



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
DOUTORADO EM AGRONOMIA

**SIDNEY DANIEL ARAÚJO DA COSTA**

***Bacillus subtilis* associado a *Trichoderma asperellum* e seus efeitos na morfometria,  
uso dos nutrientes e fisiologia de capim Marandu**

**BELÉM**

**2022**

**SIDNEY DANIEL ARAÚJO DA COSTA**

***Bacillus subtilis* associado a *Trichoderma asperellum* e seus efeitos na morfometria, uso dos nutrientes e fisiologia de capim Marandu**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisele Barata da Silva Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Carvalho da Silva.

**BELÉM**

**2022**

**SIDNEY DANIEL ARAÚJO DA COSTA**

***Bacillus subtilis* associado a *Trichoderma asperellum* e seus efeitos na morfometria, uso dos nutrientes e fisiologia de capim Marandu** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia

**Banca examinadora**

Documento assinado digitalmente  
GISELE BARATA DA SILVA  
Data: 24/01/2023 10:57:30-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Barata da Silva- Presidente  
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA

---

Dr<sup>a</sup> Alessandra Keiko Nakasone- 1º examinador  
Embrapa Amazônia Oriental- EMBRAPA



Documento assinado digitalmente  
DALTON DIAS DA SILVA JUNIOR  
Data: 24/01/2023 18:07:02-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr. Dalton Dias da Silva Júnior- 2º examinador  
Universidade Federal do Amazonas- UFAM



Documento assinado digitalmente  
ANTONIO CLEMENTINO DOS SANTOS  
Data: 27/01/2023 16:56:34-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr. Antonio Clementino dos Santos - 3º examinador  
Universidade Federal do Norte do Tocantins– UFNT



Documento assinado digitalmente  
GLEDSON LUIZ SALGADO DE CASTRO  
Data: 30/01/2023 10:24:36-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr. Gledson Luiz Salgado de Castro - 4º examinador  
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA

## Resumo Geral

O capim Marandu *Urochloa* (Syn *Brachiaria*) *brizantha* é uma forrageira de elevada importância e possui grandes extensões de áreas no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de bioestimulantes no uso eficiente dos nutrientes, aprimorar o aparato fotossintético e proporcionar maior crescimento de plantas. O experimento foi realizado em casa de vegetação. Foram realizados três experimentos de forma independente avaliando as reduções de nitrogênio (Experimento 1), fósforo (Experimento 2) e potássio (Experimento 3), inoculados ou não. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 com cinco repetições. Os fatores avaliados foram: taxa de fertilizantes mineral: 0, 25, 50, 75 e 100% da dose recomendada e inoculação com microrganismos promotores de crescimento: não inoculado, inoculado com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e coinoculado com *Trichoderma asperellum* composto pelos isolados (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) e *Bacillus subtilis* (MIX). A inoculação foi feita via rega e aos 35 dias após a emergência e foram mensurados parâmetros biométricos: Altura da planta, comprimento de raiz, massa seca de folha e raiz e foram calculados: a taxa de aparecimento foliar, taxa de alongamento foliar, área foliar. As folhas foram coletadas e analisadas quanto a composição de nitrogênio, fósforo e potássio. O uso eficiente dos nutrientes foi calculado a partir da eficiência agrônômica, eficiência fisiológica, eficiência de recuperação e eficiência de resposta dos nutrientes. Os melhores tratamentos e doses de nitrogênio, fósforo e potássio encontrados no primeiro ensaio, foi realizado novo experimento, em casa de vegetação, utilizando esses resultados. Os tratamentos foram: plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK (C), plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK (C+) e plantas coinoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) e *Bacillus subtilis* e adubadas com dose reduzida de NPK (MIX). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com dez repetições. Foram avaliadas as trocas gasosas a partir da assimilação de CO<sub>2</sub>, eficiência instantânea de carboxilação, condutância estomática e taxa de transpiração. A fluorescência da clorofila a foi determinada a partir da atividade potencial dos centros de reação do fotossistema II (PSII), coeficientes de extinção fotoquímica, taxa de transferência de elétrons, eficiência fotoquímica efetiva do PSII e coeficientes de extinção não fotoquímica. Foi medido o conteúdo total de clorofila com o auxílio do clorofilometro e quantificado o conteúdo de clorofila *a*, *b* e total, assim como também foi feito a quantificação de carboidratos solúveis: Glicose, Sacarose, Frutose e Amido. Foi avaliado os parâmetros de crescimento a partir da altura de planta, comprimento de raiz, massa seca da folha e raiz e calculado a área foliar e taxa de alongamento foliar. Foi quantificado o conteúdo de nutrientes das folhas: nitrogênio, fósforo e potássio. Os resultados demonstraram que a coinoculação e doses incrementou a área foliar, altura de planta, taxa de alongamento e aparecimento foliar para nitrogênio e potássio, enquanto para fósforo a interação foi significativa para massa seca de raiz. O efeito isolado da inoculação nas doses de nitrogênio proporcionou incremento na massa seca de raiz e folha, no comprimento de raiz e na taxa de alongamento foliar. Nas doses de fósforo, o efeito isolado da inoculação gerou incremento na massa seca de raiz, folha, altura, comprimento de raiz e taxa de alongamento foliar. Nas doses de potássio a coinoculação gerou incremento na massa seca de raiz, comprimento de raiz, na altura de planta, na área foliar e de na taxa de alongamento foliar. A inoculação e coinoculação apresentou incrementos significativos em todos os índices de uso eficiente do nutriente. O conteúdo nutricional em função da coinoculação gerou incremento no conteúdo de nitrogênio, de fósforo e de potássio. Os resultados mostraram que a coinoculação proporcionou incrementos na assimilação de CO<sub>2</sub>, eficiência instantânea de carboxilação, na condutância estomática e na transpiração. O conteúdo de

clorofilas, tiveram incremento na clorofila *a*, clorofila *b* e na soma das clorofilas. O conteúdo de carboidratos solúveis apresentou incremento de glicose, sacarose, frutose e amido. O conteúdo nutricional de plantas coinoculadas tiveram incremento em nitrogênio, fósforo e em potássio. É possível afirmar que a aplicação dos biopromotores de forma coinoculada foram responsáveis por aumentar o uso eficiente dos nutrientes, aprimorar o aparato fotossintético, aumentar o crescimento das plantas, proporcionado maior eficiência na aquisição de água e nutrientes e na transformação de energia em ganhos produtivos. É possível afirmar que *B. subtilis* e *T. asperellum* podem ser usados como inoculantes em capim Marandu, pois aumenta o crescimento da planta, uso eficiente dos nutrientes e aprimora o aparato fotossintético.

**Palavras-chave:** Biofertilizantes, Forragem, NUE, PGPM

## Abstract

Marandu grass *Urochloa* (Syn *Brachiaria*) *brizantha* is a forage of high importance and has large areas in Brazil. The objective of this work was to make available the effects of biostimulants in the efficient use of nutrients, improve the photosynthetic apparatus and provide greater plant growth. The experiment was carried out in a greenhouse. Three experiments were carried out independently, evaluating the reductions of alcohol (Experiment 1), phosphorus (Experiment 2) and potassium (Experiment 3), inoculated or not. The experimental design was completely randomized in a 5 x 3 factorial scheme with five replications. The evaluated factors were: Mineral fertilizer rate: 0, 25, 50, 75 and 100% of the recommended dose and inoculation with growth promoting microorganisms: non-inoculated, inoculated with *Bacillus subtilis* (UFRA-92) and coinoculated with *Trichoderma asperellum* composed of the isolates (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 and UFRA-52) and *Bacillus subtilis* (MIX). Inoculation was done via irrigation and 35 days after emergence and biometric parameters were measured: plant height, root length, leaf and root dry mass and were calculated: leaf appearance rate, leaf elongation rate, leaf area. The leaves were collected and remained for the composition of bacteria, phosphorus and potassium. Nutrient use efficiency was calculated from agronomic efficiency, regulatory efficiency, recovery efficiency and nutrient response efficiency. The best treatments and doses of nitrogen, phosphorus and potassium found in the first test, a new experiment was carried out, in a meditation house, using these results. The treatments were: non-inoculated plants fertilized with a reduced dose of NPK (C), non-inoculated plants fertilized with a maximum dose of NPK (C+) and plants co-inoculated with *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 and UFRA-52) and *Bacillus subtilis* and fertilized with reduced dose of NPK (MIX). The experimental design was completely randomized (DIC) with ten replications. Gas exchanges from CO<sub>2</sub> assimilation, instantaneous carboxylation efficiency, stomatal conductance and transpiration rate were evaluated. Chlorophyll fluorescence was determined from the potential activity of photosystem II (PSII) reaction centers, photochemical extinction coefficients, electron transfer rate, effective photochemical efficiency of PSII, and non-photochemical extinction coefficients. The total chlorophyll content was measured with the aid of a chlorophyll meter and the chlorophyll a, b and total content was quantified, as well as the quantification of soluble carbohydrates: Glucose, Sucrose, Fructose and Starch. Growth parameters were evaluated from plant height, root length, leaf and root dry mass and calculated leaf area and leaf elongation rate. The nutrient content of the leaves was quantified: nitrogen, phosphorus and potassium. The results showed that coinoculation and doses increased leaf area, plant height, elongation rate and leaf appearance for nitrogen and potassium, while for phosphorus the interaction was significant for root dry mass. The isolated effect of inoculation on nitrogen doses provided an increase in root and leaf dry mass, root length and leaf elongation rate. In phosphorus doses, the isolated effect of inoculation generated an increase in root and leaf dry mass, height, root length and leaf elongation rate. At potassium doses, coinoculation increased root dry mass, root length, plant height, leaf area and leaf elongation rate. Inoculation and coinoculation showed significant increases in all indices of efficient use of the nutrient. The nutritional content as a function of coinoculation generated an increase in the content of nitrogen, phosphorus and potassium. The results showed that coinoculation provided increases in CO<sub>2</sub> assimilation, instantaneous carboxylation efficiency, stomatal conductance and transpiration. The chlorophyll content had an increase in chlorophyll a, chlorophyll b and in the sum of chlorophylls. The content of soluble carbohydrates showed an increase in glucose, sucrose, fructose and starch. The nutritional content of co-inoculated plants had an increase in nitrogen, phosphorus and potassium. It is possible to state that the

application of biopromoters in a coinoculated form was responsible for increasing the efficient use of nutrients, improving the photosynthetic apparatus, increasing plant growth, providing greater efficiency in the acquisition of water and nutrients and in the transformation of energy into productive gains. It is possible to state that *B. subtilis* and *T. asperellum* can be used as inoculants in Marandu grass, as it increases plant growth, efficient use of nutrients and improves the photosynthetic apparatus.

**Keywords:** Biofertilizers, Forage, NUE, PGPM

## Lista de figuras

### Capítulo 1

Figura 1: Altura (a), taxa de aparecimento foliar (b) e área foliar (c) com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX) em função de doses de nitrogênio em capim Marandu.

.....26

Figura 2: Massa seca da raiz com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX) em função de doses de fósforo em capim Marandu..... 26

Figura 3: Altura (a), área foliar (b) e taxa de alongamento foliar (c) com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX) em função de doses de potássio em capim Marandu..... 27

Figura 4: Massa seca da folha (a), massa seca da raiz (b), comprimento de raiz (c) e taxa de alongamento foliar (d) em função de doses reduzidas de nitrogênio em capim Marandu.

.....28

Figura 5: Altura (a) massa seca da parte aérea (b), comprimento de raiz (c), área foliar (d), taxa de alongamento foliar (e) e taxa de aparecimento foliar (e) em função das doses reduzidas de fósforo em capim Marandu. ....29

Figura 6: Altura (a), massa seca de raiz (b), comprimento de raiz (c) e taxa de aparecimento foliar (d) em função das doses reduzidas de potássio em capim Marandu.

.....30

Figura 7: Conteúdo nutricional foliar do controle não inoculado (100%), com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX) associados a 75% de N, 50% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 50% de K<sub>2</sub>O em capim Marandu. Analisado pelo teste t (p<0,5)..... 31

### Capítulo 2

**Figura 1:** Taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), eficiência instantânea de carboxilação (B), condutância estomática (C) e taxa de transpiração (D) em folhas de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK (p<0.05). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK. ....50

**Figura 2:** Atividade potencial dos centros de reação do PSII (A), coeficientes de extinção fotoquímica (B), taxa de transferência de elétrons (C), eficiência fotoquímica efetiva do PSII (D) e coeficientes de extinção não fotoquímica (E) em folhas de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK (p<0.05). C = Plantas não inoculadas e adubadas com

dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK. ....57

**Figura 3:** Índice SPAD(A), conteúdo de clorofila *a* (B), clorofila *b* (C), e clorofila total *a+b* (D) de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK. .... 58

**Figura 4:** Concentrações de glicose (A), sacarose (B), frutose (C) e amido (D) de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK. ....59

**Figura 5:** Altura (A), área foliar (B), comprimento de raiz (C) e massa seca da folha (D) de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK. .... 60

**Figura 6:** Conteúdo nutricional de nitrogênio (A), fósforo (B) e potássio (K) de folha de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK. .... 61

## Listas de Tabelas

### Capítulo 1

**Tabela 1.** Propriedades químicas do solo antes da adubação na profundidade de 0-20 cm  
.....23

**Tabela 2:** Valor de P para as variáveis biométricas em função dos tratamentos  $p < 0.05$   
.....25

Tabela 3: Parâmetros biométricos do controle não inoculado (100% de N,  $P_2O_5$ ,  $K_2O$ ), com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX), associados a 75% de N, 50% de  $P_2O_5$  e 50% de  $K_2O$  em capim Marandu. .... 58

Tabela 4: Índices de eficiência agrônômica (EA), eficiência fisiológica (EF), eficiência de recuperação aparente (ERA) e eficiência de resposta do nutriente (ERN) do controle

não inoculado (100% de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O), com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX), associados a 75% de N, 50% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 50% de K<sub>2</sub>O em capim Marandu. ....32

## Capítulo 2

**Tabela 1.** Propriedades químicas do solo antes da adubação na profundidade de 0-20 cm  
.....50

CONTEXTUALIZAÇÃO .....	13
REFERÊNCIAS .....	16
Capítulo 1 Aceito e formatado para publicação: Applied and Environmental Soil Science.....	19
Coinoculação de <i>Trichoderma asperellum</i> com <i>Bacillus subtilis</i> na promoção de crescimento e absorção de nutrientes em Capim Marandu .....	19
RESUMO .....	19
ABSTRACT .....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. METODOLOGIA.....	23
2.1 Caracterização da área experimental .....	23
2.2 Preparo e inoculação dos isolados .....	24
2.3 Design experimental .....	24
2.4 Substrato e semeadura .....	25
2.5 Fertilização mineral .....	25
2.6 Análise morfofogenética e biométrica .....	25
2.7 Análise Nutricional.....	26
2.8 Uso Eficiente de Nutrientes (UEN) .....	26
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
3. RESULTADOS .....	27
3.1 Parâmetros de crescimento .....	27
3.2 Composição química .....	34
3.4 Uso eficiente dos nutrientes (UEN).....	35
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÃO.....	44
Coinoculação de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> e sua influência no crescimento e aspectos fisiológicos de capim Marandú .....	51
Resumo .....	51
Abstract.....	52
1. Introdução.....	53
2. Metodologia .....	54
2.1 Delineamento experimental.....	55
2.2 Preparo e coinoculação dos isolados .....	55
2.3 Variáveis fisiológicas .....	56
2.3.1 Índice SPAD.....	56
2.3.2 Trocas gasosas.....	56

	12
2.3.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	56
2.3.4 Conteúdo de Clorofila .....	57
2.3.5 Quantificação de Amido.....	57
2.3.6 Quantificação de carboidratos solúveis.....	58
2.4 Parâmetros de crescimento.....	59
2.5 Parâmetros nutricionais .....	59
2.6 Análise estatística .....	59
3 Resultados.....	59
Trocas gasosas .....	59
Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	61
Índice SPAD e conteúdo de clorofilas.....	62
Conteúdo de carboidratos solúveis .....	62
Parâmetros de crescimento .....	64
Conteúdo Nutricional .....	65
Discussão .....	66
4 Conclusão .....	73
5 Referências .....	74

## CONTEXTUALIZAÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de carne bovina, encerrando o ano de 2020 com a produção de 10, 8 milhões de toneladas e previsão de 11 milhões de toneladas para 2021 (USDA, 2021). A pecuária brasileira é uma atividade econômica e prática, pois cria a maior parte do seu rebanho a pasto (Jank *et al.*, 2014), tornando o sistema de produção menos oneroso, quando comparado a sistema de manejo intensivo, e mais eficaz em ocupar grandes extensões de área. A pecuária, a pasto, é historicamente utilizada para ocupar fronteiras agrícolas no país (Dias-Filho, 2013).

De acordo com estudos recentes, a área cultivada com pastagem é em torno de 120 milhões de hectares, dos quais 86 milhões é utilizado o gênero *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) (Hungria *et al.*, 2021). No entanto, por volta de 70% dessas áreas estão com algum nível de degradação, prejudicando a qualidade da pastagem (Costa *et al.*, 2020). A baixa adaptabilidade da cultivar, erosão, lixiviação, não reposição dos nutrientes extraídos pela cultura e conseqüentemente perda de fertilidade do solo, são problemas relacionado a atividade pecuária (Tavanti *et al.*, 2020).

Os problemas relatados, em muitos casos, tentam ser sanados com o uso indiscriminado de fertilizantes minerais (Vieira *et al.*, 2021). No entanto, o uso intensivo pode ocasionar problemas nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Pandey; Diwan. 2021), assim como contaminação do lençol freático (Srivastav. 2020; Zhang *et al.*, 2020). A utilização de fertilizantes inorgânicos, em excesso, aumenta a decomposição da matéria orgânica do solo, eleva a emissão de gases, reduz a quantidade de microrganismos e aumentam o conteúdo de soluto (sal), que comprometem o potencial osmótico da solução do solo e conseqüentemente alteram a absorção de água pela planta (Bhatt; Labanya; Joshi. 2019).

A partir desse cenário, é necessário a utilização de tecnologias sustentáveis visando a conservação do meio ambiente, assim como evitar o desmatamento de novas áreas para plantio de pastagens, reduzir os custos de adubação, os quais são responsáveis pelo alto custo de produção (Dias-Filho, 2011). Nesta nova perspectiva de produção, a qual visa o aumento da produtividade nas áreas já utilizadas, o uso de inoculantes microbianos com características promotoras de crescimento tornam-se uma alternativa viável para alcançar esse objetivo (Timmusk *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2020).

O uso de microrganismos promotores de crescimento inoculados a planta promove aumento da produção de hormônios, que são responsáveis pela promoção de crescimento, tais como auxina e giberelina (Xu *et al.*, 2020; Hakim *et al.*, 2021). As modificações ocorridas em virtude dessa associação resultam em melhorias na absorção de água, sais minerais e tolerância a estresses abióticos (Araújo *et al.*, 2020; Aboelmagd. 2021), além da indução de resistência a patógenos (Atakan; Ozkaya. 2021). A utilização de microrganismos promotores de crescimento nas culturas de interesse pode ser benéfica, principalmente sob condições em que o solo se encontra com a fertilidade baixa, pois a partir da síntese de hormônios vegetais o crescimento radicular aumenta, o que permite maior exploração por água e nutrientes, assim como mecanismos diretos ligados a maior disponibilização de nitrogênio, fósforo e potássio (Hungria *et al.*, 2016).

Os biopromotores são responsáveis pela melhoria na absorção do fertilizante mineral, contribuindo para o aumento do crescimento radicular e aéreo (Elhaisoufi *et al.*, 2020). Nesse sentido, pode ser um mecanismo alternativo visando a redução de aplicação de adubos minerais no solo (Vijayakumar; Ramaiyan; Balasubramanian. 2021). Estudos anteriores já demonstraram os benefícios encontrados a partir dessa associação não só na melhoria da absorção de nutrientes, mas também como supressores de doenças como *Rhizoctonia solani* em arroz (França *et al.*, 2015) e melhorias em características morfológicas em arroz (Rêgo *et al.*, 2014).

A inoculação de pastagens tem mostrado benefícios, no que tange a redução de adubo mineral, incrementos na biomassa da planta. A inoculação de capim marandu com *Azospirillum braziliense* proporcionou incrementos significativos em altura de planta e biomassa radicular (Leite *et al.*, 2018), assim como em capim mombasa associados a doses de N (Leite *et al.*, 2019). A coinoculação de cultivar BRS piatã com *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia pyrrocinia* proporcionaram incrementos significativos na altura de planta, número de folhas e na taxa de alongamento e aparecimento foliar (Lopes *et al.*, 2018).

Os benefícios da inoculação com *Trichoderma* também são vistos no incremento de clorofila, ligado a maior absorção de N, em plantas de arroz que receberam 25% a menos da dose recomendada (Khan, 2018). A inoculação com o *Trichoderma* sp. em *Agrostis stolonifera*, pertencente a família *Poaceae*, proporcionou incrementos significativos no conteúdo de clorofila, número de folhas e conteúdo de N (Lee *et al.*,

2015), mostrando os benefícios da inoculação com microrganismos promotores de crescimento.

Outros estudos utilizando fungos coinoculados com bactérias também se mostrou uma ferramenta eficiente na produção sustentável (Baum *et al.*, 2015). Tendo em vista que a ação conjunta de dois microrganismos potencializa os efeitos no crescimento da planta. A atividade mútua, em função do sinergismo, entre fungos e bactérias contribui para o crescimento da planta, absorção de nutrientes e proteção da planta a condições adversas (Ortas *et al.*, 2017).

Nas regiões tropicais, as gramíneas de origem africana dos gêneros (*Megathyrsus* spp, *Urochloa* spp, e *Pennisetum* spp) são as mais usadas em pastagens. Em busca de manejo mais eficiente e que atenda às necessidades de produção e conservação dos pastos já existentes, o uso de agentes promotores de crescimento de plantas, serão utilizados isolados e coinoculados no capim Marandu.

## REFERÊNCIAS

- Aboelmagd, H. E. (2021). Efficacy of some bio-agents, chemical inducers and fungicides in controlling tomato root rot disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 59(2), 197-210. doi: 10.21608/assjm.2021.194261
- Araújo, V. C., Rossati, K. F., Xavier, L. V., de Oliveira, V. A., dos Santos Carmo, G. J., de Assis, G. A., & de Oliveira Mendes, G. (2020). Enhanced growth in nursery of coffee seedlings inoculated with the rhizosphere fungus *Aspergillus niger* for field transplantation. *Rhizosphere*, 15, 100236. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100236>
- Atakan, A; Ozkaya, H. O. (2021). Induced resistance to fusarium wilt in carnation with mixture of mycorrhizal fungi. *Fresenius environmental bulletin*, 30(4 A), 4217-4227.
- Costa, C. M., da Costa, A. B. G., de Farias Theodoro, G., dos Santos, G., Difante, A. L. C. G., Santana, J. C. S; de Almeida, E. M. (2020). The 4R management for nitrogen fertilization in tropical forage: A review. *Australian Journal of Crop Science*, 14(11), 1834-1837. doi: 10.21475/ajcs.20.14.11. p2646.
- Dias-filho, M. B. Recuperação de pastagens e segurança alimentar: uma abordagem histórica da pecuária na Amazônia. Bebedouro: Editora Scot Consultoria, 2013.
- Dias-filho, M.B. Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação. 4. Ed., rev. atual. e ampl. Belém, PA. 2011.
- Elhaissofi, W., Khourchi, S., Ibnasser, A., Ghoulam, C., Rchiad, Z., Zeroual, Y; Bargaz, A. (2020). Phosphate solubilizing rhizobacteria could have a stronger influence on wheat root traits and aboveground physiology than rhizosphere P solubilization. *Frontiers in plant science*, 11, 979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00979>
- França, S. K. S., Cardoso, A. F., Lustosa, D. C., Ramos, E. M. L. S., De Filippi, M. C. C; DA SILVA, G. B. (2015). Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. *Agronomy for sustainable development*, 35(1), 317-324. DOI 10.1007/s13593-014-0244-3
- Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R; Imran, A. (2021). Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 16. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.617157>
- Hungria, M., Nogueira, M. A; Araujo, R. S. (2016). Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 221, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>
- Hungria, M., Rondina, A. B. L., Nunes, A. L. P., Araujo, R. S; Nogueira, M. A. (2021). Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. *Plant and Soil*, 463(1), 171-186. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04908-x>
- Jank, L., Barrios, S. C., do Valle, C. B., Simeão, R. M; Alves, G. F. (2014). The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop and Pasture Science*, 65(11), 1132-1137. <https://doi.org/10.1071/CP13319>

- Lee, J. J., Kim, Y. S., Ham, S. K., Lee, C. E; Lee, G. J. (2015). Growth and quality improvement of Creeping Bentgrass by two fertilizers containing Trichoderma species. *Weed & Turfgrass Science*, 4(3), 249-255. <https://doi.org/10.5660/WTS.2015.4.3.249>
- Leite, R. D. C., dos Santos, J. G., Silva, E. L., Alves, C. R., Hungria, M., Leite, R. D. C; dos Santos, A. C. (2018). Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. *Crop and Pasture Science*, 70(1), 61-67. <https://doi.org/10.1071/CP18105>
- Leite, R. D. C., Santos, A. C. D., Santos, J. G. D. D., Leite, R. D. C., Oliveira, L. B. T. D; Hungria, M. (2019). Mitigation of mombasa grass (*Megathyrsus maximus*) dependence on nitrogen fertilization as a function of inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 43. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20180234>
- Lopes, m. D. S., dias filho, m. B., castro, t. D. R., da Silva, E. F., Rêgo, M. C. F; da Silva, G. B. (2020). Impacts of plant growth-promoting rhizobacteria on tropical forage grass in Brazil. *Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1120640>
- Mal, B., Mahapatra, P. Mohanty, S. (2015). Effect of diazotrophs and chemical fertilizers on production and economics of okra (*Abelmoschus esculentus*, L.) cultivars. *American Journal of Plant Sciences*. DOI:10.4236/ajps.2014.51022
- Pandey, C; Diwan, H. (2021). Assessing fertilizer use behaviour for environmental management and sustainability: a quantitative study in agriculturally intensive regions of Uttar Pradesh, India. *Environment, Development and Sustainability*, 23(4), 5822-5845. <https://doi.org/10.1007/s10668-020-00848-1>
- Rêgo, M.C.F., Borges, F.I., Filippi, M.C.C., Gonçalves, L.A., Silva, G.B. Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. *J. Botany*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/818797>
- Srivastav, A. L. (2020). Chemical fertilizers and pesticides: Role in groundwater contamination. In *Agrochemicals detection, treatment and remediation* (pp. 143-159). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00006-4>
- Tavanti, R. F. R., Montanari, R., Panosso, A. R., La Scala Jr, N., Neto, M. C., da Silva Freddi, O; Galindo, F. S. (2020). What is the impact of pasture reform on organic carbon compartments and CO2 emissions in the Brazilian Cerrado. *Catena*, 194, 104702. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104702>
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A; Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in plant science*, 8, 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- USDA, 2021. United States Department of Agriculture. Production, supply and distribution online. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads> (acessado em 08/06/2021).
- Vieira, A. S., do Valle Junior, R. F., Rodrigues, V. S., da Silva Quinaia, T. L., Mendes, R. G., Valera, C. A; Pacheco, F. A. L. (2021). Estimating water erosion from the brightness index of orbital images: A framework for the prognosis of degraded pastures. *Science of The Total Environment*, 776, 146019.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146019>

Vijayakumar, P., Ramaiyan, S; Balasubramanian, R. A. B. (2021). Soil fertility and nutrient uptake of rice influenced by Plant Growth Promoting Microbes, Seaweed extract and Humic acid fortified in situ rice residue compost. *International journal of recycling organic waste in agriculture*. DOI: 10.30486/IJROWA.2021.1916550.1169

Xu, H., Chang, P., Li, S., Lu, J., Lin, X; Xie, C. (2021). Dominant Fungal Epiphytes Promote Growth of the Invasive Plant *Ipomoea cairica* Through Hormone Interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10375-6>

kado, H., Yang, R., Guo, S; Li, Q. (2020). Modeling fertilization impacts on nitrate leaching and groundwater contamination with HYDRUS-1D and MT3DMS. *Paddy and Water Environment*, 18(3), 481-498. <https://doi.org/10.1007/s10333-020-00796-6>

Capítulo 1 Aceito e formatado para publicação: Applied and Environmental Soil Science

### **Coinoculação de *Trichoderma asperellum* com *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento e absorção de nutrientes em Capim Marandu**

#### **RESUMO**

Foi investigado os efeitos de diferentes doses de fertilizantes minerais combinados com a coinoculação de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* para promover o crescimento vegetal e utilizar nutrientes de forma eficiente em uma planta *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) *Brizantha* cv. Marandu. Foram realizados experimentos individuais com doses dos nutrientes nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). O experimento foi conduzido em unidade de produção de mudas com delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial  $3 \times 5$  (Controle sem inoculação; inoculação com *Bacillus subtilis*; e coinoculação (MIX) com *T. asperellum* + *B. subtilis* x omissões de nutrientes (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), com cinco repetições. Foram avaliados parâmetros biométricos, teor de nutrientes e eficiência no uso de nutrientes. Os resultados mostraram que os inoculantes promoveram o crescimento do capim Marandu. O uso de inoculantes promoveu o crescimento e aumentou a absorção de N, P e K pelo capim Marandu. A coinoculação alterou a área foliar, o comprimento da parte aérea, a taxa de alongamento e a aparência da folha para N e K, massa seca da raiz para P. Além disso, a coinoculação combinou com a dose de 75% de N, 50% de P e 50% de K, aumentou o teor nutricional das folhas em 256% de N, 280% de P e 29% de K e proporcionou maior eficiência agronômica, incrementos de 462% de N, 544% de P e 177% de K, em comparação com o tratamento controle. f 25% de N, 50% de P e 50% de K combinados com a coinoculação favorecem a eficiência de utilização de nutrientes em mais de 100% e promovem o crescimento do capim-marandu. Este estudo é uma importante contribuição

para novas pesquisas, contribui para uma agricultura com menor impacto ambiental e o uso sustentável de recursos não renováveis.

**Palavras-Chave:** Biofertilizantes, forragem, coinoculantes

**ABSTRACT**

Authors have investigated the effects of different doses of mineral fertilizers combined with co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* to promote plant growth and use efficient nutrients in a plant *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) *Brizantha* cv. Marandu. Individual experiments with doses of the nutrients nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K) were carried out. The experiment was carried out in a seedling production unit with a completely randomized design, 3 × 5 factorial scheme (Control without inoculation; inoculation with *Bacillus subtilis*; and co-inoculation (MIX) with *T. asperellum* + *B. subtilis* x nutrient omissions (0%, 25 %, 50%, 75%, and 100%), with five replications. Biometric parameters, nutrient content, and nutrient use efficiency were evaluated. The results showed that the inoculants promoted growth in Marandu grass. The use of inoculants promoted growth and increased N, P, and K uptake by Marandu grass. Co-inoculation changed leaf area, shoot length, elongation rate, and leaf appearance for N and K, root dry mass to P. In addition, the co-inoculation combined with a dose of 75% of N, 50% of P, and 50% of K, increased the nutritional content of the leaves by 256% of N, 280% of P, and 29% of K, and provided greater agronomic efficiency, increments of 462% of N, 544% of P and 177% of K, compared to the control treatment. The use of 25% of N, 50% of P, and 50% of K combined with co-inoculation favors the efficiency of nutrient use by more than 100% and promotes the growth of marandu grass. This study is an important contribution to new research, contributes to agriculture with less environmental impact, and the sustainable use of non-renewable resources.

**Keywords:** Biofertilizers, forage, co-inoculants, nue

## 1. INTRODUÇÃO

Atender à demanda global por alimentos requer uma gestão agrícola eficiente. As projeções demandam maior uso da terra e maior necessidade de fertilizantes minerais, que se estima que utilizem 52 milhões de toneladas em 2050 [1]. Atualmente, o Brasil ocupa o quarto lugar no mundo em consumo de fertilizantes, o que implica em alto custo e possivelmente maiores impactos ambientais [2]. Atividades como a agricultura têm sua parcela de contribuição nesse cenário. Embora historicamente o uso de fertilizantes tenha sido pouco frequente no preparo de pastagens, atualmente há maior utilização [3]. Na Amazônia brasileira existem pelo menos 56,6 milhões de hectares de pastagens e os principais problemas são o empobrecimento e a degradação do solo [4].

Nesse cenário, fica evidente a necessidade de desenvolver tecnologias alternativas para que haja aproveitamento eficiente dos nutrientes e menos danos ao meio ambiente. Assim, o uso de microrganismos promotores de crescimento pode contribuir como uma ferramenta potente. Estudos com o uso de microrganismos em diferentes culturas mostram que eles possuem diferentes modos de ação que favorecem o crescimento das plantas, principalmente devido ao melhor aproveitamento dos nutrientes. Os microrganismos podem ser capazes de mineralizar nitrogênio e solubilizar fósforo e potássio [5]. Além disso, podem alterar a síntese de hormônios vegetais, como auxina e giberelina [6].

A bioinoculação na gramínea é uma técnica utilizada e tem mostrado aumento no crescimento dos gêneros (*Azospirillum brasiliense*, *Cynodon* e *Megathyrsus*). A inoculação de *A. brasiliense* associada à adubação nitrogenada em *Cynodon dactylon* promoveu efeitos positivos sobre a massa seca da folha [7]. O uso do biopromotor em *Megathyrsus* (Syn. *Panicum*) promoveu aumentos significativos no acúmulo de biomassa da parte aérea e radicular e maiores concentrações de macro e micronutrientes [8]. O

efeito de *Trichoderma* no desenvolvimento das gramíneas precisa ser elucidado, para verificar se promove incrementos, como demonstrado em outras culturas da família *Poaceae* [9]; [10]; [11]. A inoculação de *Trichoderma*. na germinação e taxa de crescimento em *Lolium multiflorum*, apresentou aumentos significativos em comparação com o tratamento não inoculado [12]. A inoculação de *Bacillus* em *Lolium multiflorum* promoveu um aumento significativo na biomassa da folha [13]. Resultados anteriores também relatam que *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp. são agentes promotores de crescimento, que contribuem para o melhor desenvolvimento de diversas culturas da família *Poaceae*, como arroz, milho e trigo [14]; [15]; [16]; [17].

Os gêneros aplicados neste estudo, com características que favorecem o crescimento em outras culturas, precisam ser estudados como inoculantes na gramínea, visando aumentar o crescimento e reduzir a adubação mineral. Assim, objetivou-se estudar os efeitos de diferentes doses de fertilizantes minerais combinados com a co-inoculação de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* na promoção do crescimento e na eficiência do uso de nutrientes em uma *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) *Brizantha* cv. Marandu.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Caracterização da área experimental**

O experimento foi conduzido na Unidade de Produção de Mudas da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) (01 ° 27'19" S, 48 ° 26'20 " W) com temperatura média de 32 °C e 75% de umidade, em Belém, Pará. O clima regional de acordo com a classificação de Köppen é Afí [18].

### **2.1 Isolados microbianos**

Os isolados microbianos estão armazenados e preservados na coleção de microrganismos pertencente ao Laboratório de Proteção Vegetal (PPL) da Universidade Federal Rural da Amazônia. *Bacillus subtilis* UFRA-92 (Genbank MN175193) de açazeiros foram isolados e testados para promoção do crescimento vegetal [19]. Além disso, quatro isolados de *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52), que foram isolados de solos rizosféricos de áreas reflorestadas e nativas da Amazônia e testados para promoção do crescimento vegetal [20].

## 2.2 Preparo e inoculação dos isolados

O *B. subtilis* foi cultivado em meio sólido 523 por 24 h a 28 °C. Em seguida, suspensões bacterianas foram preparadas com água esterilizada. A concentração foi ajustada em espectrofotômetro para 550 nm, correspondendo a  $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC) [21]; [22]. Os isolados de *T. asperellum* foram cultivados em meio de cultura BDA a  $\pm 28$  °C, fotoperíodo de 12 h por sete dias. Em seguida, as suspensões foram preparadas com água esterilizada e a concentração ajustada para  $6 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  [20]. A irrigação foi realizada 14 dias após a emergência das plântulas e cada vaso de polietileno recebeu 5 mL de suspensão microbiana [23]. Quando coinoculados, foram utilizados 2,5 mL de *B. subtilis* e 2,5 mL de *T. asperellum*.

## 2.3 Design experimental

Experimentos simultâneos e independentes foram conduzidos para avaliar o efeito da adubação quando as doses de nitrogênio (Exp. 1), fósforo (Exp. 2) e potássio (Exp. 3) foram reduzidas e associadas à inoculação de microrganismos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial  $3 \times 5$  (Controle sem inoculação; inoculação com *Bacillus subtilis* UFRA-92; e coinoculação (MIX) com *T. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA -12 e UFRA-52) + *B. subtilis* x omissões de

nutrientes (0%, 25 %, 50%, 75% e 100%) e com cinco repetições.

#### **2.4 Substrato e semeadura**

O solo utilizado foi coletado no Instituto de Ciências Agrárias (UFRA) na camada de 0 a 20 cm e classificado como um Latossolo amarelo distrófico com textura franco-arenosa [24]. Os dados da análise química do solo (tabela no material suplementar S1), foram realizados de acordo com [25]. Dez sementes de *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) *Brizantha* cv. Marandu em vasos de polietileno (20 cm × 30 cm × 0,05 cm), após 14 dias da semeadura foi feito o desbaste, deixando uma planta/vaso por 14 dias.

#### **2.5 Fertilização mineral**

A adubação mineral foi realizada sete dias antes da semeadura. As doses utilizadas para adubação foram 0, 25, 50, 75 e 100%, conforme as doses para a cultura [26], as fontes foram Ureia 20% (N), Superfosfato Simples- $P_2O_5$  (P) e Cloreto de Potássio- $K_2O$  (K). No experimento 1, foram testadas doses de N e a recomendação foi de 50 kg ha<sup>-1</sup>, equivalente a 0,208 g/vaso. Independentemente da dose de N, foi realizada a adubação recomendada de P (80 kg ha<sup>-1</sup>) e K (40 kg ha<sup>-1</sup>). No experimento 2, foram testadas doses de P com recomendação de 80 kg ha<sup>-1</sup>, equivalente a 0,834g/vaso. Independentemente da dose de P, foram realizadas adubações de N (50 kg ha<sup>-1</sup>) e K (40 kg ha<sup>-1</sup>). No experimento 3, foram testadas doses de K e a recomendação foi de 40 kg ha<sup>-1</sup>, equivalente a 0,125 g/vaso. Independentemente da dose de K, foram realizadas adubações de N (50 kg ha<sup>-1</sup>) e P (80 kg ha<sup>-1</sup>).

#### **2.6 Análise morfo genética e biométrica**

Aos 35 dias após a emergência, os parâmetros biométricos foram avaliados e calculados de acordo com [27]: taxa de aparecimento de folhas (TA<sub>F</sub>- folhas. Perfilho<sup>-1</sup>. dia<sup>-1</sup>) foi encontrada pela diferença entre o número de folhas iniciais e finais e vários

dias do intervalo de avaliação, a taxa de alongamento foliar (TAIF- cm. perfilho<sup>-1</sup>. dia<sup>-1</sup>) foi encontrada pela diferença entre a taxa do comprimento inicial e final da folha expandida e o número de avaliações. Altura da planta, folha e massa seca da raiz também foram medidos, e área foliar foi calculada usando a equação ( $Y = 0,7480 \times (\text{comprimento} \times \text{largura})$ ) [28]. Para avaliação da biomassa, cinco plantas por tratamento foram coletadas e separados em parte aérea e raízes. O material vegetal foi seco em estufa (60°C) até massa constante.

## 2.7 Análise Nutricional

As folhas foram coletadas e colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, em temperatura média de 60°C até peso constante. Em seguida, foi realizada a moagem em moinhos de facas Willey, garantindo a homogeneização da amostra. Posteriormente, procedeu-se à decomposição do tecido vegetal, para determinação dos teores de nutrientes (N, P e K) com solubilização perclórica nítrica, pelo método úmido [25].

## 2.8 Uso Eficiente de Nutrientes (UEN)

A eficiência de aproveitamento nutricional foi calculada a partir da eficiência agronômica (AE), eficiência fisiológica (EF) e eficiência de recuperação aparente (ERA), eficiência de resposta a nutrientes (ERN) de acordo com [29], utilizando as seguintes fórmulas:

***EA(kg kg):***

$$\frac{\text{Biomassa de vasos inoculados (kg)} - \text{Biomassa de vasos não inoculados (kg)}}{\text{Conteúdo de nutriente aplicado(kg)}}$$

***EF(kg kg):***

$$\frac{\text{PBVA(kg)} - \text{PBVNA(kg)}}{\text{NAVA} - \text{NAVNA (kg)}}$$

Onde PBVI= Produção de biomassa de vasos inoculados, PBVNI= Produção de biomassa de vasos não inoculados, NAVI= Nutriente absorvido de vasos inoculados, NAVNI= Nutriente absorvido de vasos não inoculados.

**ERA(%)**:

$$\frac{NAVA(kg) - NAVNA(kg)}{\text{Conteúdo de nutriente aplicado (kg)}} \times 100$$

**ERN (kg kg)**:

$$\frac{\text{Produção (kg)}}{\text{Conteúdo disponível do nutriente (kg)}}$$

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foram submetidos à análise de variância e, quando os valores de F foram significativos, foi realizado o teste SNK com 5% de probabilidade para efeito isolado de microorganismos. Quando houve efeito isolado das doses e interação entre os fatores, foi realizada análise de regressão (tabela no material suplementar S2). Os dados da análise nutricional foram submetidos ao teste t ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Parâmetros de crescimento

As variáveis biométricas associadas a doses e microrganismos apresentaram interação significativa ( $p < 0,05$ ). Para N, os fatores doses e microrganismos foram significativos para as variáveis altura, área foliar e taxa de aparecimento de aparecimento foliar.

A altura de planta apresentou ajuste ao modelo de regressão quadrático com ponto de máxima eficiência em 79%, 54% e 88% de N com uso do Mix, UFRA-92 e controle, respectivamente (Figura 1a). A área foliar em função das doses de N aumentou de forma

linear para o controle e UFRA-92, enquanto o Mix apresentou ajuste quadrático, com ponto de máxima em 46% (Figura 1b). A taxa de aparecimento foliar aumentou de forma linear em função das doses para os três tratamentos (Figura 1c).

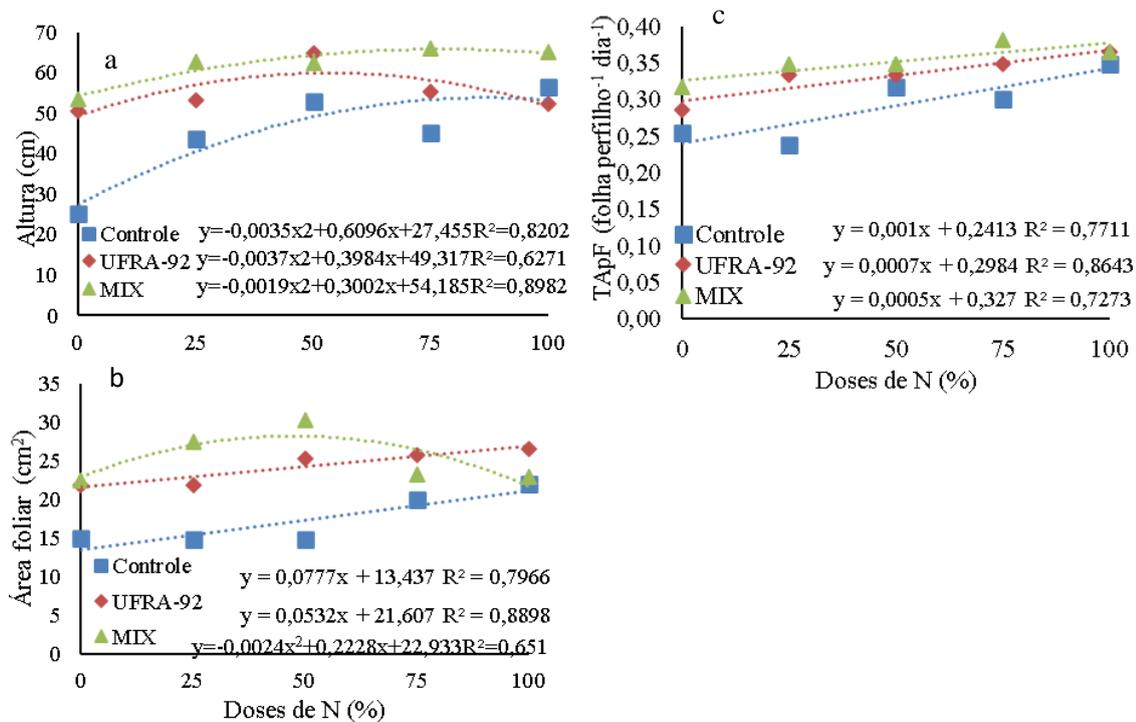
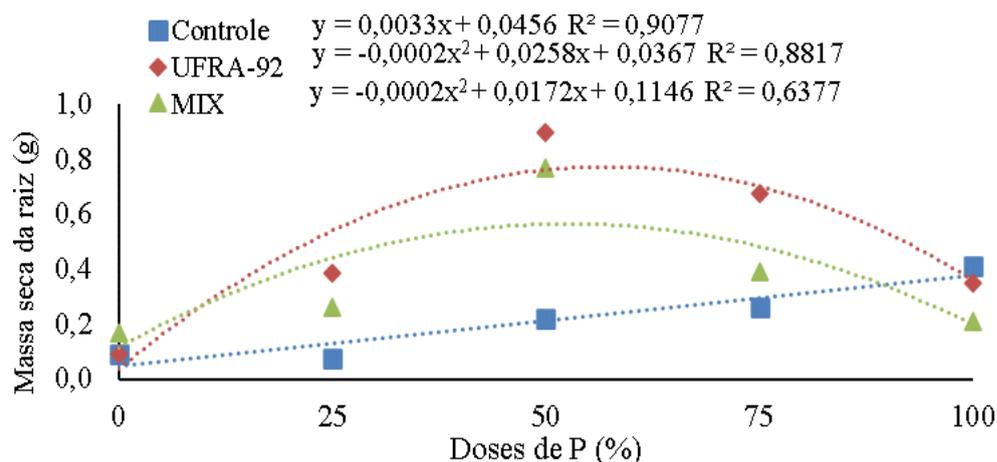


Figura 1: Altura (a), taxa de aparecimento foliar (b) e área foliar (c) com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX) em função de doses de nitrogênio em capim Marandu.

Houve interação significativa  $p < 0,05$  para as doses de fósforo para massa seca da raiz. A mesma apresentou ajuste ao modelo quadrático para o MIX e UFRA-92 com ponto de máxima eficiência em 43% e 64%, respectivamente, enquanto o controle teve crescimento linear (Figura 2).



Figura

2: Massa seca da raiz com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX) em função de doses de fósforo em capim Marandu

O Mix e UFRA-92 na altura, apresentaram ajuste ao modelo quadrático, com ponto de máxima eficiência em 61% e 65%, respectivamente, enquanto o controle apresentou aumento linear para as doses de potássio (Figura 3a). A área foliar apresentou ajuste ao modelo quadrático no controle e UFRA-92, com ponto de máxima eficiência em 43% e 50%, respectivamente, enquanto o Mix apresentou ajuste ao modelo linear (Figura 3b). A taxa de alongamento foliar teve comportamento quadrático para o controle com ponto de máxima eficiência em 82%, enquanto o Mix e UFRA-92 tiveram ajuste ao modelo linear para as doses (Figura 3c).

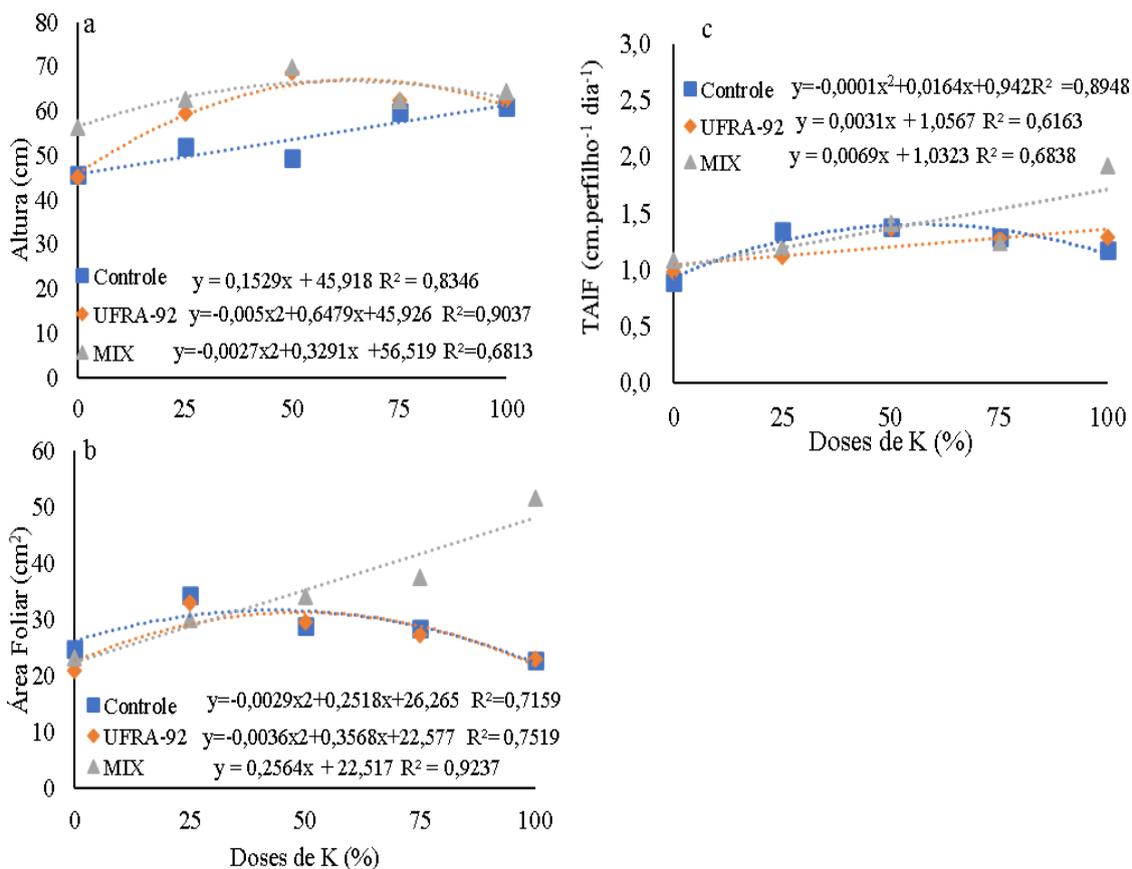


Figura 3: Altura (a), área foliar (b) e taxa de alongamento foliar (c) com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX) em função de doses de potássio em capim Marandu.

A ação isolada do nutriente teve efeito significativo a  $p < 0,05$  sobre as variáveis biométricas. Para nitrogênio, o fator atua de forma dependente para massa seca da parte aérea (Figura 4) massa seca de raiz (Figura 4), comprimento de raiz (Figura 4) e taxa de alongamento foliar (Figura 4), o comportamento médio das variáveis teve crescimento linear em função das doses de nitrogênio.

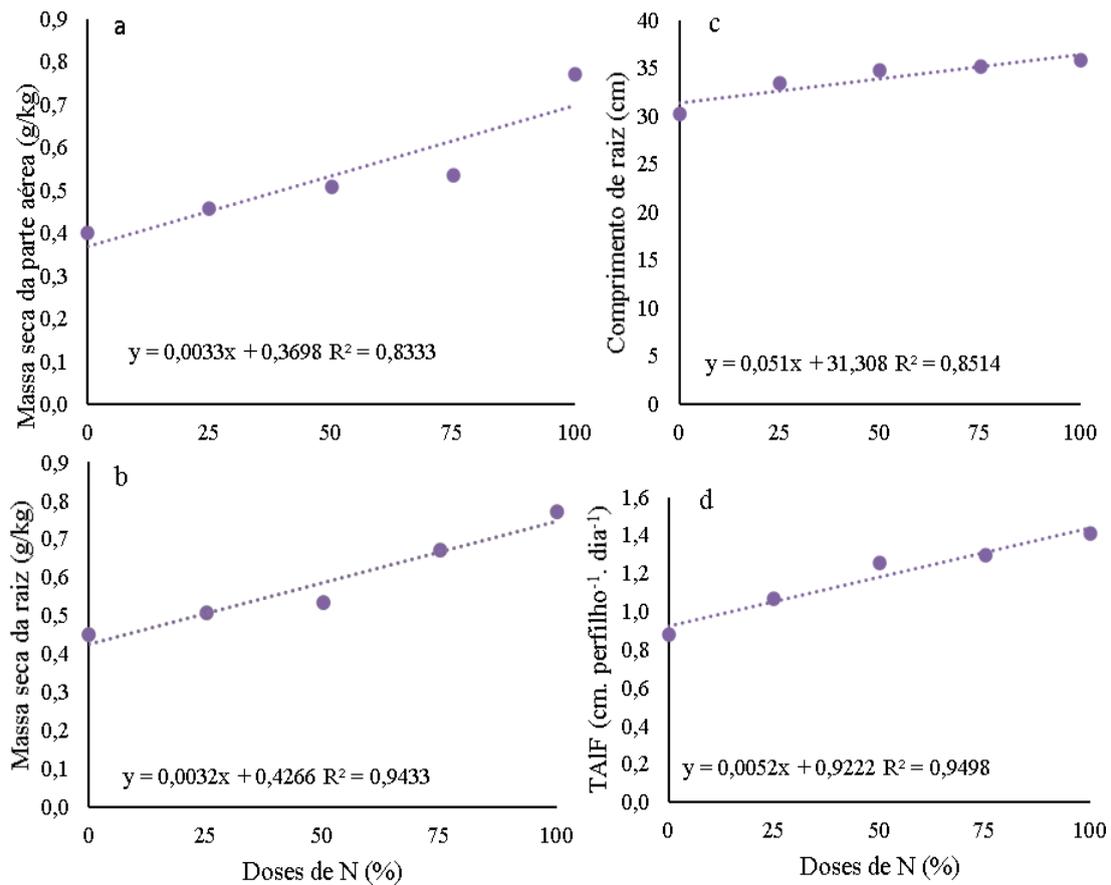


Figura 4: Massa seca da folha (a), massa seca da raiz (b), comprimento de raiz (c) e taxa de alongamento foliar (d) em função de doses reduzidas de nitrogênio em capim Marandu.

Para o fósforo, independente dos microrganismos, todas as variáveis tiveram crescimento quadrático, com ponto de máxima eficiência em 65% para altura (Figura 5a), em 53% para massa seca da folha (Figura 5b), em 67% para comprimento de raiz (Figura 5c) e 65% para área foliar (Figura 5d), enquanto a taxa de alongamento foliar (Figura 5e) e aparecimento foliar (Figura 5f) tiveram comportamento linear.

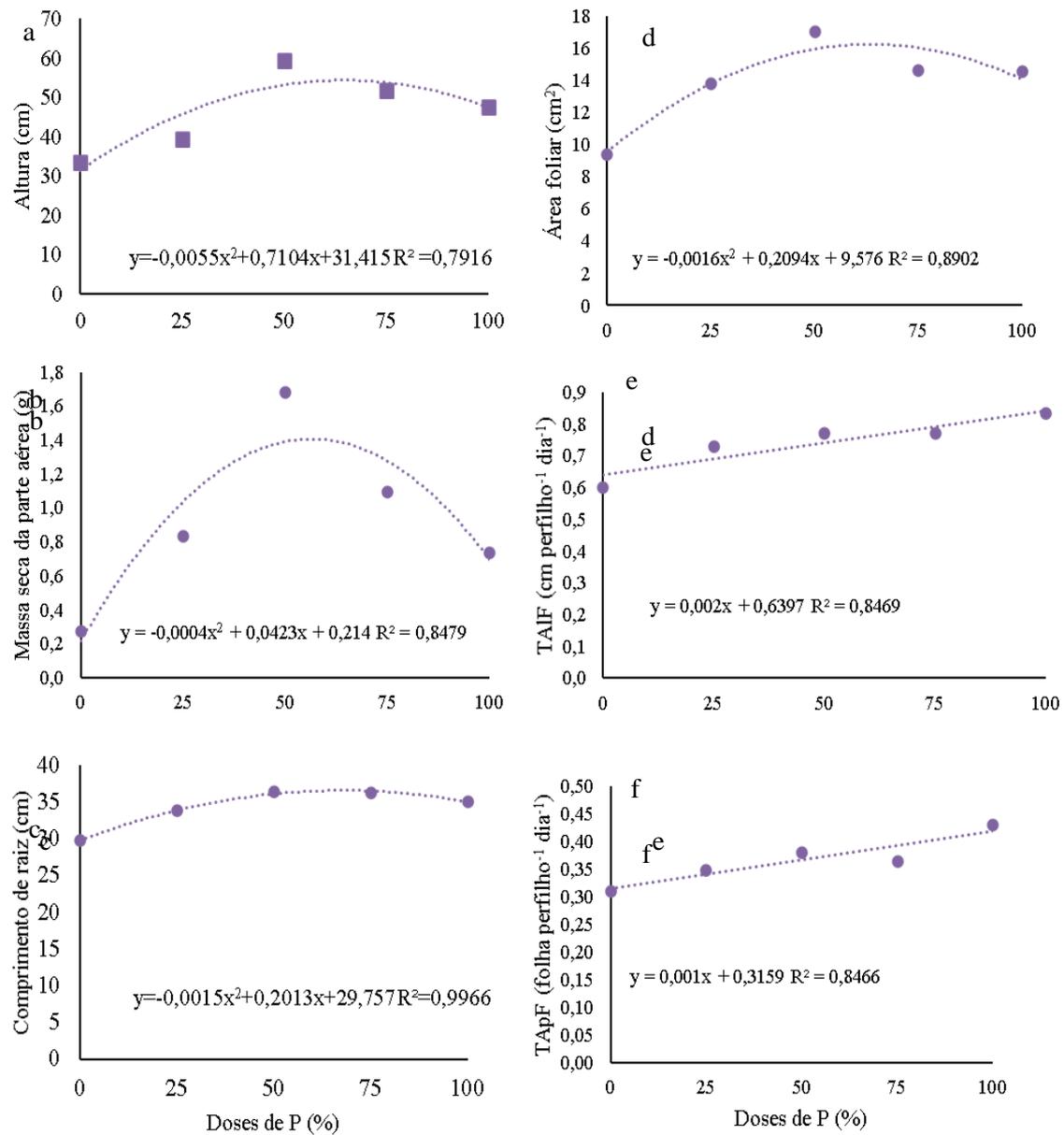


Figura 5: Altura (a) massa seca da folha (b), comprimento de raiz (c), área foliar (d), taxa de alongamento foliar (e) e taxa de aparecimento foliar em função das doses reduzidas de fósforo em capim Marandu.

Para as doses de potássio, a ação isolada das doses, promoveu comportamento quadrático com ponto de máxima eficiência em 65% na altura (Figura 6a), em 66% na massa seca de raiz (Figura 6b), em 62% no comprimento de raiz (Figura 6c) e apresentou aumento linear para taxa de aparecimento foliar (Figura 6d).

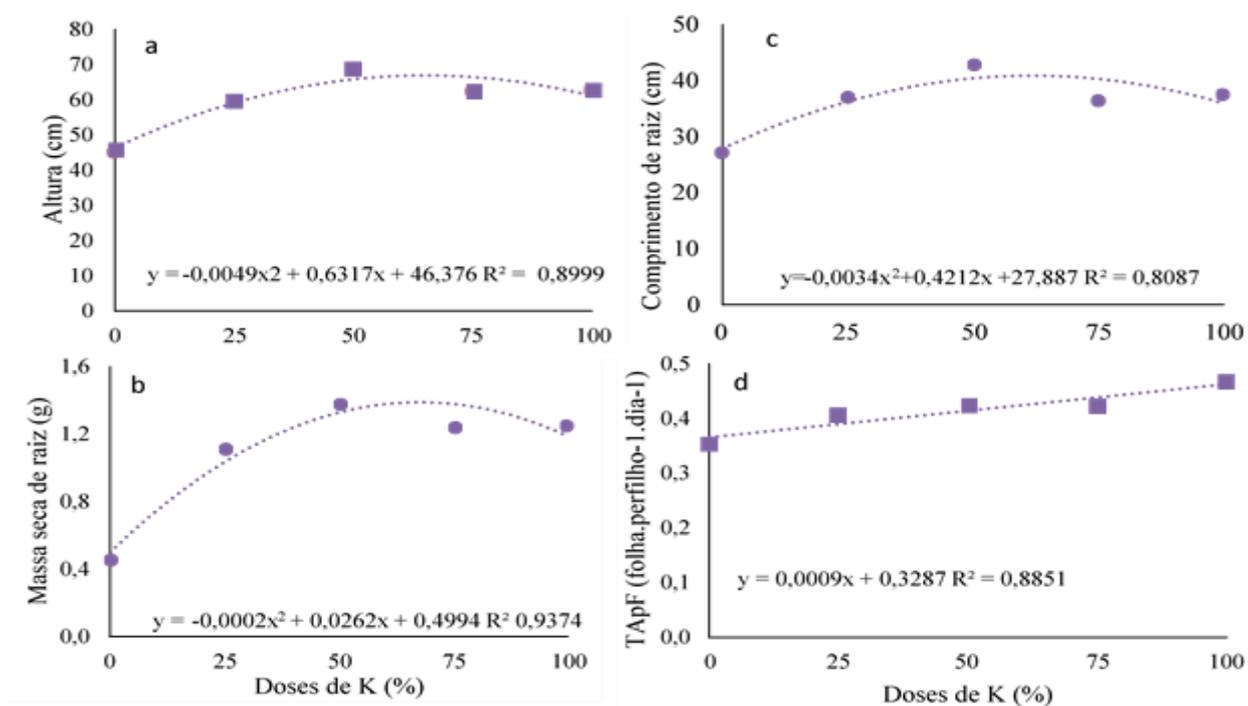


Figura 6: Altura (a), massa seca de raiz (b), comprimento de raiz (c) e taxa de aparecimento foliar (d) em função das doses reduzidas de potássio em capim Marandu.

O efeito da inoculação independente das doses dos nutrientes foi significativo a  $p < 0,05\%$  para as variáveis biométricas, em relação ao controle (Tabela 3). Considerando a dose de 75% N, os microrganismos promoveram incremento no crescimento de *U. brizantha*, em até 104% na massa seca da raiz, em 194% na massa da folha, em 22% no comprimento de raiz e 11% na taxa de alongamento foliar, em relação ao controle.

Tabela 3: Parâmetros biométricos do controle não inoculado (100% de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O), com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX), associados a 75% de N, 50% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 50% de K<sub>2</sub>O em capim Marandu.

Tratamento	MS raiz ----g/kg----	MS Foliar	C. raiz -----cm-----	Altura	A. F. --cm <sup>2</sup> --	TAIF	TApF
Controle (N)	0,50c	0.37c	34.6b	-	-	1.2b	-
UFRA-92	0,67b	0.53b	33.8b	-	-	1.4a	-
MIX	1,02a	1.09a	42.3a	-	-	1.3a	-
Controle (P)	-	0.73b	33.70b	40.53b	15.02b	0.7b	0.35b
UFRA-92	-	1.87a	40.33a	61.10a	16.99b	0.8a	0.38a
MIX	-	1.68a	36.33b	59.40a	20.45a	0.7b	0.35b
Controle (K)	0,66c	1,76b	35.30c	-	-	-	0.35b
UFRA-92	1,38b	2,58a	42.83b	-	-	-	0.37b
MIX	1,83a	2,48a	47.20a	-	-	-	0.42a

(\*). Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ).

A inoculação com os microrganismos combinado a 50% de P, resultou em incremento no crescimento de capim Marandu. A aplicação do UFRA-92 promoveu aumento em 156% na massa seca da parte aérea, em 51% comprimento da parte aérea, em 20% no comprimento de raiz, em 9,3% para taxa de alongamento foliar em relação ao controle (100% P) (Tabela 3). Somente para a variável área foliar (31%) o mix proporcionou maior aumento em relação a UFRA-92 (Tabela 3).

Para a dose de 50% K, o Mix proporcionou ganho superiores a aplicação isolada do UFRA-92, com aumento em 117% em massa seca da raiz, em 34% em comprimento de raiz, em 20% na taxa de aparecimento foliar, em relação ao controle. A exceção foi para a variável massa seca de parte aérea (47%) de incremento em plantas que receberam somente UFRA-92 (Tabela 3).

### **3.2 Composição química**

A partir dos resultados encontrados, foi selecionado as melhores doses em função da biomassa radicular e aérea, para realizar a análise nutricional. Desta forma, as coletas das folhas foram efetuadas nas doses: 75% de N, 50% de P e 50% de K de plantas inoculadas, comparadas ao controle 100%.

O conteúdo nutricional das folhas apresentou incremento em função dos microrganismos. O Mix associado a redução em 75% de N, 50% de  $P_2O_5$  e 50% de  $K_2O$  teve incremento de 256%, 280% e 29%, comparados ao controle (100%), respectivamente. A inoculação com UFRA-92 proporcionou incrementos de 35% em N, de 75% em P e 11% em K, quando comparados ao controle (100%) (Figura 7).

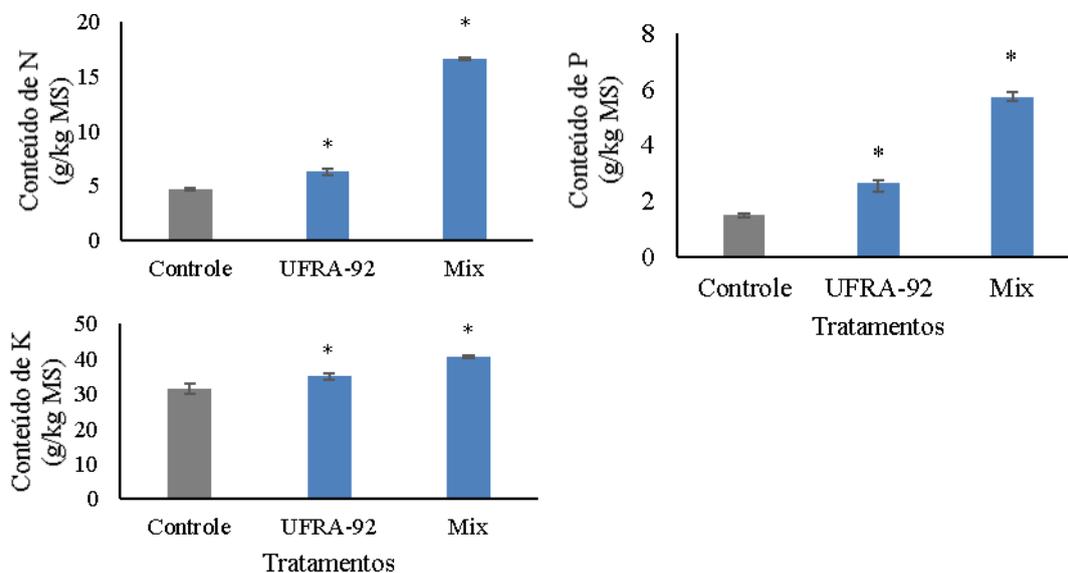


Figura 7: Conteúdo nutricional foliar do controle não inoculado (100%), com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma. asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX) associados a 75% de N, 50% de  $P_2O_5$  e 50% de  $K_2O$  em capim Marandu. Analisado pelo teste t ( $p < 0.05$ ).

### 3.4 Uso eficiente dos nutrientes (UEN)

A partir das melhores doses avaliadas na análise nutricional, 75% de N, 50% de P e 50% de K, foi realizado os cálculos de uso eficiente, comparando ao controle (100%). Os resultados apresentaram valores significativos de  $P < 0,05$  para todos os indicadores de uso eficiente. A inoculação com Mix e UFRA-92 apresentou maior eficiência agrônômica, gerando incrementos de 462% e 144% para N, de 544% e 103% para P, de 177% e 122% para K, respectivamente, quando comparados ao controle (100%) (Tabela 4).

Tabela 4: Índices de eficiência agrônômica (EA), eficiência fisiológica (EF), eficiência de recuperação aparente (ERA) e eficiência de resposta do nutriente (ERN) do controle não inoculado (100% de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O), com *Bacillus subtilis* (UFRA-92) e *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) + *Bacillus subtilis* (MIX), associados a 75% de N, 50% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 50% de K<sub>2</sub>O em capim Marandu.

Tratamento	EA	EF	ERA	ERN
	kg kg <sup>-1</sup>	kg kg <sup>-1</sup>	%	kg kg <sup>-1</sup>
Controle (N)	1,26c	29,87c	4,75c	6,05c
UFRA-92	3,08b	59,89b	11,59b	13,79b
MIX	7,08a	63,90a	36,71a	28,37a
Controle (P)	2,68c	0,75c	1,34c	11,86c
UFRA-92	5,45b	0,85b	3,87b	35,62b
MIX	17,26a	3,57a	8,98a	48,85a
Controle (K)	23,77c	48,20b	43,19c	58,05c
UFRA-92	52,90b	51,75b	102,22b	121,45b
MIX	66,00a	55,04a	136,93a	134,55a

(\*) Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste SNK (p<0.05).

A inoculação de MIX e UFRA-92, sobre a eficiência fisiológica, proporcionou incrementos de 113% e 100% para N, de 376% e 13% para P, de 14% e 7% para K, respectivamente, em relação ao controle 100%. A eficiência de recuperação aparente apresentou incrementos de 672% e 144% para N, de 570% e 188% para P, de 217% e 136% para K nos tratamentos MIX e UFRA-92, respectivamente. Os incrementos encontrados na eficiência de recuperação do nutriente, foram de 369% e 128% para N, de 312% e 200% para P, de 132% e 109% para K nos tratamentos MIX e UFRA-92, respectivamente, quando comparados ao controle 100% (Tabela 4).

#### 4. DISCUSSÃO

A inoculação de capim com microrganismos promotores de crescimento vem sendo estudado, e tem demonstrado resultados significativos no crescimento e redução da adubação mineral [30]; [31]; [32]. Os gêneros aplicados neste estudo, com características promotoras de crescimento em outras culturas, necessitam ser estudados como inoculantes em capim, visando incremento no crescimento e redução da adubação mineral.

No presente estudo, a partir de experimentos em condições de casa de vegetação, foi demonstrado o efeito sinérgico da coinoculação do *B. subtilis* com *T. asperellum* na melhoria do crescimento, produção de biomassa e na absorção de N, P e K em capim Marandu, resultando em melhor eficiência do uso dos nutrientes. As interações sinérgicas que favoreceram o crescimento da planta, pode ter ocorrido a partir da formação de mix de biofilme entre o *Bacillus* e *Trichoderma*, pelo maior crescimento ou colonização intracelular da bactéria na hifa fúngica.

Esses mecanismos permitem uma ampla colonização dos microrganismos ao longo das raízes e até a penetração no tecido da planta [34], condição essa pode contribuir para explicar o expressivo aumento em todas as variáveis do crescimento do capim Marandu, quando inoculada com UFRA-92 e *Trichoderma* (Mix), independente do nutriente, em relação à inoculação isolada do UFRA-92.

A coinoculação promoveu maior incremento na altura, área foliar e taxa de aparecimento foliar (Figura 1). Os resultados encontrados afirmam a hipótese de que plantas inoculadas com bioestimulantes favorecem o crescimento de capim em doses reduzidas de fertilizantes minerais. A redução de N pode ser atribuída a mineralização do N orgânico, pela aquisição e assimilação do N mineral e/ou pela redução da volatilização e lixiviação, levando ao aumento do crescimento do capim.

O maior desenvolvimento de plantas inoculadas também pode estar associado a maior produção de hormônios ligados ao crescimento vegetal (auxina, giberelina e citocininas), hormônios ligados a processos fisiológicos que promovem maior crescimento na planta. Como observado por [34] em *Pennisetum clandestinum* inoculado com *Paraburkholderia* sp. e semeado com 50% de fertilizantes orgânicos e 50% de N convencionais produziu rendimentos semelhantes aos obtidos com o fertilizante 100% N convencional. *Urochloa* sp. inoculadas com PGPR em doses reduzida de N, também

apresentaram incrementos significativos na taxa de aparecimento e alongamento foliar, possivelmente, em função da maior produção de hormônios vegetais [35].

O nitrogênio é responsável pelo crescimento vegetativo da planta, nesse sentido, a maior absorção e translocação de N estimulada pelos microrganismos Mix e UFRA-92, promoveu maior crescimento da parte aérea e maior expansão foliar. O aumento da área foliar a partir da coinoculação de bactérias em *U. brizantha* foi verificado por [23], com aumento de 700% e 108%, quando comparado a plantas não adubadas e a plantas adubadas, respectivamente. Os incrementos encontrados em doses reduzidas de N, associados aos microrganismos, também pode ser relacionado à maior atividade de enzimas responsáveis pela mineralização desse nutriente, enquanto doses elevadas de fertilizantes inorgânicos podem inibir a ação das mesmas [36].

O desenvolvimento radicular é uma característica importante para planta, pois permite o estabelecimento e exploração de água e nutrientes, essenciais para o seu crescimento. No presente estudo, a coinoculação associada a redução a 50% da dose recomendada de P, proporcionou maior massa seca de raiz (Figura 2). É possível inferir que o mecanismo de solubilização de fósforo pelos microrganismos, resultou em elevado acúmulo de P na planta adubada com 50% da dose, quando comparado a adubação somente com fertilizante mineral.

O maior desenvolvimento radicular encontrado pode ser relacionado a participação do fósforo no desenvolvimento da planta, pois atua em processos fisiológicos, no crescimento radicular, no tamanho do perfilho e perfilhamento [37]. Plantas inoculadas apresentaram maior desenvolvimento radicular, pois os microrganismos podem estimular o crescimento radicular pela síntese ou alteração das rotas metabólicas hormonais, como AIA e citocininas, que agem alongamento dos pêlos e multiplicação das células do meristema radicular [38]. Em trabalhos anteriores, com

capim Tanzânia (*Panicum maximum*) inoculado com rizobactérias, foi verificado um aumento de biomassa radicular, o qual foi associado ao aumento da concentração de AIA e redução do etileno [39].

Os incrementos encontrados, com 50% de  $K^+$ , na altura, área foliar, taxa de alongamento foliar, pode ser atribuído a absorção diferenciada pelas plantas inoculadas (Figura 3). A associação com microrganismos ocasiona mudanças na arquitetura do sistema radicular, como densidade, comprimento e quantidade de pêlos radiculares que interferem diretamente na exploração e aquisição do nutriente no solo, assim como pode proporcionar menor taxa de lixiviação do  $K^+$  em função da biomassa radicular por volume de solo.

Resultados encontrados por [40], mostraram que a inoculação de *Bacillus* spp. promoveu incremento no crescimento e rendimento do milho, acúmulo do nutriente, quando comparado a plantas não inoculadas com fertilização mineral. Em forragem semeado com substrato contendo mica (fonte de  $K^+$ ) e coinoculadas com *Bacillus* e *Azotobacter* resultou em acúmulo de biomassa (70%) e maior conteúdo nutricional de N (118%) e K (165%), quando comparados ao controle não inoculado [41].

O efeito isolado do nitrogênio proporcionou incremento na massa seca da parte aérea e raiz, comprimento de raiz e taxa de alongamento foliar (Figura 4). Para P, as variáveis influenciadas foram altura, massa seca da parte aérea, comprimento radicular, área foliar, taxa de alongamento e aparecimento foliar (Figura 5). Enquanto para K, as variáveis foram altura, massa seca e comprimento de raiz e taxa de aparecimento foliar (Figura 6).

O aumento observado nessas variáveis pode estar associado, de forma indireta, as alterações ocorridas na arquitetura da planta, pois o comprimento radicular, influenciados

nos três experimentos, permite maior exploração de água e nutrientes. O N e K no solo possuem elevada taxa de lixiviação e volatilização, nesse sentido, o maior número de pêlos radiculares pode ter permitido maior absorção e como consequência maior produção de biomassa radicular e aérea, assim como taxa de aparecimento e alongamento foliar. Para P, podemos inferir que ácidos orgânicos produzidos contribuíram para maior disponibilização dele. A coinoculação de microrganismos promove efeitos cumulativos no hospedeiro pelo aumento da disponibilidade de nutrientes, a partir da solubilização, produção de hormônios ligados ao crescimento vegetal [42].

A ação dos microrganismos independente das doses de N, P, K foi positiva sobre todas as variáveis biométricas comparadas ao controle (100%) (Tabela 3). [43] avaliando o efeito de biofertilizantes em diferentes taxas de fertilizantes inorgânicos sobre a produtividade do milho, verificaram que não houve interação entre os fatores, mas tratamentos inoculados apresentaram maiores rendimentos em doses reduzidas de fertilização inorgânica, enquanto o efeito isolado dos fertilizantes inorgânicos foram, de maneira geral, linear positivo em função do aumento das doses, comportamento verificado em algumas das variáveis avaliadas

No presente estudo, a inoculação com Mix aumentou a taxa de absorção, acúmulo dos macronutrientes (Figura 7). É relatado que o gênero dos microrganismos utilizados neste trabalho, possui mecanismos efetivos que contribuem para disponibilização dos nutrientes [44; 45]. O isolado de bactéria é um dos gêneros relatados na literatura com capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico [46]. O *Trichoderma* utilizado apresenta relatos de melhorias na qualidade nutricional de outras culturas da família *Poaceae* [47].

A fixação de nitrogênio por parte desse microrganismo acontece porque esse gênero possui grupo de genes Nif, que é responsável pela codificação da nitrogenase, enzima responsável pela fixação de nitrogênio [48]. Estudo realizado por [49] a partir do

isolamento de bactérias da rizosfera, na região da China, verificaram que sete isolados, dentre eles o gênero *Bacillus*, possuíam o gene Nif.

Os fertilizantes fosfatados quando aplicados ao solo, podem ser rapidamente mobilizados em compostos insolúveis com  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  em solos ácidos e  $\text{Ca}^{2+}$  em solos neutros a alcalinos [50]. Por outro lado, a disponibilidade de P pode ocorrer pela liberação de ácidos orgânicos e as enzimas fitases e fosfolipases, produzidas pelos microrganismos [51]. A acidificação da rizosfera por meio da liberação de  $\text{H}^+$ , faz com que ocorra a disputa desse próton pelos sítios de adsorção do fósforo ligado ao ferro ou alumínio, fazendo com que haja a transformação em ortofosfato  $(\text{H}_2\text{PO}_4)^{-2}$ , fórmula solúvel presentes em solos ácidos [52; 53].

A solubilização de fosfato natural foi registrada em arroz inoculado com *Trichoderma*, que resultou em maior crescimento e conteúdo de P [54]. Outro mecanismo, é a produção de sideróforos, que são ligantes de baixo peso molecular com elevada afinidade por íons de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , fazendo com que haja a solubilização de P ligado a esses íons [55]. Os microrganismos que compõem o Mix avaliados no presente estudo são produtores de sideróforos [56] e pode ter contribuído para elevada absorção e acúmulo de P em *U. brizantha* inoculada e fertilizada com 50% P

A inoculação de *Bacillus*, resultou em ganhos em parte aérea e raiz, em função da maior solubilização desse nutriente [57]. Esses resultados demonstram que os microrganismos aplicados contribuíram para a solubilização dos nutrientes, mesmo em doses reduzidas, favorecendo a sua absorção e reduzindo as perdas por fixação. Em arroz e trigo inoculados com PGPR e combinado a 75% de N, P e K resultaram em aumento de produtividade comparado a somente fertilização química completa (100%), chegando a uma redução em 25% de N [58; 59].

O estudo mostrou que plantas inoculadas com Mix e UFRA-92, possibilitou a redução de 25% de nitrogênio, 50% de fósforo e 50% de potássio, proporcionando maior eficiência do uso dos nutrientes (Tabela 4), quando comparados ao controle (100%). Esses resultados demonstram que os microrganismos aplicados contribuíram para a fixação e solubilização dos nutrientes, mesmo em doses reduzidas, favorecendo a sua absorção e diminuindo as perdas por volatilização, lixiviação e fixação, e os resultados desses benefícios foram refletidos no crescimento da planta.

Os resultados apresentados dão suporte à hipótese que a inoculação com microrganismos aumenta o uso eficiente dos nutrientes. A maior eficiência encontrada se deve ao reduzido uso de fertilizante mineral em conjunto com a inoculação, tendo em vista que o uso excessivo pode prejudicar a ação dos microrganismos [60]. A importância do uso eficiente dos nutrientes na agricultura moderna tem grande relevância devido aos impactos econômicos e ambientais que podem ser controlados ao longo dos anos de produção [61].

Segundo [62], os microrganismos colonizadores da rizosfera são capazes de substituir 25% a 50% do fertilizante mineral, e estudos mostraram que é possível empregar as melhores combinações entre microrganismos para obtenção de melhores resultados [63]. A coinoculação de microrganismos com efeitos sinérgicos foi verificada por [64; 65] em plantas de arroz, a qual promoveu aumento no rendimento e absorção de nutrientes, quando comparados ao não inoculado. Resultados relacionados a capacidade de solubilização e mineralização dos nutrientes disponibilizados.

Em experimento realizado com coinoculação em grama [41] verificaram que o uso dos microrganismos promoveu aumento da absorção de  $K^+$  e fixação de N, quando comparado ao tratamento controle, sendo relacionado este comportamento a produção de

ácido orgânicos e fitohormônios envolvidos no crescimento radicular, os quais aumentam a área explorada pelas raízes.

O uso eficiente de N, P e K também foi relatado por [66], os autores avaliaram os benefícios da associação de microrganismo solubilizador em arroz. Foi verificado que em doses reduzidas de NPK (50%), o conteúdo nutricional e os parâmetros de crescimento avaliados tiveram maior desempenho quando houve inoculação de biopromotores. [67] verificou que a eficiência do rendimento em plantas de arroz coinoculados sob doses de NPK, apresentaram maior eficiência agrônômica no tratamento inoculado com 75% de adubo inorgânico, quando comparado ao tratamento com dose recomendada.

Os benefícios da inoculação com biopromotores é relatado por [68] em plantas de milho sob inoculação de *Azospirillum* sp., inferindo que plantas inoculadas tem maior NUE e redução dos prejuízos causados pela redução do conteúdo de N no solo. Resultados semelhantes também são relatados por [69], encontraram maior conteúdo nutricional (N, P) em plantas de arroz, quando houve associação microrganismos versus doses reduzidas de K, e os índices de uso eficiente avaliados foram significativamente maiores quando comparado a 100% da dose.

A aplicação de bactéria solubilizadora de fosfato associadas a NPK inorgânico, aumentou o conteúdo de NPK, NUE e reduziu a taxa de lixiviação dos nutrientes em gramínea [70]. A inoculação de gramínea associadas à adubação inorgânica com NPK, promoveu maior NUE, representando aumento de 11% em N, de 30% em P e 17% em K, quando comparado a plantas adubadas somente com fertilizante inorgânico [71].

Novos ensaios de formulações de macronutrientes de dose reduzida combinadas com co-inoculação com *B. subtilis* + *T. asperellum* em *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) *Brizantha*. CV. Marandu, deve ser realizada para investigar os mecanismos fisiológicos e

bioquímicos alterados pela bioestimulação. A coinoculação de *Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em *Urochloa brizantha*. CV. Marandu, induziu maior crescimento ao alterar o comportamento de absorção utilizando uma menor dose de fertilizante mineral em 25% N, 50% P e 50% K, resultando em maior eficiência nutricional.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a coinoculação de *Trichoderma asperellum* com *Bacillus subtilis* promove o crescimento do capim marandu sob diferentes doses de adubação mineral. Além disso, a redução da adubação mineral de 25% de N, 50% de P e 50% de K favorece a eficiência no aproveitamento dos nutrientes em mais de 100%. Este estudo é uma importante contribuição para novas pesquisas, contribui para uma agricultura com menor impacto ambiental e o uso sustentável de recursos não renováveis

## REFERÊNCIAS

- 1 FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations <<https://www.fao.org/3/ap106e/ap106e>> Accessed in 09/27/2021
- 2 IFA - International Fertilizer Industry Association. IFA database. <<http://www.fertilizer.org/>>. Accessed in 07/02/2021
- 3 Pereira, S. I. A., Abreu, D., Moreira, H., Vega, A; Castro, P. M. L. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and nutrient use efficiency in maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Heliyon*, 6(10), e05106. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05106>
- 4 MapBiomass <<https://mapbiomas.org/pastagens-brasileiras-ocupam-area-equivalente-a-todo-o-estado-do-amazonas>> Accessed in 09/20/2022
- 5 Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M; Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- 6 Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F. J., Megías, M; Hungria, M. (2017). Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology*, 45(3), 328-339. <https://doi.org/10.1071/FP17167>
- 7 Aguirre, P. F., Olivo, C. J., Rodrigues, P. F., Falk, D. R., Adams, C. B., & Schiafino, H. P. (2018). Forage yield of Coastercross-1 pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 40. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.36392>
- 8 Sá, G. C. R., Carvalho, C. L. M., Moreira, A., Hungria, M., Nogueira, M. A., Heinrichs, R; Soares Filho, C. V. (2019). Biomass yield, nitrogen accumulation and nutritive value of Mavuno grass inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(15), 1931-1942. <https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1648498>
- 9 Karuppiah, V., Sun, J., Li, T., Vallikkannu, M; Chen, J. (2019). Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 causes differential gene expression and improvement in the wheat growth and biocontrol activity. *Frontiers in microbiology*, 10, 1068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01068>
- 10 Sousa, T. P., Chaibub, A. A., da Silva, G. B; de Filippi, M. C. C. (2020). *Trichoderma asperellum* modulates defense genes and potentiates gas exchanges in upland rice plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 112, 101561. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101561>
- 11 Lagos, C., Larsen, J., Fuentes, A., Herrera, H., García-Romera, I., Campos-Vargas, R; Arriagada, C. (2021). Inoculation of *Triticum Aestivum* L.(Poaceae) with Plant-Growth-Promoting Fungi Alleviates Plant Oxidative Stress and Enhances Phenanthrene Dissipation in Soil. *Agronomy*, 11(3), 411. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030411>

- 12 Banjac, N., Stanisavljević, R., Dimkić, I., Veljević, N., Soković, M; Ćirić, A. (2021). *Trichoderma harzianum* IS005-12 promotes germination, seedling growth and seedborne fungi suppression in Italian ryegrass forage. *Plant, Soil and Environment*, 67(3), 130-136. <https://doi.org/10.17221/581/2020-PSE>
- 13 Ke, T., Zhang, J., Tao, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Xu, Y; Chen, L. (2021). Individual and combined application of Cu-tolerant *Bacillus* spp. enhance the Cu phytoextraction efficiency of perennial ryegrass. *Chemosphere*, 263, 127952. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127952>
- 14 Li, S., Cui, L., Cheng, J., Chen, T., Fu, Y; Xie, J. (2018). Assessment of two *Trichoderma harzianum* strains for biocontrol against rice sheath blight and growth promotion of rice. *Acta Phytopathologica Sinica*, 48(1), 98-107. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.000123
- 15 Ikram, M., Ali, N., Jan, G., Iqbal, A., Hamayun, M., Jan, F. G; Lee, I. J. (2019). *Trichoderma reesei* improved the nutrition status of wheat crop under salt stress. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 590-602. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1684582>
- 16 Rana, K. L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A; Yadav, A. N. (2021). Bioprospecting of endophytic bacteria from the Indian Himalayas and their role in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, 9(03), 41-50. DOI: 10.7324/JABB.2019.70103
- 17 Degani, O., Rabinovitz, O., Becher, P., Gordani, A; Chen, A. (2021). *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma asperellum* Confer Growth Promotion and Protection against Late Wilt Disease in the Field. *Journal of Fungi*, 7(6), 444. <https://doi.org/10.3390/jof7060444>
- 18 Silvestre, W. V. D., Silva, P. A., Palheta, L. F., de Oliveira Neto, C. F., de Melo Souza, R. O. R., Festucci-Buselli, R. A., & Pinheiro, H. A. (2017). Differential tolerance to water deficit in two açai (*Euterpe oleracea* Mart.) plant materials. *Acta physiologiae plantarum*, 39(1), 1-10. DOI 10.1007/s11738-016-2301-9
- 19 Castro, G. L. S., Rêgo, M. C. F., Silvestre, W. V. D., Batista, T. F. V., & da Silva, G. B. (2020). Açai palm seedling growth promotion by rhizobacteria inoculation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(1), 205-216.
- 20 Silva JC, Torres DB, Lustosa DC, Filippi MCC, Silva GB (2012) Biocontrol of sheath blight on rice and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. *Rev Ciênc Agrár* 55:243– 250. doi:10.4322/rca.2012.078.
- 21 Kado, C. I., & Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60(6), 969-976.
- 22 Filippi, M. C. C., Da Silva, G. B., Silva-Lobo, V. L., Côrtes, M. V. C., Moraes, A. J. G., & Prabhu, A. S. (2011). Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, 58(2), 160-166.
- 23 Lopes, M. J. S., Dias-Filho, M. B., Castro, T. H. R; Silva, G. B. (2018). Light and plant growth-promoting rhizobacteria effects on *Brachiaria brizantha* growth and phenotypic plasticity to shade. *Grass and Forage Science*, 73(2), 493-499. <https://doi.org/10.1111/gfs.12336>

- 24 Silva, S.B; Silva, S. I. A. N. Concepts and stages of soil analysis. Technical Education and University Extension, 49.
- 25 Carmo, C. D. S., de Araujo, W. S., Bernardi, A. D. C; Saldanha, M. F. C. (2000). Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. *Embrapa Solos-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- 26 Santos, M. E. R; Fonseca, D. D. (2016). Adubação de pastagens em sistemas de produção animal. *Viçosa, MG: Editora UFV*.
- 27 Gomide, C. A. M; Gomide, J. A. (2000). Morfogênese de cultivares de *Panicum maximum* Jacq. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29, 341-348.
- 28 Bianco, S., Brendolan, R. A., Alves, P. L; Pitelli, R. A. (2000). Estimativa da área foliar de plantas daninhas: *Brachiaria decumbens* Stapf. e *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. *Planta Daninha*, 18(1), 79-83.
- 29 Choudhary, M., Meena, V. S., Yadav, R. P., Parihar, M., Pattanayak, A., Panday, S. C; Choudhary, M. (2019). Does PGPR and mycorrhizae enhance nutrient use efficiency and efficacy in relation to crop productivity?. In *Field crops: sustainable management by PGPR* (pp. 45-68). Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-030-30926-8\_3
- 30 Kidd, D. R., Ryan, M. H., Haling, R. E., Lambers, H., Sandral, G. A., Yang, Z; Simpson, R. J. (2016). Rhizosphere carboxylates and morphological root traits in pasture legumes and grasses. *Plant and Soil*, 402(1-2), 77-89. DOI 10.1007/s11104-015-2770-4
- 31 Griffin, M. E., Muntifering, R. B., Mullenix, M. K., Held, D. W; Dillard, S. L. (2020). Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria on stockpiled bermudagrass. *Crop, Forage & Turfgrass Management*, 6(1), e20028. <https://doi.org/10.1002/cft2.20028>
- 32 Tshewang, S., Rengel, Z., Siddique, K. H; Solaiman, Z. M. (2021). Microbial consortium inoculant increases pasture grasses yield in low-phosphorus soil by influencing root morphology, rhizosphere carboxylate exudation and mycorrhizal colonisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11382>
- 33 Warmink, J. A., Nazir, R., Corten, B; Van Elsas, J. D. (2011). Hitchhikers on the fungal highway: the helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(4), 760-765. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.12.009>
- 34 Paungfoo-Lonhienne, C., Redding, M., Pratt, C; Wang, W. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria increase the efficiency of fertilisers while reducing nitrogen loss. *Journal of environmental management*, 233, 337-341. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.052>
- 35 Duarte, C. F. D., Cecato, U., Hungria, M., Fernandes, H. J., Biserra, T. T., Galbeiro, S; da Silva, D. R. (2020). Morphogenetic and structural characteristics of *Urochloa* species under inoculation with plant-growth-promoting bacteria and nitrogen fertilisation. *Crop and Pasture Science*, 71(1), 82-89. <https://doi.org/10.1071/CP18455>
- 36 Silveira, A. P. D., Sala, V. M. R., Cardoso, E. J. B. N., Labanca, E. G; Cipriano, M. A. P. (2016). Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. *Applied Soil Ecology*, 107, 313-319. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.005>

- 37 Rasul, M., Yasmin, S., Suleman, M., Zaheer, A., Reitz, T., Tarkka, M. T; Mirza, M. S. (2019). Glucose dehydrogenase gene containing phosphobacteria for biofortification of Phosphorus with growth promotion of rice. *Microbiological research*, 223, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.004>
- 38 Khare, E; Nora, N. K. (2021). Biosurfactant based formulation of *Pseudomonas guariconensis* LE3 with multifarious plant growth promoting traits controls charcoal rot disease in *Helianthus annuus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03015-4>
- 39 Machado, R. G., de Sá, E. L. S., Bruxel, M., Giongo, A., da Silva Santos, N; Nunes, A. S. (2013). Indoleacetic Acid Producing Rhizobia Promote Growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). *International Journal of Agriculture & Biology*, 15(5).
- 40 Archana, D. S., Nandish, M. S., Savalagi, V. P; Alagawadi, A. R. (2013). Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. *Bioinfolet-A Quarterly Journal of Life Sciences*, 10(1b), 248-257.
- 41 Basak, B. B; Biswas, D. R. (2010). Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop. *Biology and Fertility of Soils*, 46(6), 641-648. DOI 10.1007/s00374-010-0456-x
- 42 Ahmad, M., Pataczek, L., Hilger, T. H., Zahir, Z. A., Hussain, A., Rasche, F; Solberg, S. O. (2018). Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. *Frontiers in microbiology*, 9, 2992. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02992>
- 43 Banayo, N. P. M., Cruz, P. C., Aguilar, E. A., Badayos, R. B; Haefele, S. M. (2012). Evaluation of biofertilizers in irrigated rice: Effects on grain yield at different fertilizer rates. *Agriculture*, 2(1), 73-86. <https://doi.org/10.3390/agriculture2010073>
- 44 Meena, V. S., Maurya, B. R; Verma, J. P. (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils?. *Microbiological research*, 169(5-6), 337-347. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>
- 45 Abawari, R. A., Tuji, F. A; Yadete, D. M. (2020). Phosphate Solubilizing Bio-fertilizers and Their Role in Bio-available P Nutrient: An Overview. *International Journal of Applied Agricultural Sciences*, 6(6), 162. doi: 10.11648/j.ijaas.20200606.11
- 46 Zakry, F. A. A., Shamsuddin, Z. H., Rahim, K. A., Zakaria, Z. Z; Rahim, A. A. (2012). Inoculation of *Bacillus sphaericus* UPMB-10 to young oil palm and measurement of its uptake of fixed nitrogen using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. *Microbes and environments*, 27(3), 257-262. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11309>
- 47 Silletti, S., Di Stasio, E., Van Oosten, M. J., Ventorino, V., Pepe, O., Napolitano, M; Maggio, A. (2021). Biostimulant Activity of *Azotobacter chroococcum* and *Trichoderma harzianum* in Durum Wheat under Water and Nitrogen Deficiency. *Agronomy*, 11(2), 380. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020380>.
- 48 Goswami, D., Thakker, J. N; Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). DOI: 10.1080/23311932.2015.1127500

- 49 Ding, Y., Wang, J., Liu, Y; Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1271-1281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02738.x>
- 50 Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T. U., Munir, A; Gurmani, A. R. (2019). Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, 36(10), 904-916. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043>
- 51 Ingle, K. P; Padole, D. A. (2017). Phosphate solubilizing microbes: An overview. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6(1), 844-852. DOI: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.099>
- 52 Zhu, J., Li, M; Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*, 612, 522-537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>
- 53 Zhang, Y. (2021). *Soil bypass P for enhanced availability in acid soils* (Master's thesis, Norwegian University of Life Sciences, Ås).
- 54 Chagas, L. F. B, Chagas Junior, A. F., Rodrigues de Carvalho, M., de Oliveira Miller, L; Colonia, O. (2015). Evaluation of the phosphate solubilization potential of Trichoderma strains (Trichoplus JCO) and effects on rice biomass. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(3), 794-804. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000054>
- 55 Ghosh, P., Rathinasabapathi, B; Ma, L. Q. (2015). Phosphorus solubilization and plant growth enhancement by arsenic-resistant bacteria. *Chemosphere*, 134, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.048>
- 56 Palyzová, A., Svobodová, K., Sokolová, L., Novák, J; Novotný, Č. (2019). Metabolic profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2 in dual cultures with biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Trichoderma harzianum*. *Folia microbiologica*, 64(6), 779-787. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00690-7>
- 57 Turan, M., Ataoglu, N; Sahin, F. (2007). Effects of *Bacillus* FS-3 on growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and availability of phosphorus in soil. *Plant soil and environment*, 53(2), 58.
- 58 Shaharoon, B., Naveed, M., Arshad, M; Zahir, Z. A. (2008). Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonas* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied microbiology and biotechnology*, 79(1), 147-155. DOI 10.1007/s00253-008-1419-0
- 59 Rose, M. T., Phuong, T. L., Nhan, D. K., Cong, P. T., Hien, N. T; Kennedy, I. R. (2014). Up to 52% N fertilizer replaced by biofertilizer in lowland rice via farmer participatory research. *Agronomy for sustainable development*, 34(4), 857-868. DOI 10.1007/s13593-014-0210-0
- 60 Nahed G. Abd El-Aziz.2007. Stimulatory effect of NPK fertilizer AND Benzyladenine on growth and chemical constituents of *Codiaeum variegatum* L. plants. *American-Eurasian J. Agric & Environ. Sci.*, 2 (6): 711-719.

- 61 Adesemoye, A. O; Kloepper, J. W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(1), 1-12. DOI 10.1007/s00253-009-2196-0
- 62 Goldstein, A. H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram-negative bacteria. *Biological, Agriculture and Horticulture*, Vol. 12, No. 1 (March 1995), pp. 185-193. <https://doi.org/10.1080/01448765.1995.9754736>
- 63 Chang, G. S., Beri, V., Rupela, O. P., and Sidhu, B. S. 2005. A new index to assess soil quality and sustainability of wheat based cropping systems. *Biology and Fertility of Soils* 41: 389- 398. DOI 10.1007/s00374-005-0857-4
- 64 Gohil, N. B., Ramani, V. P., Chaudhary, D. G., Bhanvadiya, A. S; Kumar, D. (2018). Effects of PGPR on Micronutrients Availability in Soil and Its Translocation in Rice under Loamy Sand Textured Soil. *Journal homepage: http://www. ijcmas. com*, 8(07), 2019. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.807.xx>
- 65 Vaid, S. K., Kumar, B., Sharma, A., Shukla, A. K; Srivastava, P. C. (2014). Effect of zinc solubilizing bacteria on growth promotion and zinc nutrition of rice. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14 (4), 889-910 <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162014005000071>
- 66 Duarah, I., Deka, M., Saikia, N; Boruah, H. D. (2011). Phosphate solubilizers enhance NPK fertilizer use efficiency in rice and legume cultivation. *3 Biotech*, 1(4), 227-238. DOI 10.1007/s13205-011-0028-2
- 67 Elekhtyar, N. M. (2015). Impact of three strains of *Bacillus* as bio NPK fertilizers and three levels of mineral NPK fertilizers on growth, chemical compositions and yield of Sakha 106 rice cultivar. *Int. J. Chem Tech Res*, 8(4), 2150-2156
- 68 Zeffa, D. M., Perini, L. J., Silva, M. B., de Sousa, N. V., Scapim, C. A., Oliveira, A. L. M. D; Azeredo Goncalves, L. S. (2019). *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLoS One*, 14(4), e0215332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>
- 69 Khanghahi, M. Y., Pirdashti, H., Rahimian, H., Nematzadeh, G. A; Sepanlou, M. G. (2018). Nutrient Use Efficiency and Nutrient Uptake Promoting of Rice by Potassium Solubilizing Bacteria (KSB). *Cereal Research Communications*, 46(4), 739-750. DOI: 10.1556/0806.46.2018.042
- 70 Baldotto, M. A., Baldotto, L. E. B., Santana, R. B; Marciano, C. R. (2012). Initial performance of maize in response to NPK fertilization combined with *Herbaspirillum seropedicae*. *Revista Ceres*, 59(6), 841-849. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000600015>

## Coinoculação de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* e sua influência no crescimento e aspectos fisiológicos de capim Marandú

### Resumo

O gênero *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) tem grande importância econômica no cenário nacional e possui elevada representatividade nos pastos brasileiros. Visando a redução de impactos ao meio ambiente, maior absorção dos fertilizantes aplicados e melhoria nos processos fisiológicos da planta, torna-se necessário o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias alternativas que contribuam para essa mudança. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da coinoculação de isolados de *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52) e *Bacillus subtilis* na fisiologia, no comportamento nutricional e morfometria em *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) *brizhanta*. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: plantas não inoculadas com doses reduzidas de fertilizantes (C), plantas não inoculadas com dose recomendada de fertilizantes (C+) e plantas coinoculadas associadas a doses reduzidas de fertilizantes (MIX) com dez repetições cada. Foram avaliados: trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de clorofilas, teor nutricional e carboidratos solúveis. A coinoculação proporcionou incrementos em relação ao controle de 25% na assimilação de CO<sub>2</sub>, de 140% na eficiência instantânea de carboxilação, de 34% na condutância estomática e 30% na transpiração. Todas as variáveis calculadas na florescência da clorofila *a* e parâmetros de crescimento tiveram incrementos significativos a partir da coinoculação em relação ao controle. O conteúdo de clorofila também apresentou aumento em função da coinoculação, sendo de 353% na clorofila *a*, de 349% na clorofila *b* e de 352% na soma das clorofilas. O conteúdo de carboidratos solúveis foi maior em plantas coinoculadas, com incremento de 218% em glicose, 36% em sacarose, 775% em frutose e 178% em amido. O conteúdo nutricional de plantas coinoculadas tiveram incremento de 324% em nitrogênio, de 387% em fósforo e 243% em potássio. Os resultados evidenciam que a aplicação dos biopromotores de forma coinoculada aprimoram o aparato fotossintético de capim marandú, proporcionando maior eficiência na aquisição de recursos e transformação de energia em ganhos produtivos, assim como proporcionou maior produção de carboidratos solúveis importantes ao crescimento vegetal. Desta forma, o uso desses biopromotores podem ser alternativa viável para uma produção mais sustentável.

**Palavras-Chave:** PGPM, carboidratos solúveis, forragem, *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) *brizantha*

### Abstract

The genus *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) has great economic importance on the national scene and has high representation in Brazilian pastures. Aiming at reducing impacts on the environment, increasing the absorption of applied fertilizers and improving the plant's physiological processes, it is necessary to develop and improve alternative technologies that contribute to this change. The objective of the study was to assess the effect of coinoculation of *Trichoderma asperellum* isolates (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 and UFRA-52) and *Bacillus subtilis* on physiology, nutritional behavior and morphometry in *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) brizhanta. The experiment was in a completely randomized design with three treatments: non-inoculated plants with reduced doses of fertilizers (C), non-inoculated plants with recommended doses of fertilizers (C+) and co-inoculated plants associated with reduced doses of fertilizers (MIX) with ten sessions each. The following were considered: gas exchange, chlorophyll a fluorescence, chlorophyll content, nutritional content and soluble carbohydrates. Coinoculation provided increments in relation to control of 25% in CO<sub>2</sub> assimilation, 140% in instantaneous carboxylation efficiency, 34% in stomatal conductance and 30% in transpiration. All variables calculated on chlorophyll a flowering and growth parameters had significant increments from coinoculation compared to control. The chlorophyll content also showed an increase due to coinoculation, being 353% in chlorophyll a, 349% in chlorophyll b and 352% in the sum of chlorophylls. The soluble carbohydrate content was higher in co-inoculated plants, with an increase of 218% in glucose, 36% in sucrose, 775% in fructose and 178% in starch. The nutritional content of co-inoculated plants had an increase of 324% in nitrogen, 387% in phosphorus and 243% in potassium. The results show that the coinoculated application of biopromoters improves the photosynthetic apparatus of marandu grass, providing greater efficiency in the acquisition of resources and transformation of energy into productive gains, as well as providing greater production of soluble carbohydrates that are important for plant growth. In this way, the use of these biopromoters can be a viable alternative for a more sustainable production.

**Keywords:** PGPM, soluble carbohydrates, forage, *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) brizantha

## 1. Introdução

O uso eficiente dos recursos naturais é essencial para o desenvolvimento sustentável, visando a redução de impactos ao meio ambiente (Leal Filho *et al.*, 2019). Biotecnologias que potencializam o crescimento da planta por promover maior absorção de nutrientes e aumento da eficiência do aparato fotossintético, os quais podem aumentar a produtividade, são necessárias serem aprimoradas, pois são responsáveis pela redução de aplicação de fertilizantes no solo. Dentre essas, destaca-se o uso de microrganismos promotores do crescimento de plantas (*Plant growth-promoting microbes*- PGPM) (Latef *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2021a; Oljira *et al.*, 2020).

A interação benéfica entre plantas e microrganismos é possível devido existir bactérias, como *Bacillus*, e fungos, como *Trichoderma*, capazes de sintetizar metabólitos que influenciam os processos fisiológicos que promove o crescimento vegetal (Lopes *et al.*, 2021b, Ghoghari *et al.*, 2022). A síntese desses metabólitos ocasiona maior absorção de nutrientes, incrementar as trocas gasosas, conteúdo de clorofila e taxa fotossintética, assim como a produção de carboidratos solúveis (Sousa *et al.*, 2018; Blake *et al.*, 2021). Influencia alterações ocorridas no crescimento, em função da inoculação, modificam a morfometria da planta, gera maior área foliar e crescimento radicular, proporciona maior absorção de luz e assimilação de CO<sub>2</sub>, assim como maior capacidade de absorção de água e nutrientes (Zhang *et al.*, 2018).

Dentre os mecanismos de ação dos microrganismos, pode-se destacar a capacidade de aumentar a fixação de nitrogênio (N), e solubilização de fósforo (P) e potássio (K). Sobre esses nutrientes essenciais para as plantas, sabe-se que possuem importantes influências no crescimento e desenvolvimento, estão envolvidos em vários processos fisiológicos e bioquímicos (Kumar *et al.*, 2019; Babu *et al.*, 2022). O N é necessário devido realizar a síntese de clorofilas, proteínas e amino ácidos (Wen *et al.*, 2020), o P é responsável pelo crescimento radicular, produção de energia química (Mitran *et al.*, 2018) e o K tem como funções ativação de enzimas, resistência a estresse e age na abertura estomática (Hasanuzzaman *et al.*, 2018). Benefícios que podem ser potencializados a partir da coinoculação, que é o uso de dois ou mais microrganismos.

A coinoculação de diferentes microrganismos que possuem efeito sinérgico é utilizada, pois seus efeitos podem superar os resultados de produção obtidos quando



## 2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos: (1) Plantas controle com adubação reduzida e sem inoculação (C), (2) Plantas controle com 100% da adubação recomendada e sem inoculadas (C+) e (3) plantas com adubação reduzida e coinoculadas com *B. subtilis* + *T. asperellum* (MIX), com 10 repetições. O uso dos inóculos em conjunto, foi decidido com base em experimento piloto, onde observou-se que a coinoculação foi altamente benéfica na planta em estudo.

A adubação foi calculada de acordo com Santos (2016), onde o tratamento C+ foi adubado com 50 kg ha<sup>-1</sup> de uréia, 80 kg ha<sup>-1</sup> superfosfato simples e 40 kg ha<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (equivalente a 0,208 g, 0,834 g e 0,125g, respectivamente). Nos tratamentos C e MIX, a adubação foi calculada com base em screening realizado a partir de três experimentos testando doses isoladas de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O, sendo encontrado a dose ótima de cada macronutriente (Costa *et al.*, 2022). Essas omissões foram em 29% de ureia, 36% de superfosfato simples e 35% de cloreto de potássio (equivalente à de 0,06 g, 0,30 g e 0,043g, respectivamente).

## 2.2 Preparo e coinoculação dos isolados

O isolado *Bacillus subtilis* (depositado no GENBANK MN175193 como UFRA-92) e *Trichoderma asperellum* foram provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas (LPP) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). A rizobactéria foi cultivada em placas de Petri com meio de cultura sólido 523 (KADO; HESKETT, 1970) e incubadas por 24 horas a 28°C. A suspensão bacteriana foi preparada em água estéril, e sua concentração foi ajustada em espectrofotômetro com frequência em 550 nm, padronizando a absorbância em (A= 0.1) (10<sup>8</sup> UFC).

O *Trichoderma* utilizado foi composto por quatro isolados (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12 e UFRA-52), sendo multiplicado em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. Em seguida as placas foram incubadas em uma câmara de crescimento por 96 h, aproximadamente 28°C, com fotoperíodo de 12 horas. Após a obtenção do isolado foi preparado suspensão aquosa de esporos com concentração de 10<sup>8</sup> esporos/mL<sup>-1</sup>. A

inoculação foi feita por meio de rega no substrato 14 dias após a emergência das plântulas; cada saco de polietileno recebeu uma suspensão de 5 ml (Lopes *et al.*, 2018).

## 2.3 Variáveis fisiológicas

### 2.3.1 Índice SPAD

Aos 35 dias após a germinação foram avaliados os parâmetros fisiológicos. O conteúdo de clorofila das plantas foi medido na última folha totalmente expandida, da base para o ápice, usando analisador de clorofila (SPAD-501, Japão, Minota). As leituras foram realizadas em três pontos da lâmina foliar e calculado a média dos valores obtidos.

### 2.3.2 Trocas gasosas

A leitura dos parâmetros de trocas gasosas foi realizada com o auxílio de um analisador de gás a infravermelho com um fluorômetro acoplado a uma câmara (LI-6400XT; LI-COR). Foi estimado a taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ), condutância estomática de vapor d'água ( $G_s$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ), sendo utilizada a última folha completamente expandida a partir da base. As leituras foram realizadas durante o período entre 09:00 e 11:00 horas, quando o período máximo de radiação fotossintética ocorre (1300 mol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 400 mol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>) (Ramazan *et al.*, 2021).

### 2.3.3 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila-*a* foi determinada usando a câmara de fluorescência (IG 6400-40; LI-COR Inc.) integrada ao sistema portátil de troca de gás de fluxo aberto. A fluorescência da clorofila *a* foi determinada na última folha completamente expandida (base ao ápice). As folhas foram adaptadas ao escuro por 30 min e iluminadas com pulso de luz para se obter a fluorescência inicial ( $F_o$ ), alcançar a máxima emissão de fluorescência ( $F_m$ ), rendimento da fluorescência no estado estacionário ( $F_s$ ), e fluorescência adaptada a luz ( $F_o'$ ).

Em seguida, a partir das medições, foram calculadas as seguintes variáveis: coeficiente de dissipação fotoquímica  $qP$  (a), coeficiente de dissipação não fotoquímica (b), atividade potencial do PSII (c), eficiência fotoquímica efetiva do PSII (d) e taxa de transferência de elétrons (e) (Maxwell and Johnson 2000).

$$(a) \quad qP = \left( \frac{F_m^F - F_o^F}{F_m^F - F_o} \right)$$

$$(b) \quad qN = 1 - qP$$

$$(c) \quad Fv/Fo = \frac{Fm - Fo}{Fo}$$

$$(d) Fv'/Fm' = \left( \frac{Fm^F - F_0}{Fm^F} \right)$$

$$(e) ETR = (\phi PSII \cdot PPFD \cdot 0,42)$$

### 2.3.4 Conteúdo de Clorofila

Foram utilizadas 10 mg de massa fresca das folhas que foram realizadas as leituras do SPAD. Para extrair o conteúdo de clorofila total, o tecido foliar foi macerado com 250  $\mu$ L de etanol 98% (v/v). E em seguida, foi incubado por 20 min a 80°C, sendo centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o material residual foi lavado duas vezes com 200  $\mu$ L de etanol. A primeira sendo realizada com etanol 80% e a segunda com etanol a 50%, os sobrenadantes foram homogeneizados e o volume final foi ajustado para 600  $\mu$ L. A quantificação foi realizada de acordo com o método descrito por Porra; Thompson; Kriedemann (1989). Uma alíquota de 35  $\mu$ L de cada amostra foi coletada e adicionada a um meio de reação contendo 120  $\mu$ L de etanol 98 % e 15  $\mu$ L de acetato (volume final de 170  $\mu$ L por poço/amostra). A absorvância das amostras foi realizada nos comprimentos de ondas de 645 nm e 665 nm e o conteúdo total de clorofila *a* (Chla) e clorofila *b* (Chlb) e Chla + Chlb foi determinado pelas fórmulas (a) e (b), descrito por Porra; Thompson; Kriedemann. (1989). Os resultados encontrados foram posteriormente normalizados para a massa fresca total.

$$(A) Chla = 5,48 * Abs 665 - 2,16 * Abs 645$$

$$(B) Chlb = 9,67 * Abs 645 - 4,04 * Abs 665$$

### 2.3.5 Quantificação de Amido

Foi pesado 100 mg de material fresco (folha) em microtubo. Em seguida extraído com 400  $\mu$ L de etanol 80%, processo o qual foi realizado duas vezes, coletado os sobrenadantes e armazenados em outro microtubo. Os sobrenadantes foram incubados em banho maria a 70°C por 90 minutos e após centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo. Ao pellet, foi adicionado 800  $\mu$ L de etanol 80% e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. Os dois sobrenadantes foram homogeneizados e armazenados para a quantificação de glicose, frutose e sacarose (Robbins; Pharr. 1988; Trethwey et al., 1998).

Ao *pellet* foi adicionado 1 mL de KOH 0,2 M e homogeneizado. Em seguida foi incubado em banho maria a 95 °C por duas horas e posteriormente adicionado 150  $\mu$ L de ácido acético. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas novamente a 13.000

rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e incubado com tampão citrato de sódio 0,3 M, amiloglicosidase e água (volume final 150 µL) a 55 °C por 60 minutos (Robbins; Pharr. 1988; Robinson; Hewitt; Bennett. 1988; Trethwey *et al.*, 1998). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos e preparadas para a leitora de microplacas (ELISA). Na microplaca foi adicionado 125 µL de tampão A2x, 20 µL do extrato e 95 µL de água com volume final de 240 µL. Após a estabilização do equipamento com o comprimento de onda a 340nm foi adicionado 5 µL de hexocinase (0,2 U/poço) para a quantificação da glicose gerada a partir da quebra do amido (Stitt *et al.*, 1989). O cálculo para a quantificação de amido na massa fresca foi realizado seguindo a fórmula 1.

$\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$

$$= \left( \frac{(\Delta\text{Abs } 6,22) * \left(\frac{270}{1000}\right) * \left(\frac{\text{Volume } 1^{\circ}\text{reação}}{\text{alíquota elisa}}\right) * \left(\frac{\text{Volume total extrato}}{\text{alíquota da } 1^{\circ}\text{ reação}}\right)}{\text{gMF}} \right) * 0,9$$

### 2.3.6 Quantificação de carboidratos solúveis

O extrato coletado a partir da maceração com etanol 80% citado no item 3 foi utilizado para a quantificação de glicose, sacarose e frutose. O leitor de microplacas (ELISA), ajustado com o comprimento de onda a 340 nm, foi utilizado para a quantificação desses açúcares. Inicialmente foi adicionado 125 µL de tampão A2x, 20 µL do extrato e 95 µL de água com volume final de 240 µL. Após a estabilização do equipamento, foi adicionado 5 µL de fosfoglicoisomerase-PGI (0,4 U/poço) para quantificar a glicose. Em seguida, após estabilizado as leituras para glicose, nos mesmos poços foram adicionados 5 µL de invertase 2 U/poço para realizar a quantificação da sacarose. (Stitt *et al.*, 1989). O cálculo para a quantificação de açúcares em função da massa fresca foi realizado de acordo com as seguintes fórmulas.

$$\text{Sacarose} = \frac{[(0,5 * \frac{\Delta\text{Abs}}{6,22}) * (\frac{255}{1000}) * (\frac{\text{volume total do extrato}}{\text{alíquota da reação}})]}{\text{MF (g)}}$$

$$\text{Glicose} = \frac{[(\frac{\Delta\text{Abs}}{6,22}) * (\frac{245}{1000}) * (\frac{\text{volume total do extrato}}{\text{alíquota da reação}})]}{\text{MF (g)}}$$

$$\text{Frutose} = \frac{[(\frac{\Delta\text{Abs}}{6,22}) * (\frac{250}{1000}) * (\frac{\text{volume total do extrato}}{\text{alíquota da reação}})]}{\text{MF (g)}}$$

## 2.4 Parâmetros de crescimento

Aos 35 dias após a emergência das plantas, foram avaliados os parâmetros biométricos e calculados de acordo com Gomide e Gomide (2000): taxa de aparecimento de folhas (TApF- folhas. Perfilho<sup>-1</sup>. dia<sup>-1</sup>) foi encontrado pela diferença entre o número de folhas inicial e final pelo número de dias do intervalo de avaliação, taxa de alongamento das folhas (TAIF- cm. perfilho<sup>-1</sup>. dia<sup>-1</sup>) foi encontrado pela diferença entre a taxa de comprimento inicial e final de folha expandida pelo número de dias do intervalo de avaliações. Também foi mensurado a altura da planta, massa seca da folha e raiz e calculado a área foliar pela equação,  $(Y=0,7480 \times (\text{Comprimento} \times \text{Largura}))$  (Bianco *et al.*, 2000). Para a avaliação de matéria seca, dez plantas por tratamento foram coletadas e separadas em parte aérea e raízes. O material vegetal foi seco em estufa (60°C) até atingir massa constante.

## 2.5 Parâmetros nutricionais

As folhas foram coletadas e em seguida colocado para secar em estufa com circulação forçada de ar, em temperatura média de 60 °C até atingir peso constante. Em seguida, efetuou-se a moagem em moinhos tipo Willey, assegurando a homogeneização da amostra. Posteriormente procedeu-se a digestão, em bloco digestor, do tecido vegetal, para a determinação dos teores dos nutrientes (N, P e K). O nitrogênio foi extraído pelo método de Kjeldahl com solução de (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou HCl 0,01 N), fósforo e potássio foram extraídos pela solução de Mehlich-1 (HCl 0.05 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.0125 mol L<sup>-1</sup>) (Carmo *et al.*, 2000).

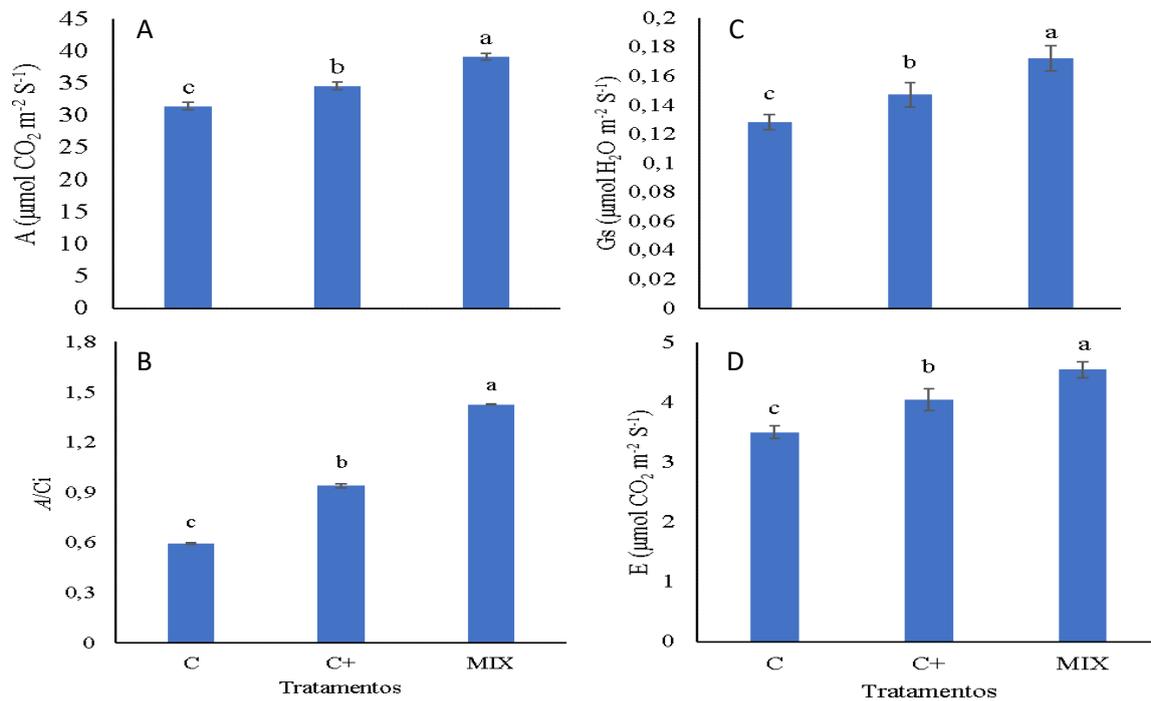
## 2.6 Análise estatística

Inicialmente os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. Em seguida foram submetidos a análise de variância, e quando significativos pelo teste F, foi realizado o teste de SNK com  $p < 0,05$  para os tratamentos. Os dados de análise nutricional foram submetidos ao teste t ( $p < 0,05$ ).

## 3 Resultados

### Trocas gasosas

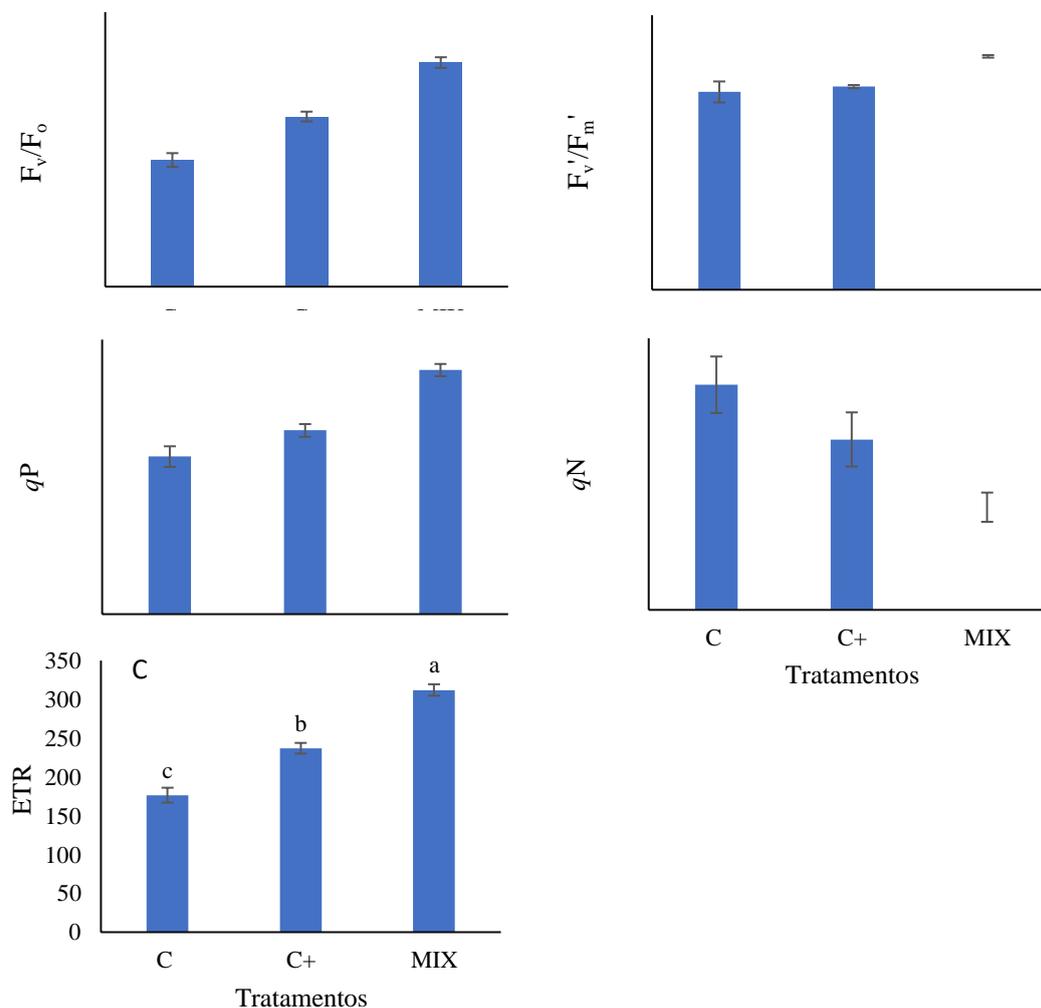
Plantas coinoculadas com *Bacillus* + *Trichoderma* apresentaram aumento em todas os parâmetros de trocas gasosas em relação as plantas controle (C, C+). O incremento na assimilação de CO<sub>2</sub> (A) foi de 25% e 13% (Figura 1A), de 140% e 53% a eficiência instantânea de carboxilação (A/C<sub>i</sub>) (1B), de 34% e 17% a condutância estomática (G<sub>s</sub>) (Figura 1C) e de 30% e 12% a transpiração (E) (Figura 1D).



**Figura 1:** Taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  (A), eficiência instantânea de carboxilação (B), condutância estomática (C) e taxa de transpiração (D) em folhas de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK.

### Fluorescência da clorofila *a*

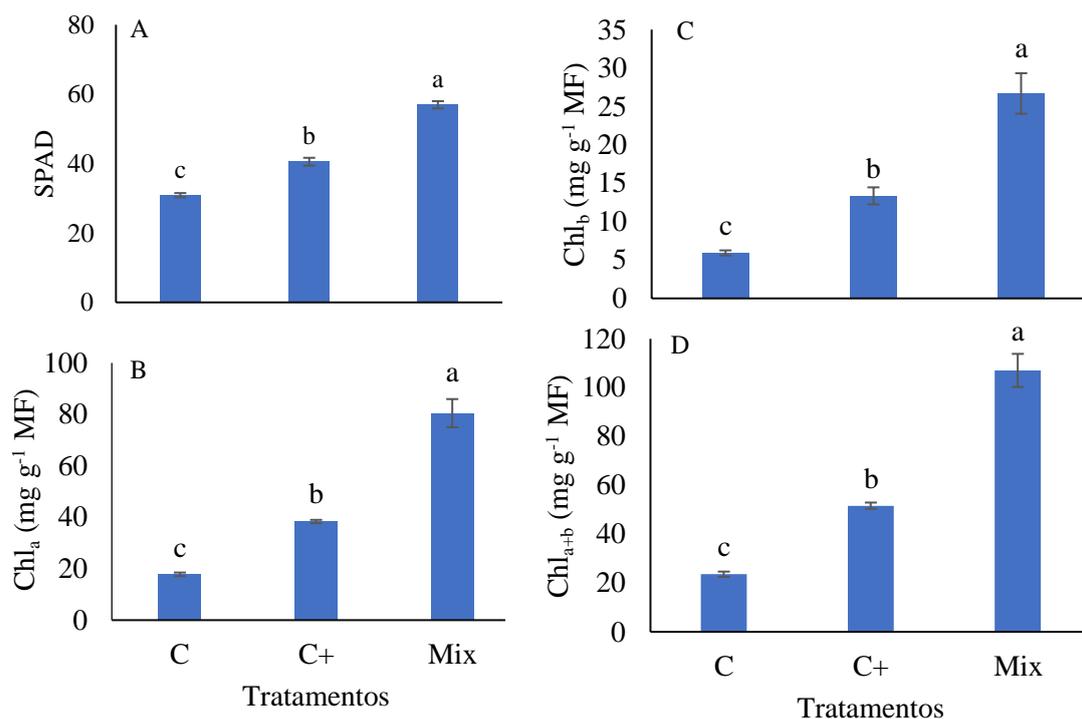
Plantas coinoculadas apresentaram aumento nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v'/F_m'$ ,  $qP$  e ETR em relação as plantas controle (C, C+). Enquanto  $qN$  foi reduzido em plantas coinoculadas, quando comparadas a plantas controle (C, C+). A coinoculação incrementou os parâmetros de clorofila *a* em 33% e 78% em  $F_v/F_o$ , 18% e 3% para a relação  $F_v'/F_m'$ , e em 32% e 55% de  $qP$ , O ETR teve aumento de 32% e 77%, enquanto  $qN$  apresentou decréscimo de 41% e 55% (Figura 2).



**Figura 2:** Atividade potencial dos centros de reação do PSII (A), coeficientes de extinção fotoquímica (B), taxa de transferência de elétrons (C), eficiência fotoquímica efetiva do PSII (D) e coeficientes de extinção não fotoquímica (E) em folhas de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK.

### Índice SPAD e conteúdo de clorofilas

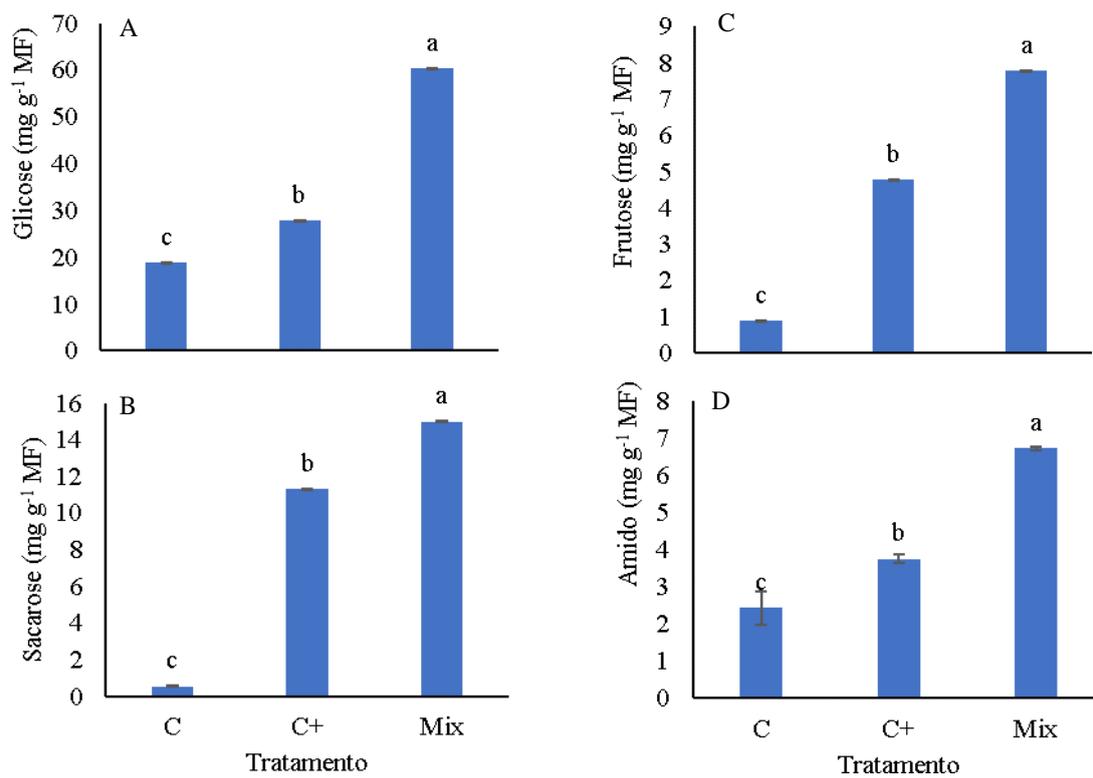
Plantas coinoculadas com *B. subtilis* e *T. asperellum* apresentaram incrementos significativos no índice SPAD, Chl<sub>a</sub>, Chl<sub>b</sub> e Chl<sub>a</sub>+Chl<sub>b</sub>, quando comparadas a plantas controle (C e C+). O incremento foi de 84% e 40% no índice SPAD, de 353% e 110% no conteúdo de Chl<sub>a</sub>, de 349% e 100% no conteúdo de Chl<sub>b</sub>, e de 352% e 107% no conteúdo de Chl<sub>a</sub>+Chl<sub>b</sub> (Figura 3).



**Figura 3:** Índice SPAD(A), conteúdo de clorofila *a* (B), clorofila *b* (C), e clorofila total *a*+*b* (D) de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK.

### Conteúdo de carboidratos solúveis

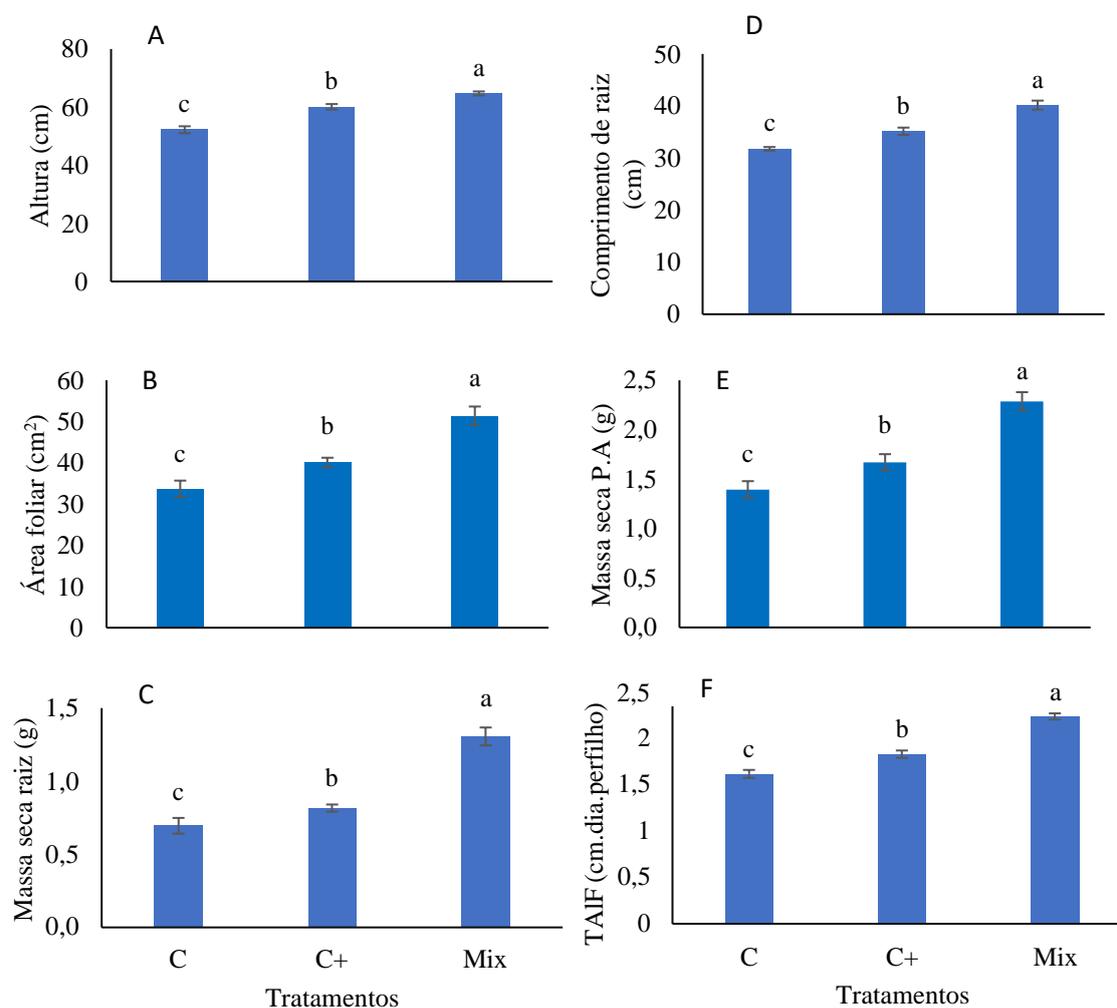
Plantas coinoculadas obtiveram aumento nas concentrações de todos os carboidratos solúveis, comparados a plantas controle com doses reduzidas (C) e com dose máxima de NPK (C+). O incremento para glicose foi em 218% e 115%, para sacarose em 2659% a 36%, para frutose em 775% e 63% e de 178% e 80% de amido (Figura 4).



**Figura 4:** Concentrações de glicose (A), sacarose (B), frutose (C) e amido (D) de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK.

### Parâmetros de crescimento

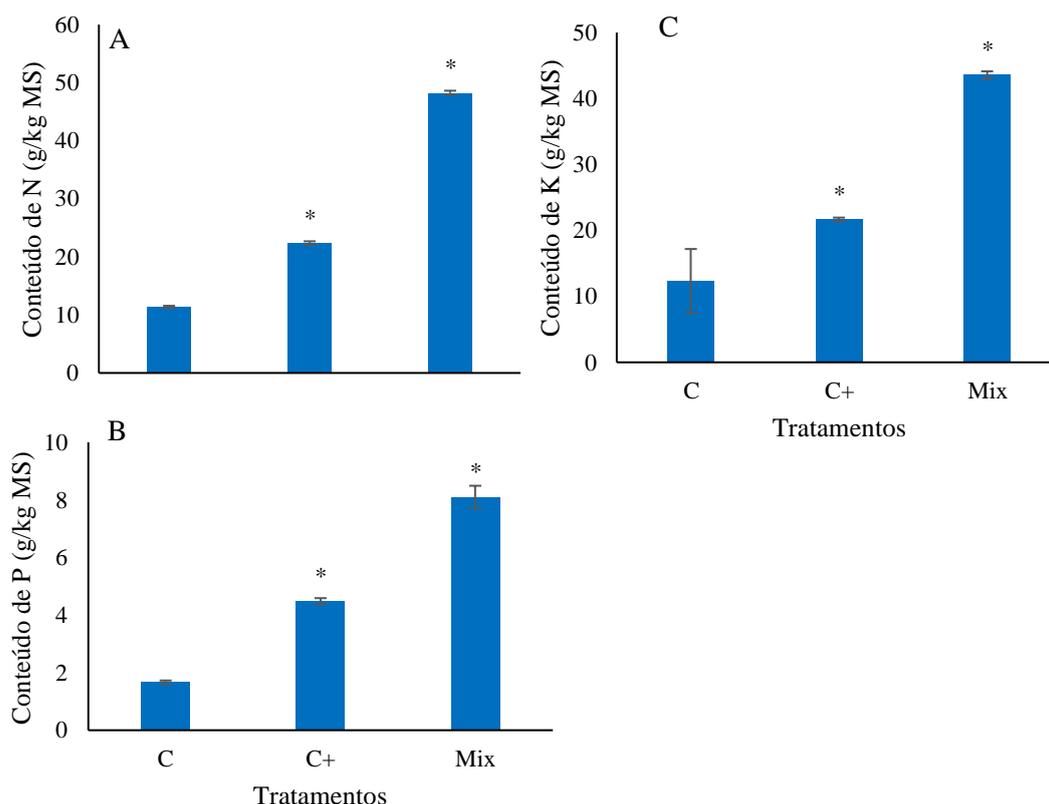
A coinoculação com *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* (MIX), proporcionou incrementos significativos nas variáveis avaliadas, exceto na taxa de aparecimento foliar, quando comparado a plantas controle (C, C+). O incremento variou entre 8% e 24% para comprimento da parte aérea, para comprimento de raiz foi de 14% e 26%, para área foliar foi de 28% e 53%, para massa seca de parte aérea foi de 37% e 65%, para massa seca de raiz foi de 60% e 90%, para taxa de alongamento foliar foi superior 30% (Figura 5).



**Figura 5:** Altura (A), área foliar (B), comprimento de raiz (C) e massa seca da folha (D) de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK.

## Conteúdo Nutricional

Plantas coinoculadas com *B. subtilis* e *T asperellum*, apresentaram aumento no conteúdo nutricional foliar de 324% e 115% para N, de 387% e 80% para P, de 243% e 101% para K, comparadas ao controle com adubação reduzida (C) e com adubação total (C+), respectivamente. (Figura 6).



**Figura 6:** Conteúdo nutricional de nitrogênio (A), fósforo (B) e potássio (K) de folha de *Urochloa brizantha* cv Marandu inoculadas com *Trichoderma asperellum* (UFRA-06, UFRA-09, UFRA-12, UFRA-52) e *Bacillus subtilis* com formulação (Mix). (\*) difere estatisticamente pelo teste t ( $p < 0.05$ ). C = Plantas não inoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK; C+ = Plantas não inoculadas e adubadas com dose máxima de NPK; MIX = Plantas coinoculadas e adubadas com dose reduzida de NPK.

## Discussão

No presente estudo, foi confirmado a hipótese que a coinoculação com *B. subtilis* e *T. asperellum* proporciona incremento na eficiência do aparato fotossintético, aumentou o acúmulo nutricional, na produção de carboidratos solúveis e na biomassa do capim Marandu. Plantas controle apresentaram redução em todos os parâmetros de crescimento, fisiológicos e bioquímicos em relação a plantas coinoculadas, o que indica que a coinoculação otimizou o processo de crescimento por meio de mecanismos diretos e indiretos.

O incremento na assimilação de CO<sub>2</sub> (A) de plantas coinoculadas, pode estar relacionado a maior abertura estomática, sendo refletido no aumento da assimilação de CO<sub>2</sub>. Em condições adequadas, a maior abertura dos estômatos pode ocorrer em função da ativação da bomba de potássio, a partir da incidência da luz sobre as folhas (Inoue *et al.*, 2020). Outro componente importante é a concentração de clorofilas nas folhas, as quais são responsáveis pela captação de energia solar para posterior transformação em energia química.

Os microrganismos foram responsáveis pela maior absorção de N e K<sup>+</sup>, nutrientes que atuam na síntese de clorofilas e abertura estomática (Wen *et al.*, 2019; Lim *et al.*, 2022). Neste contexto, a coinoculação aumentou a assimilação de carbono durante o processo fotossintético, e essa condição proporcionou maior crescimento da planta. A maior troca gasosa de plantas coinoculadas também pode ser explicada em função da expressão genética. A utilização de micorriza proporcionou incremento nas trocas gasosas em função da maior abertura estomática, comportamento o qual foi relacionado pelos autores em função da inoculação proporcionar maior expressão de genes nas células guarda que estão ligados à sua abertura (Cheng *et al.*, 2021).

Resultados similares também foram encontrados por Nascente *et al.*, (2017), onde verificaram que a aplicação de rizobactéria e *Trichoderma* aumentaram a assimilação de CO<sub>2</sub> em plantas de arroz. Lopes *et al.*, (2018) avaliando doses crescentes de nitrogênio em capim Piatã, verificaram que o aumento da taxa fotossintética foi maior em plantas inoculadas e com doses elevadas de N. Os incrementos encontrados nas trocas gasosas foram relacionados em função da abertura estomática, na melhoria ocorrida no aparato fotossintético e aumento da área foliar, os quais foram potencializados pelos microrganismos envolvidos em função dos seus mecanismos de ação.

A maior eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ) associada a maior condutância estomática ( $G_s$ ), sugere que plantas coinoculadas tiveram menor resistência a difusão de  $CO_2$  em função da abertura estomática e maior eficiência na sua redução. O comportamento verificado em plantas coinoculadas, com maior abertura estomática, favorece elevada transpiração ( $E$ ), nessas condições, ocorre maior perda de água (Kimura *et al.*, 2020). No entanto, quando a disponibilidade hídrica não é fator limitante para o seu desenvolvimento, a maior abertura dos estômatos reduz a resistência à difusão de  $CO_2$ , favorecendo a atividade fotossintética, incrementando o crescimento da planta (Soltani; Sinclair, 2012).

As variáveis da fluorescência da clorofila  $a$  tiveram incremento a partir da coinoculação, em função da maior expansão foliar, permitindo que essas plantas tivessem maior capacidade de absorção de energia. Neste contexto, os incrementos encontrados no conteúdo de clorofilas e nas trocas gasosas, também contribuíram para o melhor desempenho das variáveis ligadas ao fotossistema II.

O incremento encontrado em  $F_v/F_o$ , induzido pela coinoculação, sugere que os microrganismos podem atenuar estresse, como a restrição nutricional, que podem causar danos ao PSII. De acordo com Samaniego-Gómez *et al.*, (2016) o incremento encontrado nesta variável, em função da inoculação, pode minimizar efeitos negativos gerados por condições de estresse que a planta pode passar. O rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v'/F_m'$ ) é indicativo da eficiência na captura de energia através dos centros de reações abertos do PSII (Bashir *et al.*, 2021).

Plantas em condições normais, sem estarem submetidas a fatores limitantes, apresentam esta relação entre 0,75 e 0,85 (Santos *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de espinafre inoculadas com *Bacillus* + *Trichoderma* também apresentaram incremento no rendimento quântico, quando comparados a plantas não inoculadas (Vitale *et al.*, 2020).

Nesse estudo, também foi possível perceber a maior capacidade de utilização de luz e a elevada eficiência do fotossistema II, através dos incrementos encontrados em  $qP$  e na taxa de transferência de elétrons (ETR). Isso porque, segundo Krause; Weis (1984), a  $qP$  é a quantidade de elétrons transferidos que foram utilizados no processo fotoquímico, e este aumento indica maior taxa de transferência de energia no PSII, o que pode ter favorecido o incremento na taxa de transporte de elétrons. A aplicação de

microrganismos em tomate foi responsável por gerar incrementos na fluorescência inicial, máxima, rendimento quântico máximo e em ETR, assim como os encontrados neste trabalho (Passari *et al.*, 2019).

O incremento da fotossíntese associado ao aumento da ETR e  $F_v'/F_m'$ , indicam que a eficiência do aparato fotossintético foi otimizada em doses reduzidas de NPK, quando associados a coinoculação com *T. asperellum* e *B. subtilis*. O aumento na taxa de transporte de elétrons do PSII sugeriu que o aceptor quinona ( $Q_a$ ) foi altamente oxidado e a energia de excitação foi utilizada para o transporte de elétrons (Khalaj *et al.* 2019). A partir dos dados obtidos, pode-se afirmar que a coinoculação de plantas possui potencial de aumentar taxas de assimilação de  $CO_2$  e crescimento do capim Marandu.

O incremento encontrado em  $qP$  contribuiu para menor geração e dissipação de energia não fotoquímica ( $qN$ ) em tratamento coinoculados. Valores reduzidos de  $qN$  sugerem melhor controle dos mecanismos de fotoproteção dos pigmentos fotossintéticos, e o incremento da eficiência fotoquímica é diretamente relacionada a integridade de proteína, que são responsáveis pelo transporte de água para a clorofila associada ao PSII (Ruban; Wilson. 2021).

Os incrementos encontrados no rendimento quântico, dissipação fotoquímica e redução na dissipação não fotoquímica em função da aplicação dos microrganismos, mostram a eficiência do fotossistema II e servem como indicadores da performance fotossintética da planta. Como observado em *Phaseolus vulgaris* L. inoculado com mix de microrganismos (Higa. 2000), que contribuiu com aumento em 12,5% o rendimento quântico máximo, em 7,7% a eficiência fotoquímica e em 8% na ETR (Talaat 2019).

Os benefícios nas variáveis fisiológicas também podem estar relacionados ao conteúdo nutricional adequado de NPK. Isso porque a deficiência de nitrogênio prejudica a eficiência fotossintética, conseqüentemente, influência de forma negativa a produtividade da forrageira (Araújo *et al.*, 2022). Além do N ser um componente essencial na síntese de clorofila, atua também na formação de aminoácidos e ácidos nucleicos, sem o qual, a síntese de proteínas, enzimas, DNA e RNA, necessários para as células vegetais, seriam prejudicadas (Lopes *et al.*, 2021b; Mitter *et al.*, 2021).

No presente estudo, a coinoculação de *T. asperellum* com *B. subtilis*, proporcionou maior conteúdo de clorofila *a*, *b*, total e do índice SPAD. Porque aumentaram a absorção do N, uma vez que esse nutriente faz parte da molécula de

clorofila (Abadi *et al.*, 2020). A maior fixação de nitrogênio induzida pelos microrganismos inoculados, proporcionou maior expansão da área foliar e formação de clorofilas, o que influenciou a concentração desses pigmentos fotossintéticos no capim Marandu. Esses resultados demonstram que o uso desses microrganismos potencializou o efeito da adubação.

Maior conteúdo de N, seguido de incremento do índice SPAD e da biomassa também foi observado em *Urochloa* inoculada com bactérias endolíticas sob doses reduzidas de fertilizantes (Kelemu *et al.*, 2011). A inoculação com *T. asperellum* também foi benéfica para Cana-de-açúcar, promovendo incremento médio de 15% no conteúdo de clorofila *a* e clorofila *b*, quando comparadas a plantas não inoculadas (Scudeletti *et al.*, 2021). Chaudhary *et al.*, (2021), demonstraram que a inoculação de *Bacillus* spp. em plantas de milho aumentou o conteúdo de clorofilas. O conteúdo de clorofila *a* e *b* em plantas de milho tiveram aumento significativos em função da inoculação com *T. asperellum* (Fu *et al.*, 2018). Os resultados citados anteriormente, estão de acordo com os encontrados neste estudo, pois indicam que a inoculação desses promotores de crescimento, em plantas da família *Poaceae*, são responsáveis por aumentar a quantidade de pigmentos fotossintéticos, por aprimorar a aquisição de N.

A eficiência instantânea de carboxilação também apresentou incrementos significativos a partir da maior assimilação de CO<sub>2</sub> em plantas inoculadas. Resultando em incrementos significativos nos carboidratos solúveis em folhas de capim Marandu. É possível afirmar que os microrganismos utilizados foram responsáveis pelo aumento do conteúdo de carboidratos, por agirem no metabolismo de formação desses açúcares a partir da síntese de enzimas envolvidas no processo de redução de carboidratos complexos.

Resultado semelhantes foram descritos por Bisht, Mishra e Chauhan (2020), onde verificaram que plantas de arroz inoculadas com *Bacillus amyloliquefaciens* com doses reduzidas, tiveram maior conteúdo de carboidratos, os quais foram relacionados a expressão de β-glicosidase e frutose-1,6-bifosfato, que são enzimas envolvidas na rota glicolítica, responsáveis pela produção de açúcares. Plantas de arroz inoculados com *Trichoderma* também foram verificados aumentos nos conteúdos de carboidratos solúveis, o qual foi proporcionado pela maior atividade enzimática da celulase, xilanase. A maior atividade dessas enzimas foi responsável pela maior produção de hexoses e pentoses (Pan *et al.*, 2018).

A maior concentração de amido em plantas inoculadas, demonstra que a produção e fornecimento de sacarose para órgãos dreno foi ideal para o seu desenvolvimento. Tendo em vista que em situações que o vegetal não está em condição de estresse, o comportamento natural da planta é de armazenamento do amido durante o dia e consumo do mesmo durante a noite (Taiz; Zeiger. 2006). Neste estudo, a maior produção desse açúcar de reserva pode ter contribuído para o maior desenvolvimento de plantas inoculadas. Pois, durante a noite, a maior disponibilidade dessa fonte de reserva pode ter permitido maior utilização e transporte para órgãos dreno.

A coinoculação com *T. asperellum* e *B. subtilis* também incrementou a concentração de NPK e os parâmetros de crescimento das plantas (Figuras 5 e 6). O uso dos biopromotores foram benéficos em reduzir a adubação em 28% de N, 36% de P e 35% de K, a partir de mecanismos de solubilização, mineralização, fixação de nutrientes, produção de ácidos orgânicos e sideróforos (Laslo; Mara. 2019). O efeito positivo da coinoculação em doses reduzidas de NPK pode ser atribuído a alteração da arquitetura radicular (Win *et al.*, 2018), pode ser relacionado a síntese de reguladores de crescimento, os quais estimulam o crescimento de pêlos radiculares, permitindo melhor absorção de água e nutrientes do solo (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, foram reportados por Khadka; Uphoff. (2019), Wang *et al.*, (2020), avaliando o efeito de *Trichoderma* e rizobacterias em plantas de arroz e trigo, respectivamente. Os autores encontraram os maiores conteúdos de N, P e K em plantas inoculadas, quando comparadas a plantas controle. Os resultados foram associados a habilidade fixadora de N e capacidade de solubilizar P e K, os autores também relatam que os microrganismos utilizados contribuem para a maior adaptabilidade a efeitos abióticos, como a restrição nutricional, reduz a competição entre microrganismos por nutrientes, fazendo com que a planta possua capacidade para o seu desenvolvimento.

Este estudo também comprova que *Bacillus* e *Trichoderma* são eficientes em solubilizar e disponibilizar o P para planta, o que também incrementa o processo fotossíntese e atividades de enzimas, uma vez que esse nutriente faz parte de moléculas orgânicas como a adenosina difosfato (ADP) e trifosfato (ATP), contribuindo na transferência e armazenamento de energia (Bang *et al.*, 2021). Yin *et al.*, (2015) ao fazer associação com fungos solubilizadores de P tiveram incrementos significativos na biomassa radicular, o qual foi associado a produção de ácidos orgânicos. Esses compostos

orgânicos são responsáveis pela solubilização de P, a partir da acidificação do meio, e a maior disponibilidade desse nutriente contribui para maior desenvolvimento radicular. Resultados semelhantes também foram encontrados por Stephen *et al.*, (2015), em plantas de arroz inoculadas com bactéria solubilizadora de fosfato.

O incremento do potássio também foi benéfico a planta, está envolvido na ativação de enzimas, formação de proteínas e fotossíntese (Lopes *et al.*, 2021a; Bang *et al.*, 2021). O maior desenvolvimento radicular de plantas coinoculados contribuiu diretamente para a maior absorção deste nutriente, pois a arquitetura radicular destas plantas permitiu que houvesse maior contato do nutriente e conseqüentemente maior possibilidade de absorção.

A aplicação de biopromotores associado a redução de fertilização mineral, também foi relatado por Naher *et al.*, (2016), onde verificaram maior teor nutricional em gramínea, em função dos mecanismos de fixação e solubilização dos microrganismos inoculados, quando comparadas ao tratamento com 100% de NPK não inoculado. A produção de fitohormônios como ácido indolacético (AIA), ligados ao maior desenvolvimento radicular, também influencia a maior absorção, pois como descrito, há o maior contato das raízes e de pêlos radiculares com água e nutrientes do solo (Liu *et al.*, 2018).

As melhorias no aparato fotossintético e na maior absorção de nutrientes, como resultado da coinoculação, foi refletido na morfometria do capim Marandu. Plantas coinoculadas apresentaram maior altura, comprimento de raiz, área foliar, massa seca e taxa de alongamento foliar (TAIF). Os resultados, confirmam a hipótese que plantas coinoculadas com *T. asperellum* e *B. subtilis* (Mix), promovem maior crescimento do capim. A interação benéfica entre microrganismos em pastagem também foi observada por Djonova *et al.*, (2016) e Lopes *et al.* (2020) onde a coinoculação promoveu incrementos significativos na produção de biomassa, e esses resultados foram relacionados como sendo ação dos microrganismos por meio dos seus mecanismos diretos e indiretos.

Benefícios da inoculação em gramínea também foram encontrados por Ehteshami *et al.*, (2018). Nesse estudo, plantas coinoculadas com microrganismos promotores de crescimento apresentaram aumento da parte aérea quando comparado ao tratamento que recebeu apenas fertilização mineral. A inoculação de bactéria em gramínea também

apresentou incrementos significativos, em altura, matéria seca e fresca, número de folhas, quando comparado a plantas com adubação inorgânica (Shaaban; Khalil; Tantawy. 2015). Estas respostas estão relacionadas a maior possibilidade de aquisição dos nutrientes aplicados, assim como, possivelmente, a maior produção de ácidos orgânicos ligados ao crescimento da planta, que permite aumento dos parâmetros de crescimento.

A partir dos resultados encontrados, pode-se afirmar que o *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum*, os quais também são promotores de crescimento em outros gêneros, espécies, variedades e cultivares da família *Poaceae*, otimizaram o aparato fotossintético da planta, aumentaram a produção de fotoassimilados e absorção dos nutrientes, os quais foram refletidos no crescimento do capim.

#### **4 Conclusão**

A coinoculação com *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* promoveu maior eficiência do aparato fotossintético, maior absorção e acúmulo nutricional em capim Marandu. O desenvolvimento inicial do capim, avaliado a partir trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e conteúdo de carboidratos solúveis, apresentaram maiores incrementos nos parâmetros biométricos e acúmulo de nutrientes, nos tratamentos coinoculados. Desta forma, é possível dizer que o uso em conjunto de *B. subtilis* e *T. asperellum* é uma alternativa viável para a redução de insumos minerais, aumentando a disponibilidade de NPK para a planta. O que por sua vez seria altamente benéfico no estabelecimento do pasto, pois a maior absorção e utilização dos nutrientes conduziria ao maior rendimento e cobertura mais rápida do solo em pastagens formadas com capim marandu.

## 5 Referências

- Abadi, V. A. J. M., Sepehri, M., Rahmani, H. A., Zarei, M., Ronaghi, A., Taghavi, S. M., & Shamshiripour, M. (2020). Role of Dominant Phyllosphere Bacteria with Plant Growth–Promoting Characteristics on Growth and Nutrition of Maize (*Zea mays* L.). <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00302-1>
- Al-zazee, A. M. M; Neelgund, S; Gurimurthy, D. M; Rajeshwara, A. N. (2011). Identification, characterization of novel halophilic *Bacillus Cereus* Ms6: A Source for extra cellular  $\alpha$ -amylase. *Advances in Environmental Biology*, 5(5), 992-999.
- Araújo, W. B. S., Teixeira, G. C. M., de Mello Prado, R., & Rocha, A. M. S. (2022). Silicon mitigates nutritional stress of nitrogen, phosphorus, and calcium deficiency in two forages plants. *Scientific Reports*, 12(1), 1-11. | <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10615-z>
- Babu, S., Singh, R., Yadav, D., Rathore, S. S., Raj, R., Avasthe, R., ... & Singh, V. K. (2022). Nanofertilizers for agricultural and environmental sustainability. *Chemosphere*, 292, 133451. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133451>
- Bang, T. C., Husted, S., Laursen, K. H., Persson, D. P., & Schjoerring, J. K. (2021). The molecular–physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. *New Phytologist*, 229(5), 2446-2469. <https://doi.org/10.1111/nph.17074>
- Bashir, N., Athar, H. U. R., Kalaji, H. M., Wróbel, J., Mahmood, S., Zafar, Z. U., & Ashraf, M. (2021). Is Photoprotection of PSII One of the Key Mechanisms for Drought Tolerance in Maize?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13490. <https://doi.org/10.3390/ijms222413490>
- Bianco, S., Brendolan, R. A., Alves, P. L., & Pitelli, R. A. (2000). Estimativa da área foliar de plantas daninhas: *Brachiaria decumbens* Stapf. e *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. *Planta Daninha*, 18(1), 79-83.
- Bisht, N., Mishra, S. K., & Chauhan, P. S. (2020). *Bacillus amyloliquefaciens* inoculation alters physiology of rice (*Oryza sativa* L. var. IR-36) through modulating carbohydrate metabolism to mitigate stress induced by nutrient starvation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 937-951. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.154>
- Blake, C., Christensen, M. N., & Kovács, Á. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(1), 15-25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
- Carmo, C. D. S., de Araujo, W. S., Bernardi, A. D. C., & Saldanha, M. F. C. (2000). Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Embrapa Solos-Circular Técnica (INFOTECA-E). <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/337672>
- Castro, G. L. S., Rêgo, M. C. F., Silvestre, W. V. D., Batista, T. F. V., & da Silva, G. B. (2020). Açai palm seedling growth promotion by rhizobacteria inoculation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(1), 205-216. doi: 10.1007/s42770-019-00159-2
- Chaudhary, P., Khati, P., Chaudhary, A., Gangola, S., Kumar, R., & Sharma, A. (2021). Bioinoculation using indigenous *Bacillus* spp. improves growth and yield of *Zea mays*

under the influence of nanozeolite. *3 Biotech*, <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02561-2>

Cheng, H. Q., Zou, Y. N., Wu, Q. S., & Kuča, K. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate drought stress in trifoliolate orange by regulating H<sup>+</sup>-ATPase activity and gene expression. *Frontiers in plant science*, *12*, 461. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.659694>

Duarte, C. F. D., Cecato, U., Biserra, T. T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). Azospirillum spp. in grasses and forages. Review. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2020b, *11*, 223-40. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>

Djonova, E., Petkova, G., Stancheva, I., Geneva, M; Michovsky, T. (2016). Response of Pasture Grasses to Inoculation With Mycorrhizal Fungi and N-Fixing Bacteria. *Bulgarian Journal of Soil Science*, *1*, 64-77.

Ehteshami, S. M., Khavazi, K; Asgharzadeh, A. (2018). Forage sorghum quantity and quality as affected by biological phosphorous fertilization. *Grass and Forage Science*, *73*(4), 926-937. <https://doi.org/10.1111/gfs.12388>

Fu, J., Wang, Y. F., Liu, Z. H., Li, Z. T., & Yang, K. J. (2018). Trichoderma asperellum alleviates the effects of saline–alkaline stress on maize seedlings via the regulation of photosynthesis and nitrogen metabolism. *Plant Growth Regulation*, *85*(3), 363-374. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0386-4>

Garcez Neto, A. F., Nascimento Junior, D. D., Regazzi, A. J., Fonseca, D. M. D., Mosquim, P. R., & Gobbi, K. F. (2002). Respostas morfogênicas e estruturais de Panicum maximum cv. Mombaça sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e alturas de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *31*, 1890-1900. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000800004>

Ghoghari, N., Bharwad, K., Champaneria, A., & Rajkumar, S. (2022). Microbial consortia for augmentation of plant growth–revisiting the promising approach towards sustainable agriculture. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 231-256). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85163-3.00014-4>

Gomide, C. A. M., & Gomide, J. A. (2000). Morfogênese de cultivares de Panicum maximum Jacq. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *29*(2), 341-348.

Hanisch, A. L., Balbinot Junior, A. A; Vogt, G. A. (2017). Desempenho produtivo de Urochloa brizantha cv. Marandu em função da inoculação com Azospirillum e doses de nitrogênio. *Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i3.3916>

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Nahar, K., Hossain, M. D., Mahmud, J. A., Hossen, M., ... & Fujita, M. (2018). Potassium: a vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy*, *8*(3), 31. <https://doi.org/10.3390/agronomy8030031>

Higa, T. (2000). What is EM technology. *EM World Journal*, *1*, 1-6.

Inoue, S. I., Kaiserli, E., Zhao, X., Waksman, T., Takemiya, A., Okumura, M.,..... & Shimazaki, K. I. (2020). CIPK23 regulates blue light-dependent stomatal opening in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *104*(3), 679-692. doi: 10.1111/tpj.14955

Kado, C. I., & Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. *Phytopathology*, 60(6), 969-976.

Khadka, R. B., & Uphoff, N. (2019). Effects of Trichoderma seedling treatment with System of Rice Intensification management and with conventional management of transplanted rice. *PeerJ*, 7, e5877. DOI 10.7717/peerj.5877

Kelemu, S., Fory, P., Zuleta, C., Ricaurte, J., Rao, I., & Lascano, C. (2011). Detecting bacterial endophytes in tropical grasses of the Brachiaria genus and determining their role in improving plant growth. *African journal of biotechnology*, 10(6), 965-976. DOI: 10.5897/AJB10.1305

Khalaj, M. A., Suresh Kumar, P., & Roosta, H. R. (2019). Evaluation of nutrient uptake and flowering of Gerbera in response of various growing media. *World J. Environ. Biosci*, 8, 12-18.

Kimura, H., Hashimoto-Sugimoto, M., Iba, K., Terashima, I; Yamori, W. (2020). Improved stomatal opening enhances photosynthetic rate and biomass production in fluctuating light. *Journal of Experimental Botany*, 71(7), 2339-2350. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa090>

Krause, G. H., & Weis, E. (1984). Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. *Photosynthesis research*, 5(2), 139-157.

Kumar, R., Kumar, R., & Prakash, O. (2019). Chapter-5 The Impact of Chemical Fertilizers on Our Environment and Ecosystem. *Chief Editor*, 35, 69.

Laslo, É; Mara, G. (2019). Is PGPR an Alternative for NPK Fertilizers in Sustainable Agriculture?. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment* (pp. 51-62). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-8391-5\_3

Latef, A. A. H., Abu Alhmad, M. F., Kordrostami, M., Abo-Baker, A. B. A. E., & Zakir, A. (2020). Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(3), 1293-1306. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10065-9>

Leal Filho, W., Tripathi, S. K., Andrade Guerra, J. B. S. O. D., Giné-Garriga, R., Orlovic Lovren, V., & Willats, J. (2019). Using the sustainable development goals towards a better understanding of sustainability challenges. *International Journal of Sustainable Development & World Ecology*, 26(2), 179-190. <https://doi.org/10.1080/13504509.2018.1505674>

Lim, S. L., Flütsch, S., Liu, J., Distefano, L., Santelia, D., & Lim, B. L. (2022). Arabidopsis guard cell chloroplasts import cytosolic ATP for starch turnover and stomatal opening. *Nature communications*, 13(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28263-2>

Liu, C. Y., Zhang, F., Zhang, D. J., Srivastava, A. K., Wu, Q. S., & Zou, Y. N. (2018). Mycorrhiza stimulates root-hair growth and IAA synthesis and transport in trifoliolate orange under drought stress. *Scientific reports*, 8(1), 1-9. DOI:10.1038/s41598-018-20456-4

- Lopes, M. D. S., Dias Filho, M. B., Castro, T. D. R., de Filippi, M. C. C., & da Silva, G. B. (2018). Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth improvement and physiological responses in *Brachiaria brizantha*. *Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1086429>
- Lopes, M. J. D. S., Dias-Filho, M. B., & Gurgel, E. S. C. (2021b). Successful plant growth-promoting microbes: Inoculation methods and abiotic factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 48. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>
- Lopes, M. J. D. S., Dias-Filho, M. B., Castro, T. H. D. R., Silva, E. F. D., Rego, M. C. F., & Silva, G. B. D. (2020). Impacts of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Tropical Forage Grass in Brazil. *Journal of Agricultural Studies*, 8(1), 342-356. doi:10.5296/jas.v8i1.16077
- Lopes, M. J. S., Santiago, B. S., da Silva, I. N. B., & Gurgel, E. S. C. (2021a). Biotecnologia microbiana: inoculação, mecanismos de ação e benefícios às plantas. *Research, Society and Development*, 10(12), e356101220585-e356101220585. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20585>
- Maxwell, K; Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345), 659-668.
- Mitran, T., Meena, R. S., Lal, R., Layek, J., Kumar, S., & Datta, R. (2018). Role of soil phosphorus on legume production. In *Legumes for soil health and sustainable management* (pp. 487-510). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-0253-4\_15
- Mitter, E. K., Tosi, M., Obregón, D., Dunfield, K. E., & Germida, J. J. (2021). Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: innovative biofertilizer technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 29. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606815>
- Mojumdar, A., Behera, H. T., Das, S., & Ray, L. (2022). Microbe-based plant biostimulants and their formulations for growth promotion and stress tolerance in plants. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 213-230). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85163-3.00004-1>
- Naher, U. A., Panhwar, Q. A., Othman, R., Ismail, M. R., & Berahim, Z. (2016). Biofertilizer as a supplement of chemical fertilizer for yield maximization of rice. *Journal of Agriculture Food and Development*, 2(0), 16-22.
- Nascente, A. S., de Filippi, M. C. C., Lanna, A. C., de Sousa, T. P., de Souza, A. C. A., da Silva Lobo, V. L; da Silva, G. B. (2017). Effects of beneficial microorganisms on lowland rice development. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(32), 25233-25242. DOI 10.1007/s11356-017-0212-y
- Oljira, A. M., Hussain, T., Waghmode, T. R., Zhao, H., Sun, H., Liu, X., ... & Liu, B. (2020). *Trichoderma* enhances net photosynthesis, water use efficiency, and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *Microorganisms*, 8(10), 1565. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101565>
- Pan, Y. G., Lin, W. C., Lo, C. T., Chang, S. C., Yu, B., & Lee, T. T. (2018). Effects of substitution of Bermuda grass hay with *Trichoderma* fermented rice straw on growth, blood, and rumen fluid parameters in Barbados sheep. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 1162-1168. DOI: 10.1080/09712119.2018.1480487
- Passari, A. K., Upadhyaya, K., Singh, G., Abdel-Azeem, A. M., Thankappan, S., Uthandi, S; Singh, B.

P. (2019). Enhancement of disease resistance, growth potential, and photosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by inoculation with an endophytic actinobacterium, *Streptomyces thermocarboxydus* strain BPSAC147. *PLoS one*, 14(7), e0219014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219014>

Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I; Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, 169(5-6), 325-336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>

Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 975(3), 384-394.

Ramazan, S., Bhat, H. A., Zargar, M. A., Ahmad, P., & John, R. (2021). Combined gas exchange characteristics, chlorophyll fluorescence and response curves as selection traits for temperature tolerance in maize genotypes. *Photosynthesis research*, 150(1), 213-225. <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00829-z>

Rana, K. L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., & Yadav, A. N. (2021). Bioprospecting of endophytic bacteria from the Indian Himalayas and their role in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(3), 4-0. DOI: 10.7324/JABB.2021.9306

Robbins, N. S., & Pharr, D. M. (1988). Effect of restricted root growth on carbohydrate metabolism and whole plant growth of *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology*, 87(2), 409-413.

Robinson, N. L., Hewitt, J. D., & Bennett, A. B. (1988). Sink metabolism in tomato fruit: I. Developmental changes in carbohydrate metabolizing enzymes. *Plant Physiology*, 87(3), 727-730.

Ruban, A. V; Wilson, S. (2021). The mechanism of non-photochemical quenching in plants: localization and driving forces. *Plant and Cell Physiology*, 62(7), 1063-1072. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa155>

Samaniego-Gómez, B. Y., Garruña, R., Tun-Suárez, J. M., Kantun-Can, J., Reyes-Ramírez, A., & Cervantes-Díaz, L. (2016). *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chilean journal of agricultural research*, 76(4), 409-416. doi:10.4067/S0718-58392016000400003

Santos, C. M., Verissimo, V., de Lins Wanderley Filho, H. C., Ferreira, V. M., da Silva Cavalcante, P. G., Rolim, E. V., & Endres, L. (2013). Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subject to water stress. *Industrial Crops and Products*, 41, 203-213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.003>

Santos, M. E. R; Fonseca, D. D. (2016). Adubação de pastagens em sistemas de produção animal. Viçosa, MG: Editora UFV.

- Scudeletti, D., Crusciol, C. A. C., Bossolani, J. W., Moretti, L. G., Momesso, L., Servaz Tubana, B., ... & Hungria, M. (2021). *Trichoderma asperellum* inoculation as a tool for attenuating drought stress in sugarcane. *Frontiers in plant science*, 12, 570. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.645542>
- Shaaban, L. D., Khalil, K. E., & El-Tantawy, R. E. (2015). Integration Effect Between Biofertilizers and Natural Fertilizers on Growth, Npk Uptake and Yield Parameters of Wheat Plant Grown in Alkaline Soil. *J. Bot*, 55(2), 269-279. DOI: 10.21608/EJBO.2015.217
- Silva, S. B; Silva, S. I. A. N. Conceitos e etapas da análise de solo. *Ensino Técnico e Extensão Universitária*, 49.
- Silvestre, W. V. D., Silva, P. A., Palheta, L. F., de Oliveira Neto, C. F., de Melo Souza, R. O. R., Festucci-Buselli, R. A., & Pinheiro, H. A. (2017). Differential tolerance to water deficit in two açai (*Euterpe oleracea* Mart.) plant materials. *Acta physiologiae plantarum*, 39(1), 1-10. DOI 10.1007/s11738-016-2301-9
- Soltani, A., Sinclair, T. R. (2012). Identifying plant traits to increase chickpea yield in water-limited environments. *Field Crops Research*, 133, 186-196. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.04.006>
- Sousa, T. P., Chaibub, A. A., da Silva, G. B., & de Filippi, M. C. C. (2020). *Trichoderma asperellum* modulates defense genes and potentiates gas exchanges in upland rice plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 112, 101561. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101561>
- Souza Linhares, A. J., Goncalves, W. G., Cabral, S. M., de Brito, M. F., Brandstetter, E. V., Silva, J. F. G; da Costa Severiano, E. (2020). Soil compaction affects the silage quality of sunflower and Paiaguas palisadeg'ass (*Brachiaria bri'antha*) grown on a Latosol in the Brazil Pantanavanna. *Australian Journal of Crop Science*, 14(7), 1121-1130. doi: 10.21475/ajcs.20.14.07.p2294
- Stephen, J., Shabanamol, S., Rishad, K. S., & Jisha, M. S. (2015). Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp.(MTCC 8368) and *Burkholderia* sp.(MTCC 8369) under greenhouse conditions. *3 Biotech*, 5(5), 831-837. DOI 10.1007/s13205-015-0286-5
- Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R., & Heldt, H. W. (1989). [32] Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. In *Methods in enzymology* (Vol. 174, pp. 518-552). Academic Press.
- Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo. *Fisiologia vegetal*. Universitat Jaume I, 2006.
- Talaat, N. B. (2019). Effective microorganisms: An innovative tool for inducing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) salt-tolerance by regulating photosynthetic rate and endogenous phytohormones production. *Scientia Horticulturae*, 250, 254-265. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.052>
- Trethewey, R. N., Geigenberger, P., Riedel, K., Hajirezaei, M. R., Sonnewald, U., Stitt, M., ... & Willmitzer, L. (1998). Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *The Plant Journal*, 15(1), 109-118.

Vitale, L., Vitale, E., Guercia, G., Turano, M., & Arena, C. (2020). Effects of different light quality and biofertilizers on structural and physiological traits of spinach plants. *Photosynthetica*, 58(4), 932-943. DOI: 10.32615/ps.2020.039

Wang, J., Li, R., Zhang, H., Wei, G., & Li, Z. (2020). Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. *BMC microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-1708-z>

Wen, B., Xiao, W., Mu, Q., Li, D., Chen, X., Wu, H., ... & Peng, F. (2020). How does nitrate regulate plant senescence?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 157, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.041>

Win, K. T., Oo, A. Z., Ohkama-Ohtsu, N; Yokoyama, T. (2018). *Bacillus pumilus* strain TUAT-1 and nitrogen application in nursery phase promote growth of rice plants under field conditions. *Agronomy*, 8(10), 216. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100216>

Yin, Z., Shi, F., Jiang, H., Roberts, D. P., Chen, S; Fan, B. (2015). Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian journal of microbiology*, 61(12), 913-923. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0358>

Zhang, L., Hoshika, Y., Carrari, E., Cotrozzi, L., Pellegrini, E., & Paoletti, E. (2018). Effects of nitrogen and phosphorus imbalance on photosynthetic traits of poplar Oxford clone under ozone pollution. *Journal of plant research*, 131(6), 915-924. *Journal of Plant*. <https://doi.org/10.1007/s10265-018-1071-4>