index. **Marine Pollution Bulletin**, v. 186, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114435>. Acesso em: 02 set. 2023.

MUS, F. *et al.* Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16>. Acesso em: 26 jul. 2023.

NAKEI, M. D.; VENKATARAMANA, P. B.; NDAKIDEMI, P. A. Soybean-Nodulating Rhizobia: Ecology, Characterization, Diversity, and Growth Promoting Functions. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, n. 824444, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.824444>. Acesso em: 18 dez. 2024.

NANJAREDDY, K. *et al.* Nitrate regulates rhizobial and mycorrhizal symbiosis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 3, p. 281-291, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jipb.12156>. Acesso em: 26 out. 2024.

NARAYANAN, M. *et al.* Evaluation of interaction among indigenous rhizobacteria and *Vigna unguiculata* on remediation of metal-containing abandoned magnesite mine tailing. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1399-1410, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02115-3>. Acesso em: 08 mar. 2025.

NASCIMENTO, E. *et al.* Phenotypic and genomic characterization of phosphate-solubilizing rhizobia isolated from native *Mimosa* and *Desmodium* in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 3321–3334, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01472-1>. Acesso em: 05 jan. 2025.

NASCIMENTO, F. X.; GLICK, B. R.; ROSSI, M. J. Isolation and characterization of novel soil- and plant-associated bacteria with multiple phytohormone-degrading activities using a targeted methodology. **Access Microbiology**, v. 1, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000053>. Acesso em 20 dez 2024.

NASCIMENTO, T. R. *et al.* Co-inoculation of two symbiotically efficient *Bradyrhizobium* strains improves cowpea development better than a single bacterium application. **3 Biotech**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

NETT, R. S.; BENDER, K. S.; PETERS, R. J. Production of the plant hormone gibberellin by rhizobia increases host legume nodule size. **The ISME Journal**, v. 16, n. 7, p. 1809-1817, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01236-5>. Acesso em: 22 dez. 2024.

O'BRIEN, P. L. *et al.* Evaluation of Soil Function Following Remediation of Petroleum Hydrocarbons—a Review of Current Remediation Techniques. **Current Pollution Reports**, v. 3, p. 192–205, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40726-017-0063-7>. Acesso em: 20 set. 2023.

OH, E. T.; RA, J. S.; KIM, S. B. *Paraburkholderia translucens* sp. nov. and *Paraburkholderia sejongensis* sp. nov., isolated from grassland soil and showing plant growth promoting potential. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 74, n. 4, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006347>. Acesso em: 06 jan. 2025.

OKONOFUA, E. S.; LASISI, K. H.; ATIKPO, E. Factorial design study of total petroleum contaminated soil treatment using land farming technique. **Sustainable Environment Research**, v. 31, n. 5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42834-021-00079-7>. Acesso em: 03 set. 2023.

OLDROYD, G. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 252–263, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>. Acesso em: 17 set. 2023.

OLIVEIRA, I. J. *et al.* **Recomendações técnicas para o cultivo de feijão-caupi no estado do Amazonas**. (Circular técnica, n. 71, 30p.) Manaus- AM: Embrapa, 2019.

OLIVEIRA, R. S. *et al.* Improved grain yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) under water deficit after inoculation with *Bradyrhizobium elkanii* and *Rhizophagus irregularis*. **Crop and Pasture Science**, v. 68, n. 11, p. 1052-1059, 2017.

OMENNA, E. C. *et al.* Tolerance, taxonomic and phylogenetic studies of some bacterial isolates involved in bioremediation of crude oil polluted soil in the southern region of Nigeria. **Heliyon**, v. 9, n. 4, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15639>. Acesso em: 21 dez. 2024.

ORJI-ORAEMESI, C., & NJOKU, K. L. Study of the time-efficacy and rate of phytoremediation of crude oil polluted soil by *Vigna unguiculata* (L) Walp. **EQA - International Journal of Environmental Quality**, v. 48, n. 1, p. 41–57, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.6092/issn.2281-4485/14855>. Acesso em: 08 mar. 2025.

OSSAI, I. C. *et al.* Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>. Acesso em: 24 dez. 2024.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. *et al.* Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. **Journal of Environmental Management**, v. 168, p. 175-184, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.058>. Acesso em: 28 out. 2024.

PASSOW1, U.; B. OVERTON, E. B. The Complexity of Spills: The Fate of the Deepwater Horizon Oil. **Annual Review of Marine Science**, v. 13, p. 109-136, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-032320-095153>. Acesso em: 02 set. 2023.

PAULITSCH, F. *et al.* *Paraburkholderia atlantica* sp. nov. and *Paraburkholderia franconis* sp. nov., two new nitrogen-fixing nodulating species isolated from Atlantic forest soils in Brazil. **Arch Microbiol**, v. 202, p. 1369–1380, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01843-w>. Acesso em: 26 nov. 2024.

PAULITSCH, F. *et al.* Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating native *Mimosa gymnas* grown in a South Brazilian ecotone. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p.529-540, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4506-z>. Acesso em: 12 nov. 2023.

PEREIRA, M. C. N. **Cultivo do feijão-caupi no Amazonas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica**; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2010. 33 p. (ABC da Agricultura familiar, 27).

POLIŃSKA, W. *et al.* Insights into the Use of Phytoremediation Processes for the Removal of Organic Micropollutants from Water and Wastewater; A Review. **Water**, v. 13, n. 15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w13152065>. Acesso em: 04 set. 2023.

PRABOWO, A. R.; BAE, D. M. Environmental risk of maritime territory subjected to accidental phenomena: Correlation of oil spill and ship grounding in the *Exxon Valdez's* case. **Results in Engineering**, v. 4, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2019.100035>. Acesso em: 02 set. 2023.

QOMARIYAH, L. *et al.* Bioremediation of heavy metals in petroleum sludge through bacterial mixtures. **Materials Today: Proceedings**, v. 63, n. 1, p. 140-142, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.02.054>. Acesso em: 02 set. 2023.

QUIZA, L; ST-ARNAUD, M; YERGEAU, E. Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00507>. Acesso em: 19 set. 2023.

RAFIQUE, H. M. *et al.* Converging alfalfa (*Medicago sativa* L.) and petroleum hydrocarbon acclimated ACC-deaminase containing bacteria for phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 25, n. 6, p. 717-727, 2023. Disponível em: [10.1080/15226514.2022.2104214](https://doi.org/10.1080/15226514.2022.2104214). Acesso em: 20 set. 2023.

RAHMAN, A. *et al.* Salkowski's Reagent Test as a Primary Screening Index for Functionalities of Rhizobacteria Isolated from Wild Dipterocarp Saplings Growing Naturally on Medium-Strongly Acidic Tropical Peat Soil. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 11, p. 2202-2208, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.100360>. Acesso em: 05 set. 2024.

RAJGURU, B.; SHRI, M.; BHATT, V. D. Exploring microbial diversity in the rhizosphere: a comprehensive review of metagenomic approaches and their applications. **3 Biotech**, v. 14, n. 224, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-024-04065-9>. Acesso em: 17 abr. 2025.

RAMÍREZ, C. A. O. *et al.* Glycerol-assisted degradation of dibenzothiophene by Paraburkholderia sp. C3 is associated with polyhydroxyalkanoate granulation. **Chemosphere**, v. 291, 133054, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133054>. Acesso em: 01 mar. 2025.

RA, T.; ZHAO, Y.; ZHENG, M. Comparative study on the petroleum crude oil degradation potential of microbes from petroleum-contaminated soil and non-contaminated soil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, p. 7127–7136, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2114-z>. Acesso em: 21 jan. 2025.

RATZK, C.; GORE, J. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. **PLOS Biology**, v. 16, n. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004248>. Acesso em: 12 dez. 2024.

RAWAT, P. *et al.* Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 49–68, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>. Acesso em: 14 jun. 2024.

REINPRECHT, Y. *et al.* Enhancing In-crop Diversity in Common Bean by Planting Cultivar Mixtures and Its Effect on Productivity. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, n. 126, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00126>. Acesso em: 20 set. 2023.

REIS-JR, F. B. *et al.* Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>. Acesso em: 16 mai. 2025.

ROJAS-ROJAS, F. U. *et al.* The potential of Paraburkholderia species to enhance crop growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 62, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04256-3>. Acesso em: 21 set. 2024.

RONG, L. *et al.* Activating soil microbial community using bacillus and rhamnolipid to remediate TPH contaminated soil. **Chemosphere**, v. 275, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130062>. Acesso em: 03 set. 2023.

SAEED, M. *et al.* Development of a plant microbiome bioremediation system for crude oil contamination. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105401>. Acesso em 21 set. 2023.

SAEED, Q. *et al.* Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.19, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>. Acesso em: 05 mai. de 2024.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, J. W. M. *et al.* Does the Bradyrhizobium pachyrhizi BR 3262 elite strain overcome the native established soil rhizobial population on cowpea nodules occupation?. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 54, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-40632024v5479675>. Acesso em: 26 jan. 2025.

SARMA, H.; NAVA, A. R.; PRASAD, M. N. V. Mechanistic understanding and future prospect of microbe-enhanced phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 13, p. 318-330, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.12.004>. Acesso em: 03 jul. 2023.

SCHNUG, E.; HANEKLAUS, S.H. **The Enigma of Fertilizer Phosphorus Utilization**. In: SCHNUG, E.; KOK, L. J. Phosphorus in Agriculture: 100% Zero; Springer: Dordrecht, The Netherlands, p. 7–26, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-017-7612-7_2. Acesso: 08 out. 2024.

SENA, P. T. S. *et al.* Molecular, Physiological, and Symbiotic Characterization of Cowpea Rhizobia from Soils Under Different Agricultural Systems in the Semiarid Region of Brazil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p. 1178–1192, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00203-3>. Acesso em: 13 ago. 2024.

SHAMSELDIN, A.; VELÁZQUEZ, E. The promiscuity of Phaseolus vulgaris L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 63, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>. Acesso em: 20 set. 2023.

SHARMA, S. B. *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 587, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>. Acesso: 15 out. 2024.

SHISHKOVA, I. *et al.* Challenges in Petroleum Characterization - A Review. **Energies**, v. 15, n. 20, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en15207765>. Acesso em: 23 mai. 2024.

SILVA, A. V. *et al.* Aptidão edafoclimática e ambientes de produção agrícola da cultura do feijão. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, n. 10, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.36560/131020201114>. Acesso em 20 set. 2023.

SILVA JÚNIOR, E. B. *et al.* Rhizobium Inoculation of Cowpea in Brazilian Cerrado Increases Yields and Nitrogen Fixation. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 2, p. 722-727, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2134/agronj2017.04.0231>. Acesso em: 04 dez. 2023.

SILVA, M. Y. B. Florística e estrutura de uma Formação Pioneira com Influência Flúvio-lacustre 12 Anos após derramamento de óleo, Araucária, Paraná. 2014. 131f. Tese (Programa de Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2014.

SMYKAL, P. *et al.* Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, p. 43-104, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>. Acesso em: 16 jul. 2024.

SOLANKI, A.C.; GURJAR, N.S.; SHARMA, S. A co-inoculação de bactérias não simbióticas *Bacillus* e *Paraburkholderia* pode melhorar o rendimento da soja, a absorção de nutrientes e os parâmetros do solo. **Molecular Biotechnology**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00719-w>. Acesso: 27 mai. 2024.

SOUMARÉ, A. *et al.* Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. **Plants**, v. 9, n. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants9081011>. Acesso em: 19 set. 2023.

SOUZA, M. G. *et al.* STRAINS OF *Paraburkholderia* ORIGINATED FROM RUPESTRIAN FIELDS PROMOTE THE GROWTH OF *Mimosa foliolosa*. **Revista Árvore**, v. 44, 4412, 2020. Disponível: <https://doi.org/10.1590/1806-908820200000012>. Acesso em: 17 mai. 2024.

STEPANOVA, A. Y. *et al.* Bioremediation of Soil from Petroleum Contamination. **Processe**, v. 10, n. 6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr10061224>. Acesso em: 02 jul. 2023.

SUN, R.; CROWLEY, D. E.; WEI, G. Study of phenanthrene utilizing bacterial consortia associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) root nodules. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 415–433, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1796-8>. Acesso em: 08 mar. 2025.

SUN, R. *et al.* Effects of cowpea (*Vigna unguiculata*) root mucilage on microbial community response and capacity for phenanthrene remediation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 33, p. 45-59, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.11.013>. Acesso em: 08 mar. 2025.

SWARNALAKSHMI, K. *et al.* Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production. **Plants**, v. 9, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants9111596>. Acesso em: 20 set. 2023.

TAIZ, L. *et al.* **Fundamentos de fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2021. 558p.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis us ing maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and**

evolution, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>. Acesso em: 18 nov. 2023.

TANG, J. *et al.* Biosynthetic Pathways and Functions of Indole-3-Acetic Acid in Microorganisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/8/2077>. Acesso em: 07 jun 2024.

TAO, Z. *et al.* Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 151-166. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/jmb.2207.07057>. Acesso em: 06 fev. 2025.

TAPIA-GARCÍA, E. Y. *et al.* Plant growth-promoting bacteria isolated from wild legume nodules and nodules of Phaseolus vulgaris L. trap plants in central and southern Mexico. **Microbiological Research**, v. 239, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126522>. Acesso em: 03 set. 2023.

THIEBAUT, F. *et al.* The impact of non-nodulating diazotrophic bacteria in agriculture: understanding the molecular mechanisms that benefit crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms231911301>. Acesso em: 17 set. 2023.

TIMOFEEVA, A.; GALYAMOVA, M.; SEDYKH, S. Prospects for Using Phosphate-Solubilizing Microorganisms as Natural Fertilizers in Agriculture. **Plants**, v. 11, n. 16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11162119>. Acesso: 08 out. 2024.

UYIZEYE, O. C.; THIET, R. K.; KNORR, M. A. Effects of community-accessible biochar and compost on diesel-contaminated soil. *Bioremediation Journal*, v. 23, n. 2, p. 107-117, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10889868.2019.1603139>. Acesso em: 08 fev. 2025.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, UK: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

WALKER, L.; LAGUNAS, B.; GIFFORD, M. L. Determinants of Host Range Specificity in Legume-Rhizobia Symbiosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 585749, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585749>. Acesso em: 11 ago. 2023.

WAN, W. *et al.* Responses of the rhizosphere bacterial community in acidic crop soil to pH: Changes in diversity, composition, interaction, and function. **Science of The Total Environment**, v. 700, 134418, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134418>. Acesso em: 12 dez 2024.

WAN, Z.; CHEN, J. Human errors are behind most oil-tanker spills. **Nature**, v. 560, p. 161-163, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05852-0>. Acesso em: 22 jun. 2023.

WANG, A. *et al.* Synergetic effects of microbial-phytoremediation reshape microbial communities and improve degradation of petroleum contaminants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 429, p. 1-14, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128396>. Acesso em: 16 jun. 2024.

WANG, M. *et al.* Distributions and sources of petroleum, aliphatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from Bohai Bay and its adjacent river, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 90, n. 1–2, p. 88–94, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.017>. Acesso em: 07 fev. 2024.

WANG, Q.; LIU, J.; ZHU, H. Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 313. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313>. Acesso em: 06 dez. 2023.

WANG, S. *et al.* Advances in research on petroleum biodegradability in soil. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 23, p. 9–27, 2021. Disponível em: 10.1039/D0EM00370K. Acesso em: 03 set. 2023.

WANG, T. *et al.* Unlocking the potential of alkalizing bacteria in cadmium remediation: Unveiling mechanisms and efficacy. **Environmental Technology & Innovation**, v. 36, 103787, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103787>. Acesso em: 12 dez. 2024.

WANG Y. *et al.* Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge Wetland of China. **Chinese Geographical Science**, v. 23, n. 6, p. 708–715, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11769-013-0641-6>. Acesso em: 14 mar. 2024.

WEEKS, J. J.; HETTIARACHCHI, G. M. A Review of the Latest in Phosphorus Fertilizer Technology: Possibilities and Pragmatism. **Journal of Environmental Quality**, v. 48, n. 5, p. 1300–1313, 2019. Disponível em: doi: 10.2134/jeq2019.02.0067. Acesso: 08 out. 2024.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487–511, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1093/jxb/52.suppl_1.487. Acesso em: 19 set. 2023.

WU, M. *et al.* Bioremediation of hydrocarbon degradation in a Petroleum contaminated soil and microbial population and activity determination. **Chemosphere**, v.169, p.124–130, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.059>. Acesso em: 22 ago. 2024.

WU, B. *et al.* Degradation of crude oil in a co-culture system of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132831>. Acesso em: 26 jul. 2023.

XIANG, Y., MORGAN, S. L.; WATT, B. E. TPH and BTEX Quantitation in Gasoline and Diesel Contaminated Soils by Capillary Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 33, n. 3, p. 98–108, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/chromsci/33.3.98>. Acesso em: 08 mar. 2025.

XIAO, F. *et al.* Systematic review on marine carbon source-mannitol: Applications in synthetic biology. **Microbiological Research**, v. 289, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127881>. Acesso em: 24 fev. 2024.

XIONG, Q. *et al.* Relationship between Plant Roots, Rhizosphere Microorganisms, and Nitrogen and Its Special Focus on Rice. **Agriculture**, v. 11, 234, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture11030234>. Acesso em: 15 jun. 2024.

XU, X. *et al.* Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2885, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>. Acesso em: 14 set. 2023.

VANWIJNSBERGHE, S. *et al.* Genomic Aromatic Compound Degradation Potential of Novel Paraburkholderia Species: Paraburkholderia domus sp. nov., Paraburkholderia haematera sp. nov. and Paraburkholderia nemoris sp. nov. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22137003>. Acesso em: 01 mar. 2025.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277-286, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>. Acesso em: 02 set. 2023.

VIO, S. A. *et al.* Paraburkholderia. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, p. 271–311, 2020. Disponível em: [doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00015-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00015-0). Acesso em: 06 out. 2023.

YAHAYA, S. M. *et al.* Recent advances in the chemistry of nitrogen, phosphorus and potassium as fertilizers in soil: A review. **Pedosphere**, v. 33, n. 3, p. 385-406, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.07.012>. Acesso: 08 out. 2024.

YANG, Y. *et al.* Research progress in bioremediation of petroleum pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 46877–46893, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15310-6>. Acesso em: 09 mai. 2024.

YATES, R. J. *et al.* Authentication of rhizobia and assessment of the legume symbiosis in controlled plant growth systems. In: HOWIESON, J.G., DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, p. 73-108, 2016.

YEREMKO, L. *et al.* Role of Environmental Factors in Legume-Rhizobium Symbiosis: A Review. **Biomolecules**, v. 15, 118, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom15010118>. Acesso em: 06 fev. 2025.

YU, H. *et al.* Soil amendment with sorbitol and mannitol changes the soil microbial community and its enzymatic activities. **Journal of Soils and Sediments**, v. 23, 1857–1876 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11368-022-03394-7>. Acesso em: 24 fev. 2025.

YU, Z. *et al.* Auxin signaling: Research advances over the past 30 years. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 64, n. 2, p. 371-392, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jipb.13225>. Acesso em: 05 jun. 2024.

ZHALNINA, K. *et al.* Soil pH Determines Microbial Diversity and Composition in the Park Grass Experiment. **Microbial Ecology**, v. 69, p. 395-406, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0530-2>. Acesso em 12 dez. 2024.

ZHANG, B. X. *et al.* Characterization and synthesis of indole-3-acetic acid in plant growth promoting Enterobacter sp. **RSC Advances**, v. 11, p. 31601–31607, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D1RA05659J>. Acesso em: 07 jun. 2024.

ZHANG, H. *et al.* Non-thermal plasma technology for organic contaminated soil remediation: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 157-170, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.067>. Acesso em: 04 set. 2023.

ZHANG, M. *et al.* Melatonin and Indole-3-Acetic Acid Synergistically Regulate Plant Growth and Stress Resistance. **Cells**, v. 11, n. 20, 3250, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11203250>. Acesso em: 18 nov. 2023.

ZHANG, X. *et al.* Bioremediation of petroleum hydrocarbons by alkali-salt-tolerant microbial consortia and their community profiles. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, p. 809–817, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.6594>. Acesso em: 12 dez. 2024.

ZHANG, X. *et al.* Combined microbial degradation of crude oil under alkaline conditions by *Acinetobacter baumannii* and *Talaromyces* sp. **Chemosphere**, v. 273, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129666>. Acesso em: 11 dez. 2023.

ZHANG Y. *et al.* Fertilization Shapes Bacterial Community Structure by Alteration of Soil pH. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 1325, 2017. Disponível em: [doi: 10.3389/fmicb.2017.01325](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01325). Acesso em: 18 mai. 2024.

ZHAO, G. *et al.* Screening, Identification and Growth-Promotion Products of Multifunctional Bacteria in a Chinese Fir Plantation. **Forests**, v. 12, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/f12020120>. Acesso em: 16 mar. 2024.

ZHAO, X. *et al.* Biochar enhanced polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in soil planted with ryegrass: Bacterial community and degradation gene expression mechanisms. **Science of the Total Environment**, v. 838, p. 1-7, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156076>. Acesso em: 25 set. 2024.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. **Science of The Total Environment**, v. 612, p. 522-537, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>. Acesso em: 12 jul. 2024.

ZOFFOLI B. C. *et al.* Early nitrogen supplementation stimulates the nodulation and growth of common bean plants inoculated with rhizobium. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 43, n. 1, e55105, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.55105>. Acesso em: 24 out. 2024.