



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

REBYSON BISSACO GUIDINELLE

**BIOINSUMOS NA CULTURA DO MILHO: INTERAÇÕES COM MANEJO DO
SOLO E ÁGUA**

Alegre – ES

2023

REBYSON BISSACO GUIDINELLE

**BIOINSUMOS NA CULTURA DO MILHO: INTERAÇÕES COM MANEJO DO
SOLO E ÁGUA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Agronomia, na linha de Pesquisa Solo e Água e Interação com Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Diego Lang Burak.

Coorientador: Prof. Dr. Otacílio José Passos Rangel.

Alegre – ES

2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

G947b Guidinelle, Rebyson Bissaco, 1995-
Bioinsumos na cultura do milho: Interações com manejo do
solo e água / Rebyson Bissaco Guidinelle. - 2023.
115 f.

Orientador: Diego Lang Burak.
Coorientador: Otacílio José Passos Rangel.
Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Inoculantes microbianos. 2. Água Residuária de
Suinocultura. 3. Sistema Plantio Direto. 4. Milho Crioulo. 5.
Nutrição Mineral. 6. Fisiologia de Planta. I. Burak, Diego Lang.
II. Rangel, Otacílio José Passos. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV.
Título.

CDU: 63

REBYSON BISSACO GUIDINELLE

**BIOINSUMOS NA CULTURA DO MILHO: INTERAÇÕES COM MANEJO DO
SOLO E ÁGUA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Agronomia, na linha de pesquisa Solo e Água e Interação com Plantas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **SAVIO DA SILVA BERILLI**
Data: 30/11/2023 16:01:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sávio da Silva Berilli
IFES – Campus de Alegre

Documento assinado digitalmente
 **CINTIA DOS SANTOS BENTO**
Data: 01/12/2023 11:50:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Cíntia dos Santos Bento
CCAUE/UFES

Documento assinado digitalmente
 **JOSE FRANCISCO TEIXEIRA DO AMARAL**
Data: 05/12/2023 09:17:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Francisco Teixeira do Amaral
CCAUE/UFES

Documento assinado digitalmente
 **RENATO RIBEIRO PASSOS**
Data: 05/12/2023 14:49:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Renato Ribeiro Passos
CCAUE/UFES

Documento assinado digitalmente
 **DIEGO LANG BURAK**
Data: 05/12/2023 18:00:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Diego Lang Burak
CCAUE/UFES - Orientador

DEDICO

A Deus,

À minha esposa, Nathalia, que é minha Amiga, Confidente e Parceira.

Aos meus pais, Vanete e Reginaldo, e à minha irmã, Antoniele.

Aos meus sogros, Suely e Credigar.

A todos aqueles que me auxiliaram e me acompanharam nesta longa jornada.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

(Filipenses 4:13)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar, me guiar e me manter perseverante até aqui, por ter feito com que, mesmo nos momentos difíceis, eu não desistisse e permanecesse firme nesse propósito.

À minha Esposa, Nathália, por ter embarcado comigo nessa jornada, me auxiliando, incentivando e não permitindo que eu desistisse nos diversos momentos em que pensei que isso não seria possível. Juntos, somos mais fortes e alcançaremos coisas incríveis.

Aos meus Pais, Vanete e Reginaldo, e à minha irmã, Antoniele, que sempre me incentivaram e me disseram para persistir, que em momento algum me deixaram desistir e sempre me fizeram olhar adiante e seguir em frente.

Aos meus sogros, Suely e Credigar, que me acolheram como um filho, oferecendo suporte e ajuda em tudo o que precisei durante esta jornada, e estando presentes nesta conquista.

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realizar o Doutorado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Ifes – Campus de Alegre, pela disponibilidade de equipamentos e da área experimental a campo onde o experimento foi implantado.

Agradecimento especial ao Professor Orientador Dr. Diego Lang Burak pelo conhecimento transmitido e pelo constante cuidado com o andamento desta Tese. Sempre me orientou a buscar o desenvolvimento de um trabalho fundamentado em saberes e pesquisas científicas aplicadas, incentivando minha evolução diária pessoal e profissional. Também expressei minha gratidão ao Professor coorientador Dr. Otacílio José Passos Rangel, que desempenhou um papel fundamental na elaboração deste trabalho e não poupou esforços para auxiliar sempre que necessário.

Aos professores da Banca Examinadora, Prof^a. Dra. Cíntia dos Santos Bento, Prof. Dr. Renato Ribeiro Passos, Prof. Dr. José Francisco Teixeira do Amaral e Prof. Dr. Sávio da Silva Berilli, que dedicaram seu tempo para contribuir com a melhoria deste trabalho.

À Letícia Oliveira da Rocha e professor Fabio Lopes Olivares pela disponibilização das estirpes de bactérias diazotróficas utilizadas nesse trabalho, oriundas da coleção da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

A todos os professores que fizeram parte da minha carreira acadêmica, em especial, os professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia da UFES-Campus de Alegre. Agradeço por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses anos, que foi muito além da sala de aula e que levarei para a vida toda.

Agradeço a todos os amigos e colegas que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada, compartilhando lutas diárias, dias e noites de estudo em prol de um objetivo em comum. Aos que auxiliaram na condução dos experimentos e análises laboratoriais abdicando de momentos de descanso e lazer para prestar auxílio sempre que solicitados, com total zelo, envolvimento e respeito pelo experimento. Foram quatro anos de lutas, impossível citar todos, mas com carinho especial gostaria de destacar: Alex, Amanda, Bruno, Danilo, Felipe, Filipe, Janesca, João Frizzera, Kargean, Keyla, Marcus, Paula, Ronaldo, Tayna e Yago.

A todos, o meu muito obrigado!

BIOGRAFIA

Rebyson Bissaco Guidinelle, filho de Reginaldo Guidinelle e Vaneti Aparecida Bissaco Guidinelle, nasceu em 12 de dezembro de 1995, na cidade de Conceição do Castelo, no Estado do Espírito Santo. Sua trajetória educacional começou na U.M.E.F. José Feriani, onde cursou do pré-escolar até o 4º ano. Em seguida, frequentou a U.M.E.F. Santo Antonio do Areião, em Conceição do Castelo, ES, do 5º até o 8º ano. Concluindo o ensino médio na E.E.E.F.M. Profª Aldy Soares Merçon Vargas, também em Conceição do Castelo, ES. Em 2014, ingressou no curso de Tecnologia em Cafeicultura no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus de Alegre, graduando-se em dezembro de 2016. No ano de 2017, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroecologia no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus de Alegre, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2019. Paralelamente, em 2017, deu início ao curso de Agronomia no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), completando sua segunda graduação em 2023. Em 2019, deu continuidade à sua formação acadêmica ao ingressar no Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), concluindo sua Tese em setembro de 2023.

RESUMO GERAL

Guidinelle, Rebyson Bissaco, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, setembro de 2023. **BIOINSUMOS NA CULTURA DO MILHO: INTERAÇÕES COM MANEJO DO SOLO E ÁGUA.** Orientador: Prof. Dr. Sc. Diego Lang Burak. Coorientador: Prof. Dr. Sc. Otacílio José Passos Rangel.

Diante do crescimento populacional e da crescente demanda por alimentos, juntamente com as restrições dos recursos naturais essenciais à produção agrícola, especialmente o solo e a água, torna-se crucial a investigação de tecnologias que possibilitem maior produtividade, sem exaurir os recursos naturais, com uma abordagem conservacionista. Isso implica na redução da dependência de insumos químicos externos ao ecossistema agrícola produtivo. Bioinsumos microbianos representam tecnologias promissoras devido à sua capacidade de modular as respostas das plantas para superar estresses bióticos e abióticos. Além disso, eles demonstram ser responsivos em ambientes de base conservacionistas, como o sistema plantio direto. A utilização de resíduos na agricultura se apresenta como uma alternativa complementar a esse sistema produtivo, uma vez que permite a destinação adequada de um passivo ambiental, como, por exemplo, a água residuária de suinocultura, com grande potencial para ser utilizada como fertilizante. A grande virtude desse estudo é a geração de uma tecnologia que permita o uso conjunto de bioinsumos (microrganismos eficientes), água residuária de suinocultura e sistema plantio direto com vistas a tornar a agricultura menos dependente do uso das águas de abastecimento humano e industrial, bem como dos fertilizantes. Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar bioinsumos microbianos formulados com *Herbaspirillum seropedicae* (cepa HRC54) e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (CNPSO 2083) e Ab-V6 (CNPSO 2084), aplicados como inóculo único ou co-inoculado, e compreender sua ação na cultura do milho (milho crioulo, variedade Fortaleza) em diferentes condições edáficas. Essas condições foram representadas por diferentes sistemas de manejo do solo: sistema plantio direto e sistema plantio convencional, irrigados com diferentes lâminas de água residuária de suinocultura e água bruta. Para tal, foram conduzidos três experimentos, realizados nas condições de casa de vegetação e a campo, em diferentes configurações de tratamentos, que são apresentadas em três capítulos da tese. No capítulo 1, desenvolvido em casa de vegetação, na condição de co-inoculação (*H. seropedicae* + *A. brasilense*), os bioinsumos microbianos apresentaram efeito sinérgico sob solo com

maior qualidade biológica. No capítulo 2, desenvolvido em casa de vegetação, experimento avaliado sob restrição hídrica, notou-se que os bioinsumos tiveram uma contribuição mais significativa para os atributos fisiológicos nos tratamentos com histórico de sistema plantio convencional, ressaltando sua eficácia na mitigação de estresses abióticos. No capítulo 3, que foi realizado em condições de campo, investigou-se os efeitos da co-inoculação em diferentes sistemas de manejo, destacou-se que o sistema plantio direto, em conjunto com a irrigação com água residuária da suinocultura, criou um ambiente edáfico mais propício, proporcionando uma qualidade biológica mais favorável para o crescimento da população microbiana introduzida no sistema, o que, por sua vez, permitiu um maior desenvolvimento da cultura do milho.

Palavras Chaves: Inoculantes microbianos, Água Residuária de Suinocultura, Sistema Plantio Direto, Milho Crioulo, Nutrição Mineral, Fisiologia de Planta.

GENERAL ABSTRACT

Guidinelle, Rebyson Bissaco, Center for Agricultural Sciences and Engineering of the Federal University of Espírito Santo, September 2023. **BIOINPUTS IN MAIZE CULTURE: INTERACTIONS WITH SOIL AND WATER MANAGEMENT.** Advisor: Prof. Dr. Sc. Diego Lang Burak. Co-advisor: Prof. Dr. Sc. Otacílio José Passos Rangel.

Faced with population growth and the growing demand for food, together with restrictions on natural resources essential to agricultural production, especially soil and water, it is crucial to investigate technologies that enable greater productivity, without depleting natural resources, with a conservationist approach. This implies reducing dependence on chemical inputs external to the productive agricultural ecosystem. Microbial bioinputs represent promising technologies due to their ability to modulate plant responses to overcome biotic and abiotic stresses. Furthermore, they demonstrate to be responsive in conservation-based environments, such as the no-till system. The use of waste in agriculture presents itself as a complementary alternative to this production system, as it allows the appropriate disposal of an environmental liability, such as, for example, wastewater from pig farming, with great potential for being used as fertilizer. The great virtue of this study is the generation of a technology that allows the joint use of bioinputs (efficient microorganisms), wastewater from pig farming and direct planting systems with a view to making agriculture less dependent on the use of human and industrial water supplies, as well as as well as fertilizers. Therefore, the objective of this study was to evaluate microbial bioinputs formulated with *Herbaspirillum seropedicae* (strain HRC54) and *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (CNPSO 2083) and Ab-V6 (CNPSO 2084), applied as a single inoculum or co-inoculated, and to understand its action on maize cultivation (Creole maize, Fortaleza variety) in different soil conditions. These conditions were represented by different soil management systems: direct planting system and conventional planting system, irrigated with different levels of pig farming wastewater and raw water. To this end, three experiments were conducted, carried out in greenhouse and field conditions, in different treatment configurations, which are presented in three chapters of the thesis. In chapter 1, developed in a greenhouse, under co-inoculation conditions (*H. seropedicae* + *A. brasilense*), microbial bioinputs showed a synergistic effect on soil with higher biological quality. In chapter 2, carried out in a

greenhouse, an experiment evaluated under water restrictions, it was noted that bioinputs had a more significant contribution to physiological attributes in treatments with a history of conventional planting systems, highlighting their effectiveness in mitigating abiotic stresses. In chapter 3, which was carried out under field conditions, the effects of co-inoculation in different management systems were investigated. It was highlighted that the direct planting system, together with irrigation with wastewater from pig farming, created an environment more favorable soil conditions, providing a more favorable biological quality for the growth of the microbial population introduced into the system, which, in turn, allowed greater development of the maize crop.

Key-word: Microbial inoculants, Swine Wastewater, No-tillage Sistem, Creole maize, Mineral Nutrition, Plant Physiology.

LISTA DE SIGLAS

CHAPTER I

A - Net assimilation rate of CO₂.

A/Ci - Instantaneous carboxylation efficiency.

A/E - Instantaneous water use efficiency.

Ci - Internal CO₂ concentration.

C-soluble - Potassium sulfate-extracted carbono.

CT - Conventional tillage system.

DGS - Dehydrogenase.

E - Transpiration rate.

ETC - Actual evapotranspiration of the maize crop.

gs - Stomatal conductance.

HCT - Historical of conventional tillage system.

HNT - Historical of no-tillage system.

HRW - Historical of raw water.

HS - Humic Substances.

HSW - Historical of swine wastewater.

MBC - Microbial biomass carbono.

MBN - Microbial biomass nitrogen.

NT - No-tillage system.

PH - Plant height.

RDM - Root dry mass.

RW - Raw water.

SDM - Shoot dry mass.

SW - Swine wastewater.

T0 - Without microbial inoculant and 100% of the fertilization doses of NPK.

T1 - *Herbaspirillum seropedicae* + Humic Substances, with 40% of the fertilization doses of NPK.

T2 - *Azospirillum brasilense*, with 40% of the fertilization doses of NPK.

T3 - Co-inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* (T1 treatment) + *Azospirillum brasilense* (T2 treatment), with 40% of the fertilization doses of NPK.

TC - Total chlorophyll.

TOC - Total organic carbono.

β -G - β -glucosidase.

CAPÍTULO II

A - Taxa de assimilação líquida de CO₂.

A/Ci - Eficiência instantânea de carboxilação.

A/E - Eficiência instantânea no uso da água.

AB - Água Bruta.

ACP - Análise de compenente principais.

AP - Altura de planta.

ARS - Água residuária de suinocultura.

BPCV - Bactérias promotoras de crescimento vegetal.

CBM - Carbono da biomassa microbiana.

Ci - Concentração interna de CO₂.

COT - Carbono orgânico total do solo.

C-solúvel - carbono extraído com sulfato de potássio.

CT - Clorofila total.

DSN - Desidrogenase.

E - Taxa de transpiração.

gs - Condutância estomática

HAB - Histórico de água bruta.

HARS - Histórico de água residuária de suinocultura.

HSPC - Histórico de sistema plantio convencional.

HSPD - Histórico de sistema plantio direto.

MSPA - Massa seca de parte aérea.

MSR - Massa seca da raiz.

NBM - Nitrogênio da biomassa microbiana.

SH - Substâncias Húmicas.

SPC - sistema plantio convencional.

SPD - Sistema plantio direto.

T0 - Sem os bioinsumos e 100% da adubação NPK.

T1 - *Herbaspirillum seropedicae* + Substâncias Húmicas com 40% da adubação NPK.

T2 - *Azospirillum brasilense* com 40% da adubação NPK.

T3 - co-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* + Substâncias Húmicas com *Azospirillum brasilense* com 40% da adubação NPK.

β -B - β -glucosidase.

CAPÍTULO III

100%NPK - Sem aplicação de bioinsumos microbianos com 100% da adubação NPK.

A - Taxa de assimilação líquida de CO₂.

A/E - Eficiência instantânea no uso da água.

AB - Água Bruta

ACP - Análise de componente principais.

ANT-RB - Antocianina sob luz vermelha e luz azul.

ANT-RG - Antocianina sob luz vermelha e luz verde.

AP - Altura de planta.

ARS - Água residuária de suinocultura.

BPCV - Bactérias promotoras de crescimento vegetal.

CBM - Carbono da biomassa microbiana.

Co-inoculação - *Herbaspirillum seropedicae* + Substâncias Húmicas com *Azospirillum brasilense* com 70% da adubação NPK.

COT - Carbono orgânico total do solo.

C-solúvel - carbono extraído com sulfato de potássio.

DC – Diâmetro do colmo.

DSN - Desidrogenase.

E - Taxa de transpiração.

FLAV – Flavonoides.

gs - Condutância estomática

MSE - Massa seca d espiga.

MSP - Massa seca da planta.

NBI-G - Balanço de nitrogênio sob luz verde.

NBI-R - Balanço de nitrogênio sob luz vermelha.

NBM - Nitrogênio da biomassa microbiana.

SH - Substâncias Húmicas.

SPC - Sistema plantio convencional.

SPC+ co-inoculação - *Herbaspirillum seropedicae* + Substâncias Húmicas com *Azospirillum* com 70% da adubação NPK, conduzido sob SPC.

SPC+100%NPK - Sem a aplicação de bioinsumos com 100% da adubação NPK, conduzido sob SPC.

SPD - Sistema plantio direto.

β -B - β -glucosidase.

LISTA DE FIGURAS

CHAPTER I

Figure 1 - Morphoagronomic attributes according to the historical of soil management types (HNTS - historical with no-tillage system, HCPS - historical with conventional planting system) and water used in irrigation (HSW - historical with swine wastewater, HAB - historical with raw water)

Figure 2 - Leaf contents of nitrogen, phosphorus and potassium according to the historical of soil management types (HNTS - historical with no-tillage system, HCPS – historical with conventional planting system) and water used in irrigation (HSW - historical with swine wastewater, HAB - historical with raw water)

Figure 3 - Leaf contents of Calcium and Magnesium according to the historical of soil management types (HNTS - historical with no-tillage system, HCPS - historical with conventional planting system) and water used in irrigation (HSW - historical with swine wastewater, HAB - historical with raw water)

Figure 4 - Total Chlorophyll (CT), Instantaneous water use efficiency (A/E) and Stomatal conductance (Gs) according to the historical of soil management types (HNTS - historical with no-tillage system, HCPS - historical with conventional planting system) and water used in irrigation (HSW - historical with swine wastewater, HAB - historical with raw water)

Figure 5 - Graphical representation of the factor loadings of the variables (≥ 0.7) and representation of the sample scores (average of the repetitions of the treatments) for the factors with eigenvalues above 1

Figure 6 - Representation of the mean and standard error of the factor scores of each Factor (F1, F2, F3, F4, F5 and F6) and it is proportional explications of data variation, grouped only by treatments T1 – *Herbaspirillum seropedicae* + SH with 40% of the fertilization, T2 – *Azospirillum brasilense* with 40% of the fertilization and T3 - co-inoculation of *H. seropedicae* + SH with *A. brasilense* and 40% of the fertilization

CAPÍTULO II

Figura 1 - Influência dos bioinsumos, históricos de água de irrigação (HAB – histórico de irrigação com água bruta e HAB – histórico de irrigação com água residurária) e manejo do solo (HSPC – Histórico de sistema plantio convencional, HSPD - Histórico de sistema plantio direto) nos atributos de desenvolvimento vegetativo do milho crioulo

Figura 2 - Influência dos bioinsumos, históricos de água de irrigação (HAB – histórico de irrigação com água bruta e HAB – histórico de irrigação com água residurária) e manejo do solo (HSPC – Histórico de sistema plantio convencional, HSPD - Histórico de sistema plantio direto) nos teores foliares do milho crioulo

Figura 3 - Influência dos bioinsumos, históricos de água de irrigação (HAB – histórico de irrigação com água bruta e HAB – histórico de irrigação com água residurária) e manejo do solo (HSPC – Histórico de sistema plantio convencional, HSPD - Histórico de sistema plantio direto) na fisiologia do milho crioulo

Figura 4 - Representação da média e erro padrão dos escores dos fatores (PC1, PC2, PC3 e PC4), agrupados nos tratamentos, histórico do solo e histórico de irrigação

CAPÍTULO III

Figura 1 - Precipitação e temperaturas mínimas e máximas observadas durante a condução do experimento

Figura 2 - Atributos morfoagronômicos em função das aplicações dos bioinsumos e irrigação com água residuária de suinocultura comparado com as testemunhas

Figura 3 - Efeito das lâminas de irrigação com ARS, em diferentes aplicações de bioinsumos microbianos, nos atributos morfoagronômicos no cultivo de milho

Figura 4 – Teores foliares em função das aplicações dos bioinsumos e irrigação com água residuária de suinocultura comparado com as testemunhas

Figura 5 - Efeito das lâminas de irrigação com ARS, em diferentes aplicações de bioinsumos microbianos, nos teores foliares no cultivo de milho crioulo

Figura 6 – Trocas gasosas em função das aplicações dos bioinsumos e irrigação com água residuária de suinocultura comparado com as testemunhas

Figura 7 - Efeito das lâminas de irrigação com ARS, em diferentes aplicações de bioinsumos microbianos, nos atributos fisiológicos de trocas gasosas no cultivo de milho crioulo

Figura 8 – Índice SPAD, índices médios de flavonóides (FLAV), antocianina (ANT-RG e ANT-RB) e balanço de nitrogênio (NBI-G e NBI-R) de folhas de milho em função das aplicações dos bioinsumos e irrigação com água residuária de suinocultura comparado com as testemunhas

Figura 9 - Efeito das lâminas de irrigação com ARS, em diferentes aplicações de bioinsumos microbianos, no índice SPAD e balanço de nitrogênio no cultivo de milho crioulo

Figura 10 - Representação da média e erro padrão dos escores fatoriais de cada Fator (F1, F2, F3, F4 e F5) e suas explicações proporcionais da variação dos dados, agrupados nos tratamentos e testemunhas estudados

LISTA DE TABELAS

CHAPTER I

Table 1 - Chemical attributes of soil samples before the implementation of the study in a greenhouse under different management systems

Table 2 - Summary ANOVA (p-value) for the attributes of vegetative development, mineral nutrition and gas exchange evaluated according to the treatments

Table 3 - Factor loadings of the morpho-agronomic attributes, leaf contents, physiological attributes, eigenvalues and explained variance of the factors after the Varimax orthogonal method

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Atributos químicos das amostras de solos antes da implantação do estudo em casa de vegetação, em diferentes sistemas de manejo

Tabela 2 - Variância explicada, acumulada e autovalores da ACP e correlação⁽¹⁾ entre atributos morfoagronômicos, teores foliares, atributos fisiológicos e componentes principais

Tabela 3 - Resumo ANOVA (p-value) e valores referente a aplicação dos bioinsumos para os atributos fisiológicos

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Atributos biológicos do solo antes da implantação do estudo

Tabela 2 - Caracterização química da água residuária de suinocultura utilizada na irrigação da cultura do milho

Tabela 3 - Resumo ANOVA (p-value) e valores referente a aplicação dos bioinsumos para os atributos de desenvolvimento vegetativo e nutrição mineral

Tabela 4 - Resumo ANOVA (p-value) e valores referente a aplicação dos bioinsumos para os atributos fisiológicos

Tabela 5 - Cargas fatoriais ⁽¹⁾ dos atributos morfoagronômicos, teores foliares, atributos fisiológicos, autovalores e variância explicada dos fatores após o método ortogonal Varimax

INTRODUÇÃO GERAL	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CHAPTER 1 - IMPACT OF HISTORICAL SOIL MANAGEMENT ON THE INTERACTION OF PLANT-GROWTH-PROMOTING BACTERIA WITH MAIZE (ZEA MAYS L.)⁽¹⁾	25
1. INTRODUCTION	27
2. MATERIAL AND METHODS.....	29
2.1 - Management historical and soil characterization.....	29
2.2 - Experimental design.....	31
2.3 - Implementation and conduction of the experiment	31
2.4 - Morpho-agronomic attributes, leaf contents, and physiological parameters ..	32
2.5 - Statistical analysis	33
3. RESULTS.....	33
3.1 - Morphoagronomic attributes.....	34
3.2 - Leaf nutrient contents	36
3.3 - Photosynthetic parameters	38
3.4 - Multivariate Statistics	40
4. DISCUSSION.....	43
5. CONCLUSION	47
6. REFERENCES	48
CAPÍTULO 2 - CRESCIMENTO DE MILHO EM CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA: BIOINSUMOS BIOLÓGICOS E HISTÓRICOS DE MANEJO ⁽²⁾	55
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1 - Histórico de manejos e caracterização do solo	58
2.2 - Delineamento experimental	59
2.3 - Implantação, condução do experimento e restrição hídrica.....	60
2.4 - Atributos morfoagronômicos, teores foliares e parâmetros fisiológicos	61
2.5 - Análise estatística.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
3.1 - Atributos Morfoagronômicos, teores foliares e fisiologia	62
3.2 - Estatística Multivariada - Análise de Componentes Principais	68
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS.....	72

CAPÍTULO 3 - CO-INOCULAÇÃO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> COM <i>Azospirillum brasilense</i> EM MILHO IRRIGADO COM ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA SOB SISTEMA PLANTIO DIRETO.....	75
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1 - Histórico e caracterização da área experimental.....	79
2.2 - Delineamento experimental	80
2.3 - Preparo do solo e manejo de irrigação	80
2.4 - Implantação e condução do experimento.....	82
2.5 - Coleta e análise dos dados	83
2.6 - Análise estatística.....	84
3. RESULTADOS	85
3.1 - Atributos morfoagronômicos	87
3.2 - Teores foliares do milho	89
3.3 - Atributos Fisiológicos.....	92
3.4 - Estatística Multivariada - Análise de Fatores	96
3. DISCUSSÃO	99
4. CONCLUSÃO.....	103
5. REFERÊNCIAS	104

INTRODUÇÃO GERAL

A população mundial vem crescendo há uma taxa anual de 1,3% (UN, 2019), o que leva a um aumento considerável na demanda mundial por alimentos (FAO, 2017). Assim, é premente a adoção de medidas que assegurem uma produção satisfatória de alimentos, utilizando de maneira consciente e eficiente os bioinsumos e recursos, naturais, disponíveis para a agricultura, sobretudo, água e solo (Jat et al., 2019; Aznar-Sanchez et al., 2020; Kiliç, 2020), sem a expansão das fronteiras agrícolas, caracterizada pela remoção das vegetações nativas, queimadas e preparo excessivo do solo (Pedrosa et al., 2020). Nesse contexto, a busca por tecnologias que concilie produtividade e conservação se tornou um desafio para a pesquisa agropecuária mundial.

São diversas as tecnologias que vem sendo estudadas buscando-se suprir a carência de conhecimento e incrementar a produção agrícola: utilização de água residuária de suinocultura (ARS) (Cunha et al., 2021; Lima et al., 2023), sistema plantio direto (SPD) (Zhao et al., 2019; Jiang et al., 2019) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (Glick, 2012; Pathania et al., 2020; Basu et al., 2021). Ao longo dos anos, vem se mostrando tecnologias promissoras, se consolidando na comunidade acadêmica e científica.

A utilização da ARS é de grande importância, pois além do benefício proporcionado pela adição de nutrientes e matéria orgânica no sistema produtivo (Guidinelle et al., 2023), destina-se de maneira correta um passivo ambiental, que descartado de maneira incorreta pode gerar grandes desastres ambientais (Tian et al., 2022). No entanto, deve ser feita de maneira correta, respeitando as normas vigentes estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores (CONAMA, 2009), uma vez que esse tipo de material pode conter altas concentrações de metais pesados e outros compostos, e sua destinação incorreta na agricultura pode gerar danos igualmente aos que poderia ser gerado quando descartado incorretamente no meio ambiente.

A adoção de sistemas conservacionistas de manejo do solo, como o SPD, tem sido utilizado cada vez em maior escala, objetivando controlar a degradação do solo (Fuentes-Llanillo et al., 2021). Um SPD consolidado, apresenta camadas superficiais do solo com propriedades químicas, físicas e biológicas melhoradas, quando comparadas ao sistema plantio convencional (SPC) (Souza et al., 2019; Carlos et al., 2021). O manejo

conservacionista como o SPD não visa tão somente a alta produção, mas também assegurar a sustentabilidade do uso agrícola dos solos (Zhang et al., 2021).

O uso de bioinsumos biológicos na agricultura é uma tecnologia em expansão. Inúmeras são as possibilidades de utilização dessa biotecnologia, como as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e bioestimulantes como substâncias húmicas (SH), cada uma com seus benefícios, podendo agir de forma isolada e, ou, associadas, apresentando potencial de incorporar nutrientes no sistema solo-planta e promover crescimento vegetal (Canellas et al., 2015; Berruti et al., 2016), diminuindo a dependência externa por insumos, logo, o custo de produção do sistema produtivo será reduzido. As BPCV, por meio da inoculação de bactérias diazotróficas nas sementes, vêm apresentando excelentes resultados na agricultura, onde os autores citam inúmeros benefícios (Fadiji et al., 2022; Katsenios et al., 2022; Ajijah et al., 2023).

Logo, associar a utilização de BPCV com a utilização de ARS e o SPD pode ser viável e desejável, já que os mesmos apresentam características que podem se beneficiar mutuamente, potencializando a produção agrícola, visando à sustentabilidade do modelo de produção e, principalmente, diminuindo a dependência por insumos externos sintéticos. Assim, se faz importante o desenvolvimento de trabalhos em casa de vegetação e a campo a fim de avaliar o desempenho da associação dessas tecnologias. Os experimentos foram divididos para serem apresentados nesta tese no formato de capítulos:

- (1) Impact of historical soil management on the interaction of plant-growth-promoting bacteria with maize (*Zea Mays* L.)
- (2) Crescimento de milho em condições de restrição hídrica: Bionsumos biológicos e históricos de manejo
- (3) Co-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* com *Azospirillum brasilense* em milho irrigado com água residuária de suinocultura sob sistema plantio direto

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIJAH, N.; FIODOR, A.; PANDEY, A. K.; RANA, A.; PRANAW, K. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: A multifaceted agent for sustainable agriculture. **Diversity**, v. 15, n. 1, p. 112, 2023.

AZNAR-SANCHEZ, J. A.; PIQUER-RODRÍGUEZ, M.; VELASCO-MUÑOZ, J. F.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Worldwide research trends on sustainable land use in agriculture. **Land use policy**, v. 87, p. 104069, 2019.

BASU, A.; PRASAD, P.; DAS, S. N.; KALAM, S.; SAYYED, R. Z.; REDDY, M. S.; EL ENSHASY, H. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1140, 2021.

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BALESTRINI, R.; BIANCIOTTO, V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1559, 2016.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p.15-27, 2015.

CARLOS, F. S.; SCHAFFER, N.; MARCOLIN, E.; FERNANDES, R. S.; MARIOT, R.; MAZZURANA, M.; ROESCH, L. F. W.; LEVANDOSKI, B.; DE OLIVEIRA CAMARGO, F. A. A long-term no-tillage system can increase enzymatic activity and maintain bacterial richness in paddy fields. **Land Degradation & Development**, v. 32, n. 6, p. 2257-2268, 2021.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade de solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&force=1&legislacao=115509>>. Acesso em: 24 ago. 2023.

CUNHA, E. G. D.; GUIDINELLE, R. B.; RANGEL, O. J. P.; PASSOS, R. R. Biochar and swine wastewater: Effects on soil fertility of different textures and maize nutrition. **Revista Ceres**, v. 68, p. 586-596, 2021.

FADIJI, A. E.; SANTOYO, G.; YADAV, A. N.; BABALOLA, O. O. Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 962427, 2022.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The Future of Food and Agriculture: Trends and Challenges**. 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>. Acesso em: 4 de maio de 2023.

FUENTES-LLANILLO, R.; TELLES, T. S.; JUNIOR, D. S.; DE MELO, T. R.; FRIEDRICH, T.; KASSAM, A. Expansion of no-tillage practice in conservation agriculture in Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 208, p. 104877, 2021.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GUIDINELLE, R. B.; RANGEL, O. J. P.; PASSOS, R. R.; BAPTESTINI, J. C. M.; SOUZA, A. O. Chemical properties of Oxisol cultivated with maize in management systems of soil irrigated with swine production wastewater. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20201940, 2023.

JAT, S. L.; PARIHAR, C. M.; SINGH, A. K.; KUMAR, B.; CHOUDHARY, M.; NAYAK, H. S.; MEENA, B. R. Energy auditing and carbon footprint under long-term conservation agriculture-based intensive maize systems with diverse inorganic nitrogen management options. **Science of the Total Environment**, v. 664, p. 659-668, 2019.

JIANG, S.; WANG, Q.; ZHONG, G.; TONG, Z.; WANG, X.; XU, J. Brief review of minimum or no-till seeders in china. **AgriEngineering**, v. 3, n. 3, p. 605-621, 2021.

KATSENIOS, N.; ANDREOU, V.; SPARANGIS, P.; DJORDJEVIC, N.; GIANNOGLOU, M.; CHANIOTI, S.; EFTHIMIADOU, A. Assessment of plant growth promoting bacteria strains on growth, yield and quality of sweet maize. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11598, 2022.

KILIÇ, Z. The importance of water and conscious use of water. **International Journal of Hydrology**, v. 4, n. 5, p. 239-241, 2020.

LIMA, C. J. G. D. S.; PEREIRA, L. D. S.; SANTOS, T. O. D. S.; PINTO, S. N.; RODRIGUES, A. C.; NUNES, L. A. P. L. Soil changes and yield of maize fertilized with swine wastewater. **Revista Caatinga**, v. 32, p. 167-178, 2019.

PATHANIA, P.; RAJTA, A.; SINGH, P. C.; BHATIA, R. Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 30, 101842, 2020.

PEDROSA, F. O.; OLIVEIRA, A. L. M.; GUIMARÃES, V. F.; ETTO, R. M.; SOUZA, E. M.; FURMAM, F. G.; GALVÃO, C. W. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 45-56, 2020.

SOUZA, E. D. D.; SILVA, C. R. M. D.; PINTO, F. A.; CARNEIRO, M. A. C.; PAULINO, H. B.; PACHECO, L. P.; LAROCA, J. V. D. S. Soil quality indicators after conversion of “murundu” fields into no-tillage cropping in the Brazilian Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.

TIAN, L.; SUN, H.; DONG, X.; WANG, J.; HUANG, Y.; SUN, S. Effects of swine wastewater irrigation on soil properties and accumulation of heavy metals and antibiotics. **Journal of Soils and Sediments**, p. 1-16, 2022.

UN - United Nations. **Department of Economic and Social Affairs**, Population Division (2019). World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423). 2019.

ZHANG, X.; XIN, X.; YANG, W.; DING, S.; REN, G.; LI, M.; ZHU, A. Soil respiration and net carbon flux response to long-term reduced/no-tillage with and without residues in a wheat-maize cropping system. **Soil and Tillage Research**, v. 214, p. 105182, 2021.

ZHAO, C.; CHAI, Q.; CAO, W.; WHALEN, J. K.; ZHAO, L.; CAI, L. No-tillage reduces competition and enhances compensatory growth of maize (*Zea mays* L.) intercropped with pea (*Pisum sativum* L.). **Field Crops Research**, v. 243, p. 107611, 2019.

CHAPTER 1 - IMPACT OF HISTORICAL SOIL MANAGEMENT ON THE INTERACTION OF PLANT-GROWTH-PROMOTING BACTERIA WITH MAIZE (*ZEA MAYS* L.)⁽¹⁾

ABSTRACT

The use of microbial inoculants in agroecosystems is a promising technology. However, edaphic factors can modulate plant responsiveness and crop production to bioinoculants, which diverse soil management practices can ultimately influence. In this study, we hypothesized that the long-term adoption of soil conservation techniques could enhance crop performance inoculated with plant growth-promoting bacteria (PGPB). Consequently, the primary objective was to assess the effectiveness of microbial inoculants formulated with *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) and *Azospirillum brasilense* (Ab) on maize growth in soils subjected to varying historical conservation management system. We evaluated two soil management systems, two irrigation conditions and three bioinoculant treatments: T0 - without bioinoculant and 100% doses of NPK fertilization; T1 - Hs + humic substances-HS and 40% of NPK fertilization; T2 - Ab and 40% of NPK fertilization; T3 - co-inoculation (Hs + Ab and 40% of NPK fertilization). Using a reduced fertilization dose (40% NPK) associated with microbial inoculants proved efficient in increasing the maize shoot dry mass (SDM): on average, there was a 16 % reduction compared to the treatment with 100% fertilization. In co-inoculation (Hs + Ab), the microbial inoculants showed a synergistic effect on plant response, higher than isolate ones. Under lower nutrient availability and more biological soil quality, the microbial bioinputs positively influenced root development, instantaneous water use efficiency, stomatal conductance and N contents.

Keyword: microbial inoculants, swine manure, no-till system, maize nutrition.

⁽¹⁾ Submitted article in Heliyon Journal in July 2023
<http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4513141>

RESUMO

O uso de inoculantes microbianos em agroecossistemas é uma tecnologia promissora. No entanto, os fatores edáficos podem modular a capacidade de resposta das plantas e a produção agrícola aos bioinoculantes, o que, em última análise, pode influenciar diversas práticas de gestão do solo. Neste estudo, levantamos a hipótese de que a adoção a longo prazo de técnicas de conservação do solo poderia melhorar o desempenho das culturas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB). Consequentemente, o objetivo principal foi avaliar a eficácia de inoculantes microbianos formulados com *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) e *Azospirillum brasilense* (Ab) no crescimento do milho em solos submetidos a diferentes históricos de manejo e conservação. Foram avaliados dois sistemas de manejo do solo, duas condições de irrigação e quatro níveis com bioinoculantes: T0 - sem bioinoculante e doses de 100% de adubação NPK; T1 - Hs + substâncias húmicas-HS e 40% de adubação NPK; T2 - Ab e 40% de adubação NPK; T3 - coinoculação (Hs + Ab e 40% de adubação NPK). A utilização de dose reduzida de adubação (40% NPK) associada a inoculantes microbianos mostrou-se eficiente no aumento da massa seca da parte aérea do milho (MSP): em média, houve redução de 16% em relação ao tratamento com 100% de adubação. Na coinoculação (Hs + Ab), os inoculantes microbianos apresentaram efeito sinérgico na resposta das plantas, superior aos isolados. Sob menor disponibilidade de nutrientes e maior qualidade biológica do solo, os bioinsumos microbianos influenciaram positivamente o desenvolvimento radicular, a eficiência instantânea do uso da água, a condutância estomática e os teores de N.

Palavras-chave: inoculantes microbianos, dejetos de suínos, sistema plantio direto, nutrição de milho.

1. INTRODUCTION

Biological processes inserted in the productive process of agrosystems present significant potential for increasing the use efficiency of resources, reducing costs, and generating ecologically friendly products. The microbiota in the soil, rhizosphere, rhizoplane, and hosted in plants is a functional, active component that develops natural processes widely known and explored in biotechnological products. It actively contributes to plant development by harnessing its inherent bio-fertilization, bio-stimulation, and bio-control capabilities, utilizing natural biological mechanisms (Bashan et al., 2014; Olivares et al., 2017).

Using biological products derived from beneficial microorganisms and metabolic, their product has gained significant attention in agroecosystems, necessitating regulatory oversight as defined by Brazilian legislation, which classifies them as bioinputs (Brasil, 2020). Within this category, inoculants based on plant growth-promoting bacteria (PGPB) have emerged as prominent contributors to enhanced plant production (Davison, 1988; Kloepper et al., 1989).

Scientific investigations on bioinputs provide substantiated evidence that aligns with the anticipated economic gains of sustainable agricultural practices (Rouphael and Colla, 2020). However, the efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in soil applications encounters uncertainties owing to the complex interplay of various environmental factors that can influence their efficiency.

In order to enhance agricultural decision-making processes, further research endeavors should be dedicated to comprehending the intricate responses of microorganisms within the soil-plant system (Hartman et al., 2018). Generally, the PGPR efficiency varies with soil fertility, salt stress, temperatures, hydric stress, diseases, and abiotic factors (Bashan et al., 2014; Malusá and Vassilev, 2014; Bittencourt et al., 2023).

Currently, persistent scientific investigations are imperative to address existing knowledge gaps on the efficacy of bio-inputs across diverse crop types, varieties, soil management techniques, edaphoclimatic conditions, as well as the intricate relationship between soil quality and the responses of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) within the soil-plant ecosystem.

PGPBs are widely found in various soils, especially the rhizosphere (Glick, 2012). Their benefits are distinct, varying between species and strains of bacteria, with different mechanisms related to their effects on plant growth and development (Souza et al., 2015).

Several bacteria species have been evaluated as microbial products to boost plant growth and protection. Among them, *Herbaspirillum seropedicae* has been increasingly tested as a bioproduct, and *Azospirillum brasilense* formulation product has been placed as a best-seller inoculant bio-stimulation and bio-fortification effects in the crops (Hungria et al., 2010; Kour et al., 2019; Matteoli et al., 2020; Santos et al., 2021; Irineu et al., 2022). *Azospirillum* is a facultative endophytic diazotrophic bacterium that colonizes the rhizosphere and roots (Raffi and Charyulu, 2021). *Herbaspirillum* seems to be an obligate endophyte, which has been isolated predominantly from the roots, stems, and leaves of Gramineae and have low survival in the soil system (Roesh et al., 2006; Matteoli et al., 2020).

A. brasilense is widely used in Brazilian agriculture, especially maize crops (Santos et al., 2021). The described mechanisms of action are linked to the modulation of phytohormones (Cassán et al. 2013), increased nutrient and water uptake (Ardakani et al., 2011), the release of organic acids, which can solubilize calcium phosphates (Rodriguez et al., 2004), and stimulation of plant resistance to abiotic stresses (Fukami et al., 2018; Freitas et al., 2020). Similar underlined mechanisms were observed for *H. seropedicae* inoculated plants. Alves et al. (2021) concluded that maize plants inoculated with *H. seropedicae* showed higher vegetative development under low N availability in the soil.

These effects are related to biological nitrogen fixation (BNF) (Brusamarello-Santos et al., 2017), modulation of enzymes in response to different types of stress (Nunes et al., 2021; Irineu et al., 2022), and/or bioprotection and mitigation of water stress (Curá et al., 2017; Da Fonseca et al., 2019; Azevedo et al., 2019; Da Piedade et al., 2017) promoted by *Herbaspirillum seropedicae*.

The synergism and coexistence of bacteria in a microbiome depend on several factors, such as infection niches, endophytic competence, species functionality, and microorganism-soil-plant interactions (Zhang et al., 2021). Evaluating the potential for co-inoculation between *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*, Ávila et al. (2023) verified the strain's ability to increase production in organic maize culture compared to the control. Dartora et al. (2016) concluded that co-inoculation can promote foliar P increment in maize plants, vegetative development, and increased crop productivity. To increase the efficiency of PGPBs, microbial consortia are being studied to verify bacterial strains' compatibility to enhance their co-inoculation benefits (Lindemann et al., 2016). However, inconsistent results are reported (Zeffa et al., 2020),

and such synergism may not be successful, mainly when co-inoculation is performed in stressful environments (Yu et al., 2012).

A comprehensive understanding of the intricate interrelationships between soil, plants, and microorganisms is essential under varying management conditions. Therefore, the objective of this study was to assess, within a controlled greenhouse setting, microbial inoculants formulated with *Herbaspirillum seropedicae* (strain HRC54) and *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (CNPSo 2083) and Ab-V6 (CNPSo 2084), applied as single inoculum or co-inoculated and understand its action on the initial growth of maize (creole maize, Fortaleza variety) in different edaphic conditions. These conditions represent a history of soil use and management characterized by irrigation with swine wastewater and raw water and the implementation of two tillage systems (conventional vs no-tillage). This study aims to gain insights into the complex interactions among soil, plants, and microorganisms and to elucidate effective soil management strategies that can enhance the performance of microbial inoculants, ultimately leading to improved productivity of creole maize (*Zea mays* L.).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 - Management historical and soil characterization

The soil was collected in an experimental permanent plot to evaluate the dynamics of organic matter and nutrients in the long term under the effect of two sustainable management models: no-tillage and the use of swine wastewater. The permanent plots were implemented in early 2017. Since then, five consecutive cycles of maize (*Zea mays* L.) were conducted in two soil management systems: a no-tillage system with five years of implementation (NT) and conventional tillage (CT); associated with the use of swine wastewater (SW) in the irrigation of the maize crop, compared with raw water (RW) (supplying 100% of the crop's water demand). In the NT, during the fallow period of the soil, was planted the velvet bean (*Stizolobium aterrimum*). In the CT, tillage with moldboard plow and disking was carried out before the maize crop cycle. Regarding accumulated water in SW, approximately 5,169.5 m³ ha⁻¹ was applied during the four maize crop cycles.

Part of the soil samples was stored in a cold chamber at approximately 4°C for the characterization of enzymatic attributes: β -glucosidase ($\mu\text{g p-nitrophenol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (β -G)

(Eivazi and Tabatabai, 1988), dehydrogenase ($\mu\text{g TPF g}^{-1}$ soil) (DGS) (Casida et al., 1964), microbial biomass nitrogen (MBN), microbial biomass carbon (MBC) (Brookes et al., 1982; Sparling and West, 1988; Islam and Weil, 2000). Non-cold samples were used for the determination of total organic carbon (TOC) and potassium sulfate-extracted carbon (C-soluble) (Yeomans and Bremner, 1988; Silveira et al., 2008) (Table 1). The chemical attributes (non-cold samples) assessed included pH in water, exchangeable Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Na^{+} ; available K and P; and H+Al, using the methods recommended by Teixeira et al. (2017) (Table 1). Total organic carbon (TOC) was evaluated by wet oxidation and dichromatometry with external heating (Mendonça and Matos, 2017) (Table 1). The soil's granulometry (Teixeira et al., 2017) used in this study comprised 640 g kg^{-1} of sand, 100 g kg^{-1} of silt, and 260 g kg^{-1} of clay, classifying it as a soil of medium texture.

Table 1 – Chemical attributes of soil samples before the implementation of the study in a greenhouse under different management systems

Management Attributes		HNT + HSW	HCT + HSW	HNT + HRW	HCT + HRW
pH		5.32	5.45	5.54	5.48
P	mg dm^{-3}	43.4	53.6	30.8	25.4
K ⁺	mg dm^{-3}	82.7	91.3	68.4	75.4
Na ⁺	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0.0	0.0	0.0	0.0
Al ³⁺	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0.2	0.0	0.0	0.0
Ca ²⁺	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	1.7	2.0	1.8	1.9
Mg ²⁺	$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0.4	0.5	0.4	0.4
EC	mS m^{-1}	134.2	154.2	120.4	128.8
TOC	g kg^{-1}	14.2	12.3	12.9	10.9
C-soluble	mg kg^{-1}	22.0	19.8	9.7	8.0
MBC	mg kg^{-1}	484.3	481.2	475.6	469.0
MBN	mg kg^{-1}	75.7	35.9	55.7	34.5
β -G		89.2	65.2	80.4	68.4
DGS		138.2	103.4	136.3	104.3

pH: Hydrogenionic Potential; P: Phosphorus available; K: Potassium available; Na: Exchangeable sodium; Al: Exchangeable aluminum; Ca: Exchangeable calcium; Mg: Exchangeable magnesium; EC: 838 Electrical conductivity. TOC: Total Organic Carbon; C-soluble: Carbon soluble; MBC: Microbial Biomass 839 Carbon; MBN: Microbial Biomass Nitrogen; β -G: β -Glucosidase Enzyme ($\mu\text{g p-nitrophenol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$); DGS: 840 Enzyme Dehydrogenase ($\mu\text{g TPF g}^{-1}$ soil).

2.2 - Experimental design

The experiment was conducted in a greenhouse located at latitude 20° 45' 01" South, longitude 41° 29' 18" West, with an altitude of 112 meters in the Southeast region of Brazil. The greenhouse experienced maximum and minimum air temperatures ranging from 35 to 25 °C (maximum) and 20 to 12 °C (minimum). The study followed a 2 x 2 x 4 factorial scheme with four replications.

The first factor investigated the historical effect of a no-tillage system (HNT) and conventional tillage system (HCT). The second factor assessed the historical effect of successive irrigations with swine wastewater (HSW) and raw water (HRW), equivalent to 100% of the actual evapotranspiration (ET_c) of the maize crop. The third factor comprised four treatments: T0: Without microbial inoculant and 100% of the fertilization doses of NPK. T1: *Herbaspirillum seropedicae* (strain HRC54) + Humic Substances as a vehicle for foliar spray (HS), with 40% of the fertilization doses of NPK. T2: *Azospirillum brasilense* (seed inoculation with Ab-V5=CNPSO 2083 and Ab-V6=CNPSO 2084), with 40% of the fertilization doses of NPK. T3: Co-inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* (T1 treatment) + *Azospirillum brasilense* (T2 treatment), with 40% of the fertilization doses of NPK. The doses of mineral fertilizers (N, P₂O₅, and K₂O - NPK) were based on the recommendations of Novais et al. (1991).

2.3 - Implementation and conduction of the experiment

We used disinfected pots of 5 dm³ (Morais et al., 2015), and the Fortaleza creole variety maize seeds came from small regional producers. Before planting, the seeds were also disinfested (Hungria et al., 2010).

Fertilization followed the recommendations of Novais et al. (1991) for studies in a controlled environment, which included 100 mg dm⁻³ of N, 300 mg dm⁻³ of P, and 150 mg dm⁻³ of K. The T0 treatments received 100% of these recommendations, while the T1, T2, and T3 treatments received 40% of the recommendation. In terms of micronutrient fertilization, all treatments received 100% of the recommendation, which consisted of 0.81 mg dm⁻³ of B, 1.33 mg dm⁻³ of Cu, 1.55 mg dm⁻³ of Fe, 3.66 mg dm⁻³ of Mn, 0.15 mg dm⁻³ of Mo, and 4.0 mg dm⁻³ of Zn. Reagents for analysis (p.a.) were used to supply macro and micronutrients.

The *Azospirillum brasilense* was obtained from a commercial inoculant that guaranteed 2×10^{11} CFU L⁻¹ (colony-forming units per liter) and was applied by homogenizing 100 mL for every 60,000 maize seeds.

The *Herbaspirillum seropedicae* (strain HRC54) was obtained from the Laboratory of Cell and Tissue Biology collection (UENF). The multiplication of *Herbaspirillum seropedicae* was carried out according to Döbereiner et al. (1995), involving bacterial dilution in HS (Canellas et al., 2012) to achieve a concentration of 40 mg L⁻¹ of C in HS and 108 cells mL⁻¹. The C content of HS was determined using the method of Yeomans and Bremner (1988), and the HS was extracted in a 1:10 proportion in water (Thiengo et al., 2020).

The maize seeds were inoculated with *Azospirillum brasilense* and left to air-dry in a cool place for 15 minutes before planting (five seeds per pot). After one week of germination, two more homogeneous plants were retained per pot. The application of *Herbaspirillum seropedicae* + HS was carried out through foliar spray, with 5 mL per plant applied at the V4 and V8 stages (corresponding to the growth stages with 4 and 8 fully expanded leaves, respectively) (Canellas et al., 2012; Giori et al., 2010). The co-inoculation process followed a similar procedure to the inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* + HS within the same plant.

The experiment was irrigated with deionized water at 70% of field capacity, which corresponded to the water demand required by the crop, and the soil moisture was monitored daily.

2.4 - Morpho-agronomic attributes, leaf contents, and physiological parameters

Regarding morpho-agronomic attributes, the following were evaluated: plant height (PH), shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), and the SDM/RDM ratio. Shoot dry mass and RDM were determined by sectioning and weighing the plant parts after drying them in an oven.

At the end of the experiment, gas exchange measurements were evaluated in fully expanded leaves using a portable infrared gas analyzer (IRGA), model LI 6400 XT Portable Photosynthesis System (LI-COR, Lincoln, NE, USA), with a fixed light source at 1000 mmol m⁻² s⁻¹ of photosynthetically active photon flux density. Measurements were taken on one plant per pot between 7:30 and 11:30 am, and the following variables were obtained: A: net assimilation rate of CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), E: transpiration rate

(mmol H₂O m⁻² s⁻¹), gs: stomatal conductance (mol H₂O m⁻² s⁻¹), Ci: internal CO₂ concentration (μmol CO₂ mol⁻¹). Instantaneous water use efficiency (WUE) (A/E) [(μmol CO₂ m⁻² s⁻¹)/(mmol H₂O m⁻² s⁻¹)] and instantaneous carboxylation efficiency (A/Ci) [(μmol CO₂ m⁻² s⁻¹)/(μmol CO₂ mol⁻¹)] were calculated (Konrad et al., 2005). Total chlorophyll (TC) was obtained using the portable chlorophyll meter ClorofiLOG (model CFL 1030 Falker).

In the maize leaf samples collected at the end of the experiment, the contents of K, P, Ca, Mg, and Zn were evaluated following the methodology described by Silva (2009), assisted by a microwave oven for leaf digestion using nitric acid. The analysis of N content followed the methodology of Galvani and Gaertner (2006).

2.5 - Statistical analysis

We performed the analysis of variance (ANOVA) and F-test ($p \leq 0.05$) to verify the significance between effects and their interactions. Normal distribution was evaluated by assessing skewness, kurtosis, and the Shapiro-Wilks normality test. When normal distribution was not achieved, logarithmic transformations were applied to achieve normal distribution in the data. In the event of a significant effect for the interactions, the Tukey test was applied to compare the averages at 5% probability.

Factor analysis (FA) (Hair et al., 2009) was performed using the Principal Components method to obtain eigenvalues, eigenvectors, factorial loads, samples scores, and groups of interrelated variables. Factors with eigenvalues greater than one were selected and then rotated using the orthogonal Varimax method (Hair et al., 2009). Samples scores were evaluated by mean and standard deviation and multivariate scatter plots with factorial loads.

The statistical procedures were performed using the Open Source software R and Sisvar (Ferreira, 2019), using the DescTools package (Signorell et al., 2021) and the Psych package (Revelle, 2022).

3. RESULTS

The statistical summary for each variable is presented in Table 2. Irrigation water (IR) and treatments with and without microbial inoculants (B) significantly affected maize plants' morpho-agronomic variables and leaf nutrient contents. Soil management

presented few significant effects, highlighting N and K leaf contents. Interaction effects do not exist between different managements (SM and IR) and treatments (B), except for stomatal conductance and instantaneous water use efficiency. The most significant p-values in N, P, and K leaf contents occur in treatment with 100% fertilization. Prominent impacts arising from the historical irrigation practices are evident, particularly in relation to the variables RDM (root dry matter), K (potassium), Ca (calcium), and Mg (magnesium).

Table 2 - Summary ANOVA (P-value) for the attributes of vegetative development, mineral nutrition and gas exchange evaluated according to the treatments

Source of Variation	PH	DMAP	RDM	N	P	K	Ca	Mg	TC	A/E	Gs
SM	0.10	0.61	0.23	0.00	0.88	0.01	0.24	0.76	0.24	0.73	0.69
IR	0.69	0.17	0.01	0.01	0.54	0.00	0.00	0.00	0.01	0.09	0.55
B	0.24	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.83	0.83	0.00	0.63	0.01
SM*IR	0.05	0.25	0.54	0.77	0.22	0.84	0.13	0.55	0.50	0.35	0.51
SM*B	0.07	0.96	0.23	0.00	0.31	0.02	0.83	0.13	0.07	0.72	0.00
IR*B	0.31	0.04	0.22	0.00	0.03	0.42	0.17	0.09	0.06	0.00	0.32
B*SM*IR	0.13	0.33	0.01	0.13	0.57	0.01	0.36	0.08	0.57	0.18	0.90

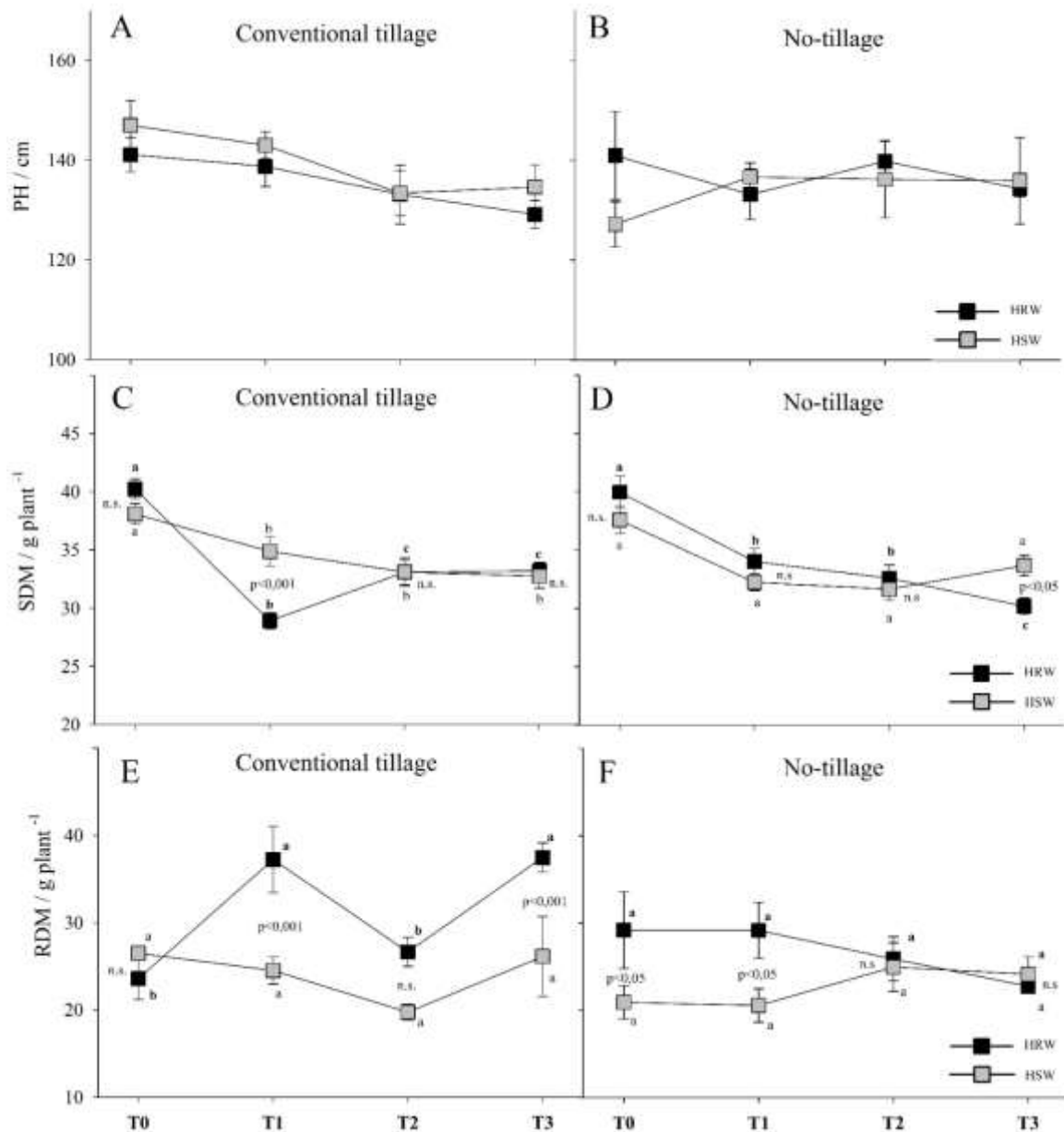
SM - Historical of soil management, IR – Historical of irrigation water, B – Microbial bio-inputs treatments. PH - Plant height, RDM – Root dry mass, RDM - root dry mass, N - nitrogen leaf content, P- phosphorus leaf content, K- potassium leaf content, Ca- calcium leaf content, Mg – magnesium leaf content, TC – Total Chlorophyll, Gs – stomatal conductance, A/E – Instantaneous water use efficiency.

3.1 - Morphoagronomic attributes

Overall, treatments did not influence plant height (PH) (Figures 1A and 1B). These results indicate that treatments with 40% of NPK fertilizer (T1, T2, and T3, mean 271 = 135.8 cm) did not differ significantly ($P < 0.05$) from T0 (mean = 139 cm) with 100% of NPK fertilization.

For shoot dry mass (SDM) accumulation (Figures 1C and 1D), complete fertilization dose (T0) historically stood out statistically independent of irrigation and soil management. It should be noted that SDM production, regardless of usage historical, in treatments T1, T2, and T3 (mean = 39 g plant⁻¹) was, on average, 16.5 % lower than T0 (mean = 32.5 g plant⁻¹) (Figure 1C and 1D). For maize plants grown in soil with a no-till

system and a historical of irrigation with wastewater (HSW), treatment T3 was statistically superior (Figure 1D). For SDM comparing the effect of management historical with conventional tillage (HCT) and considering only treatment T1, it was observed that HRW was lower than HSW (Figure 1C).



Letters compare treatments in the level of historical management (land uses and irrigation) at the 5% significance level. The comparison of the types of water (HRW x HSW), within each treatment (T0 - without bioinputs and 100% fertilization, T1 – *Herbaspirillum seropedicae* + SH with 40% of the fertilization, T2 – *Azospirillum brasilense* with 40% of the fertilization and T3 - co-inoculation of *H. seropedicae* + SH with *A. brasilense* and 40% of the fertilization) is represented by n.s (not significant) and P-values ($p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$).

Figure 1 - Morphoagronomic attributes according to the historical of soil management types (HNTS - historical with no-tillage system, HCPS - historical with conventional planting system) and water used in irrigation (HSW - historical with swine wastewater, HAB - historical with raw water).

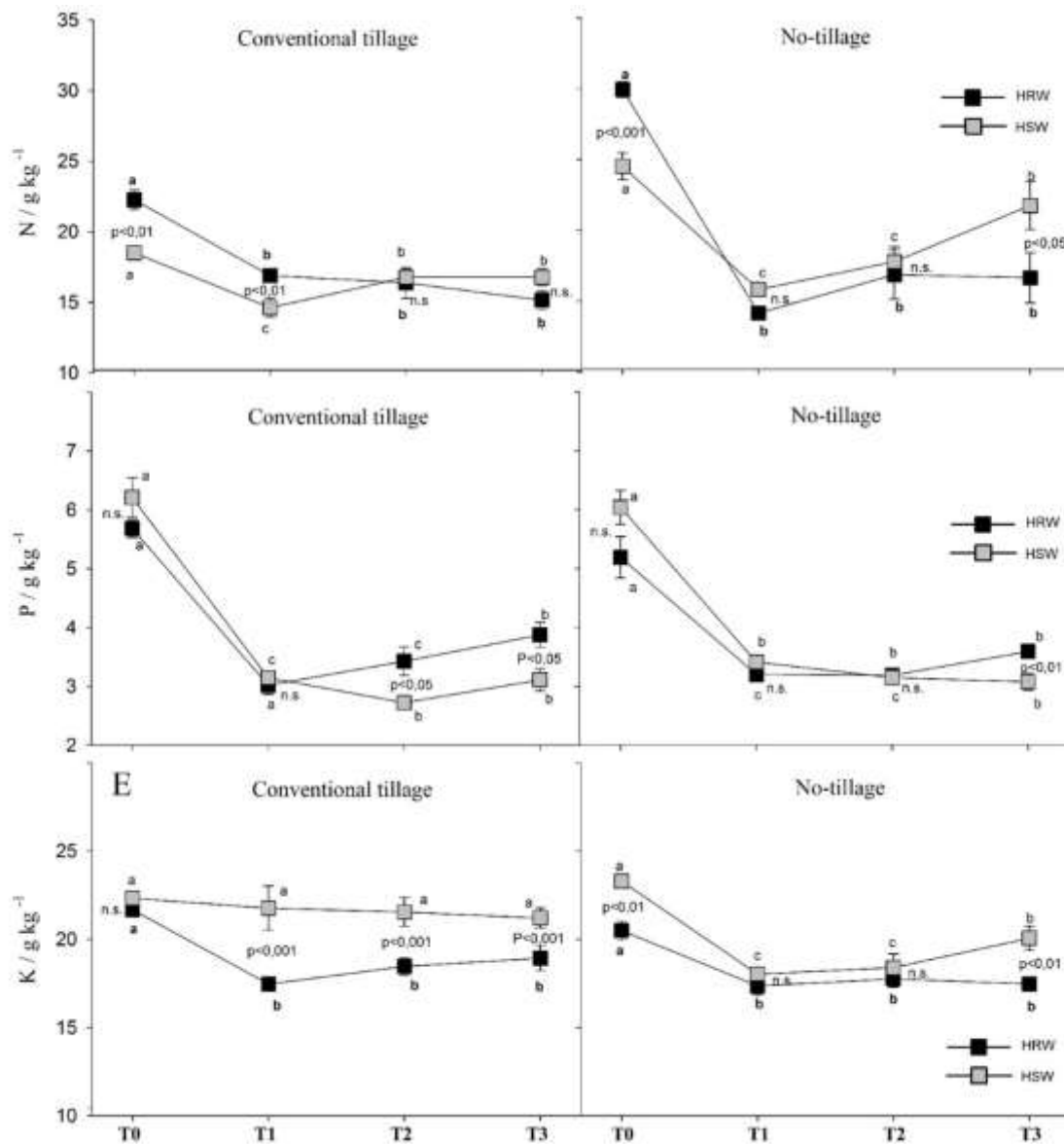
The RDM responded to the treatments, especially when comparing HSW and HRW (Figures 1E and 1F). In the plants in HCT treatment (Figure 1E), the roots showed more significant development with the effect of HRW and when *Herbaspirillum* was used, isolated in co-inoculated. In HCT, the effect of HRW on the increase of RDM was highlighted in treatments T0 and T1 (Figure 1F).

3.2 - Leaf nutrient contents

For leaf N content, plants grown in HNT soil stood out for T0 treatment, increasing more than 50% of their content, even with the same dose of mineral fertilizer used (Figures 2A and 2B). Regardless of irrigation management, treatment T0 in HCT (mean = 20.5 g kg⁻¹) was lower than HNT (mean = 27.4 g kg⁻¹). Within treatment T0 and in each soil management system, the effect of HRW increases N content (Figures 2A and 2B). The effect of microbial inoculants was more evident when plants were grown in soil with HNT and with HSW, highlighting that co-inoculation with 40% fertilization (T3) (mean = 21.75 g kg⁻¹ N) generated a slight decrease compared to treatment T0 (100% fertilization) (mean = 24.53 g kg⁻¹ N) (Figure 2B). Treatment T3 was statistically superior to T1 and T2, highlighting that this treatment (T3) in N content.

The microbial inoculant treatments with 40% fertilization did not increase leaf P contents compared to T0. Higher P contents were observed in T3 treatments (Figure 2C). Overall, among the studied nutrients, P presented the most significant decrease in contents when comparing treatments that received 100% of the fertilization - T0 (5.4 g kg⁻¹) with soils treated with microbial inoculants, where 40% of the P dose was applied (T1 - 3.0 g kg⁻¹, T2 - 2.9 g kg⁻¹, and T3 - 3.21 g kg⁻¹). In these treatments, the mean reduction of leaf P contents was 43.9%.

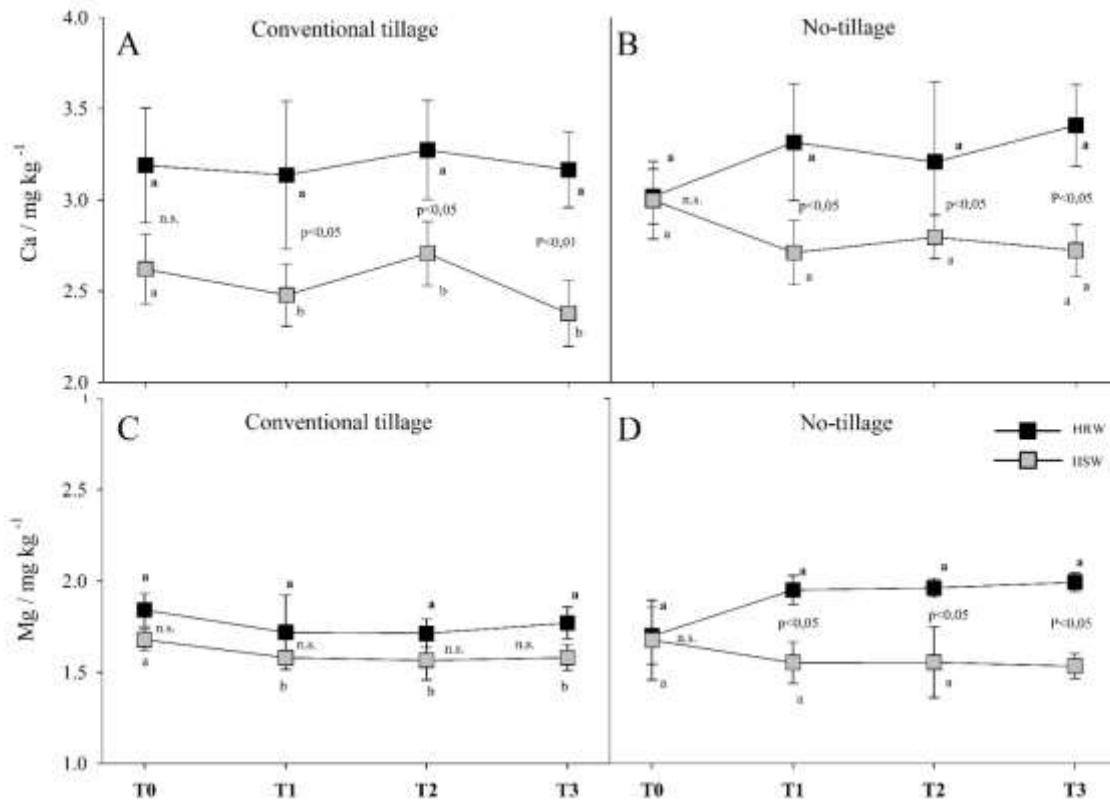
Regarding leaf K content, treatments with soil under HSW showed higher K content (Figures 2E and 2F). Higher K⁺ values were found in soils using SW (Table 1). A less pronounced effect was observed under HNT, where co-inoculation (T3) outperformed the other microbial inoculants (T1 and T2) (Figure 1F).



Letters compare treatments in the level of historical management (land uses and irrigation) at the 5% significance level. The comparison of the types of water (HRW x HSW), within each treatment (T0 - without bioinputs and 100% fertilization, T1 – *Herbaspirillum seropedicae* + SH with 40% of the fertilization, T2 – *Azospirillum brasilense* with 40% of the fertilization and T3 - co-inoculation of *H. seropedicae* + SH with *A. brasilense* and 40% of the fertilization) is represented by n.s (not significant) and P-values ($p<0.001$, $p<0.01$ and $p<0.05$).

Figure 2 – Leaf contents of nitrogen, phosphorus and potassium according to the historical of soil management types (HNTS - historical with no-tillage system, HCPS - historical with conventional planting system) and water used in irrigation (HSW - historical with swine wastewater, HAB - historical with raw water).

Regarding the foliar contents of Ca and Mg (Figure 3), there was no difference between microbial inoculants and soil usage historically. The main highlight is related to the irrigation historical (HRW and HSW), in which HSW reduces the absorption of Ca and Mg. It is emphasized that all treatments received the same dose of limestone.

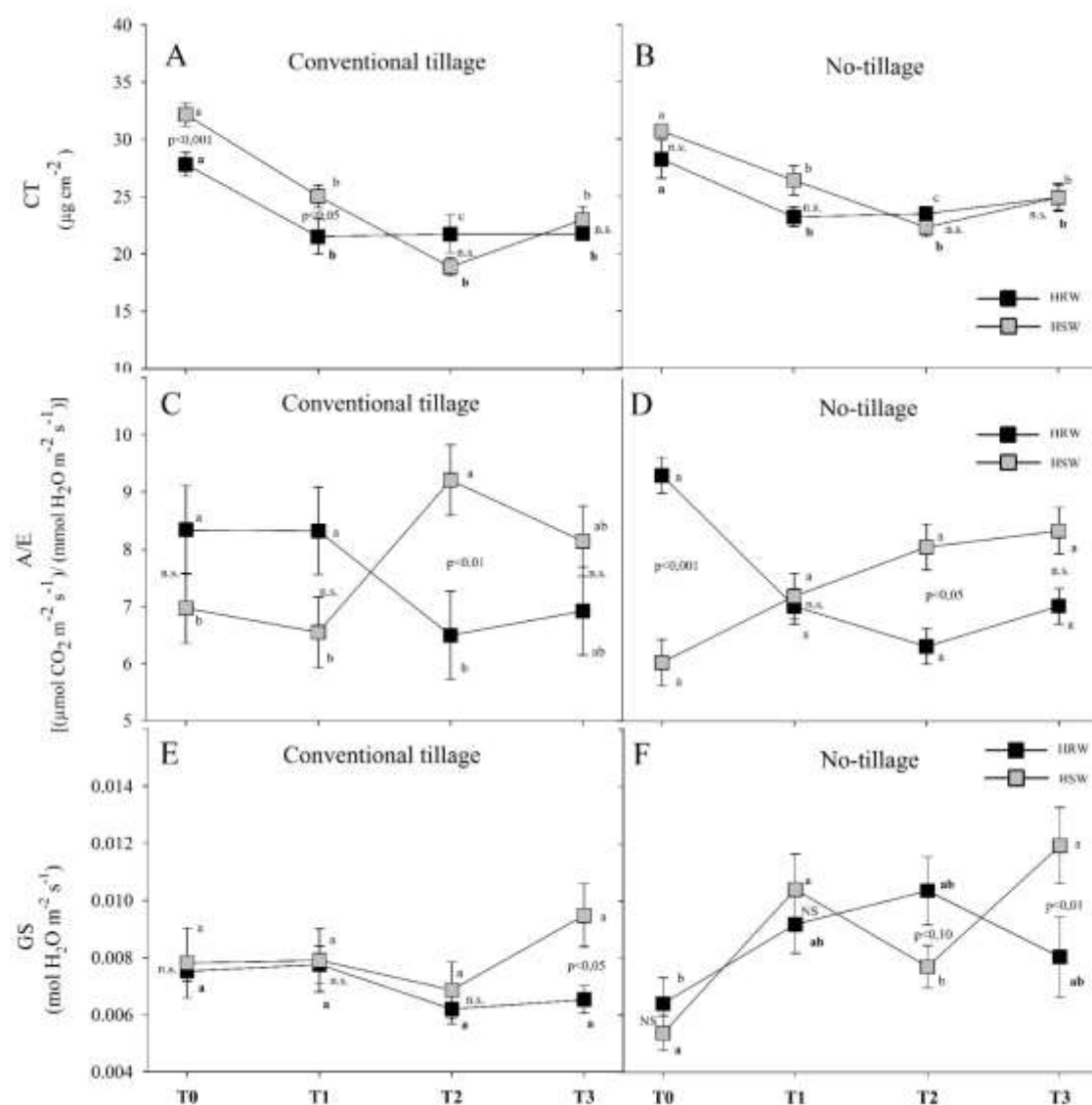


Letters compare treatments in the level of historical management (land uses and irrigation) at the 5% significance level. The comparison of the types of water (HRW x HSW), within each treatment (T0 – without bioinputs and 100% fertilization, T1 – *Herbaspirillum seropedicae* + SH with 40% of the fertilization, T2 – *Azospirillum brasilense* with 40% of the fertilization and T3 – co-inoculation of *H. seropedicae* + SH with *A. brasilense* and 40% of the fertilization) is represented by n.s (not significant) and P-values (p<0.001, p<0.01 and p<0.05).

Figure 3 - Leaf contents of Calcium and Magnesium according to the historical of soil management types (HNTS - historical with no-tillage system, HCPS - historical with conventional planting system) and water used in irrigation (HSW - historical with swine wastewater, HAB - historical with raw water).

3.3 - Photosynthetic parameters

Total chlorophyll (TC) contents were higher with 100% fertilization and without the application of inoculants, highlighting moderate-higher levels within the effect of HSW (Figure 4A). The instantaneous water use efficiency (A/E) is higher when microbial inoculants are applied, mainly when *A. brasilense* is applied as a single strain (T1) or co-inoculated with *H. seropedicae* (T3) (Figure 4C). It should be noted that this increase in A/E only occurs in soil with HSW. Microbial inoculants influenced data related to stomatal conductance (GS), with a more pronounced effect in HNT, particularly in treatment T3 and under the effect of HSW (Figure 4F).



Letters compare treatments in the level of historical management (land uses and irrigation) at the 5% significance level. The comparison of the types of water (HRW x HSW), within each treatment (T0 - without bioinputs and 100% fertilization, T1 – *Herbaspirillum seropedicae* + SH with 40% of the fertilization, T2 – *Azospirillum brasilense* with 40% of the fertilization and T3 -

co-inoculation of *H. seropedicae* + SH with *A. brasilense* and 40% of the fertilization) is represented by n.s (not significant) and 986 P-values ($p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$).

Figure 4 - Total Chlorophyll (CT), Instantaneous water use efficiency (A/E) and Stomatal conductance (Gs) according to the historical of soil management types (HNTS - historical with no-tillage system, HCPS - historical with conventional planting system) and water used in irrigation (HSW - historical with swine wastewater, HAB - historical with raw water).

3.4 - Multivariate Statistics

Factor Analysis (FA) (Table 3) evaluated the interrelated variables and their relationship with the treatments. The first six factors explained 76% of the total data variability and that present eigenvalue greater than 1 (Hair et al., 2009).

Table 3 – Factor loadings of the morpho-agronomic attributes, leaf contents, physiological attributes, eigenvalues and explained variance of the factors after the Varimax orthogonal method

Eigenvalue	3.35	2.65	2.16	1.83	1.64	1.29	Communalit R ²
Explained Variance %	19.7	15.6	12.69	10.79	9.66	7.57	
Accumulated Variance %	19.7	35.3	45.0	58.8	68.4	76.1	
Variables ⁽²⁾	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	
PH	0.20	-0.03	0.06	0.08	-0.10	0.85	0.33
SDM	0.77	0.07	0.05	0.25	0.11	0.26	0.75
RDM	0.01	0.09	-0.04	-0.96	0.04	0.02	0.92
SDM/RDM	0.28	-0.04	0.08	0.92	0.00	0.08	0.93
N	0.72	0.10	0.07	0.09	-0.24	0.05	0.53
P	0.85	0.28	-0.14	-0.06	0.12	0.06	0.81
K	0.60	0.13	0.43	0.17	0.11	0.03	0.55
Ca	-0.03	0.06	-0.87	0.02	-0.14	0.16	0.53
Mg	0.10	-0.02	-0.82	-0.09	0.18	-0.19	0.45
Zn	0.66	-0.10	-0.30	-0.28	0.08	0.20	0.48
TC	0.75	0.14	-0.01	0.20	0.03	-0.31	0.65
A	-0.11	-0.86	-0.01	0.06	0.44	0.01	0.96
GS	-0.13	-0.82	-0.02	0.12	-0.24	-0.12	0.69

Ci	-0.10	-0.58	0.22	-0.22	-0.45	-0.27	0.56
E	-0.19	-0.86	-0.04	0.04	-0.19	0.19	0.95
A/E	0.12	0.10	0.10	-0.01	0.88	-0.17	0.93
A/CI	0.14	-0.16	0.16	0.13	-0.40	-0.36	0.32

⁽¹⁾ Factor loadings: strong - ≥ 0.7 (in bold) and moderate - between 0.7 and 0.5 (Hair et al., 2009).

⁽²⁾ PH - Plant height, SDM – Shoot dry mass, RDM - root dry mass, N – nitrogen leaf content, P- phosphorus leaf content, K- potassium leaf content, Ca- calcium leaf content, Mg – magnesium leaf content, Zn – Zinc leaf content, TC – Total Chlorophyll; A – net assimilation rate of CO₂, Gs – stomatal.

Factor 1 retained 19.69% of the total variability in the original data, and the highest positive factor loadings were related to the attributes SDM, N, P, and CT (Table 3), indicating the effect of fertilization on plant growth and nutrient uptake. There was a positive relationship between SDM and macronutrient levels, indicating that the relative growth rate of dry matter follows the relative rates of nutrient uptake. The attributes A, GS, and E group had the highest negative loadings in Factor 2 (15.6% of the explained variance) (Table 3). Factor 2 is directly associated with physiological changes in the plant, which did not show a direct relationship with morpho-agronomic or nutritional attributes.

The multivariate scatter plot demonstrates the substantial contribution of treatments that received 100% fertilizer in the variable group of Factor 1 (SDM, N, P, and CT) (Figure 5A). For Factor 2, where a negative factor loading of the E, GS, and A variable group is observed, there is a highlighted contribution of treatments with microbial inoculants (T1, T2, and T3) and under the effect of HNT (Figure 4A). Isolating the effects and evaluating scores based on treatments (Figure 6), there is a small contribution of co-inoculation treatments (T3) to Factor 1 (Figure 6A) and a better contribution (T3) to Factor 2 (Figure 6B), which is associated with plant physiological attributes.

Factor 3 (12.7%) had a solid negative factorial loading of leaf Ca and Mg contents. The positive scores attributed to the effects of HSW (Figure 4B) indicate an inverse contribution such that using HSW difficult the plant's absorption of Ca and Mg (Figure 4B). Factor 4 (9.6%) had a strong negative factor loading of the RDM and a positive factorial load of the SDM/RDM relationship. In a way, there was a strong influence on treatments, management history, and water type. The multivariate scatter plot (Figure 4B) demonstrates the higher contribution of microbial inoculants in increasing RDM and fertilization (100% of the dose) in increasing the SDM/RDM relationship. No treatment effect was observed in the variance of Factor 3 (Figure 5C), which was explained solely by the effect of irrigation management. For Factor 4 (Figure 5D), the effects of T1 and

of NPK, SW – Historical effect of successive irrigations with swine wastewater, RW – Historical effect of successive irrigations with raw water.

Figure 5 – Graphical representation of the factor loadings of the variables (≥ 0.7) and representation of the sample scores (average of the repetitions of the treatments) for the factors with eigenvalues above 1.

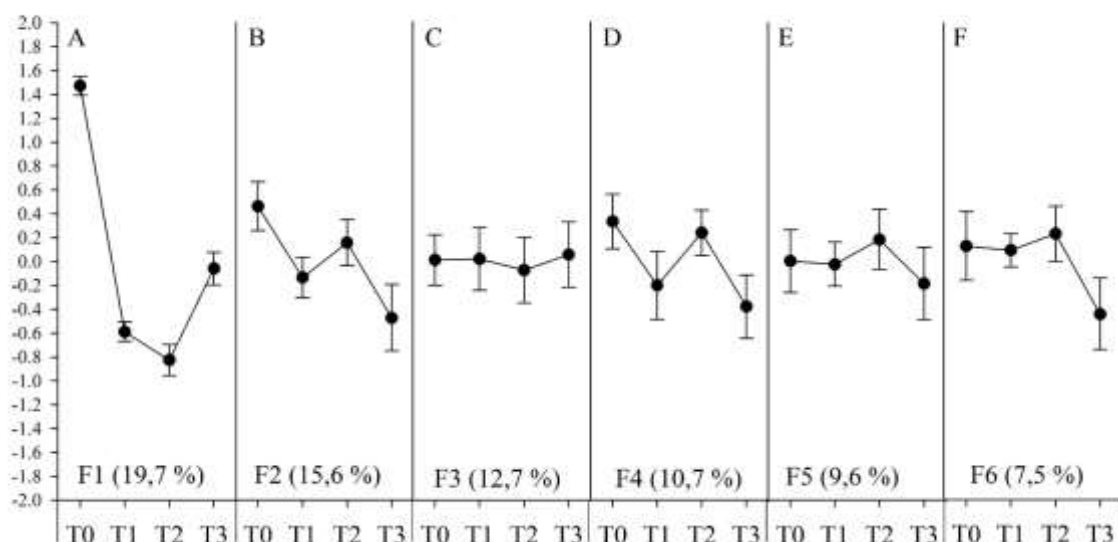


Figure 6 - Representation of the mean and standard error of the factor scores of each Factor (F1, F2, F3, F4, F5 and F6) and its proportional explanations of data variation, grouped only by treatments T1 – *Herbaspirillum seropedicae* + SH with 40% of the fertilization, T2 – *Azospirillum brasilense* with 40% of the fertilization and T3 – co-inoculation of *H. seropedicae* + SH with *A. brasilense* and 40% of the fertilization.

4. DISCUSSION

The efficacy of microbial bio-inputs in maize is subject to multiple influencing factors (Mbuthia et al., 2015; Wang et al., 2020), including the specific type and dosage of fertilization applied (Skonieski et al., 2019), as well as the selection of cultivars, varieties, and hybrids (Alves et al., 2021). Other factors also directly affect the growth performance of host plants; soil type, moisture, salinity, pH variation and temperature (Bhat et al., 2023). The present study emphasizes cultivating a variety of creole maize under optimal soil moisture and base saturation conditions, with variations in NPK fertilization under the influence of soil management effects (conventional and no-tillage)

and types of irrigation water (swine wastewater and raw water). In this context, few studies centred on the interaction between soil management, irrigation types and microbial inoculants (Table 1). Such interactions are more evident for stomatal conductance and instantaneous water use efficiency (Table 1, Figure 4C-F).

The results of our study corroborate with those described in the literature; strains of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*, in single strain formulation or co-inoculated, can display physiological changes in plants, promoting changes in root architecture and aboveground plant parts (Cassán et al., 2013; Curá et al., 2017). Even with a significant reduction in fertilization (lowered by 60%), the impact on some variables, such as plant height, shoot dry mass, and N-K content, was less significant due to the benefits of microbial inoculants. Such reduction in fertilization dose decreased approximately 11.8 to 21.1% in shoot dry mass. Leite et al. (2006), evaluating the phosphate fertilization and dose-response relationship for maize in pot experiments, indicated a reduction of approximately 48% in SDM maize when reducing 60% of the phosphate fertilization doses while keeping other nutrients at optimal levels.

The biofertilization effect was less expressive (Figure 2). However, considering the low-input treatments with microbial inoculants and 40% of the fertilizer dose, only the co-inoculation (treatment T3) stands out in Factor 1 (Figure 5A) of more significant explanation of data variance (Table 3) and where there is a strong relationship between SDM, N, P and CT (Table 3, Figure 5A). Nitrogen acquisition stands out with the co-inoculation of bacteria (T3 treatment) and under the effects of no-tillage and swine wastewater management. *H. seropedicae* and *A. brasilense* co-inoculated have been associated with better agronomic effects in maize than inoculated alone (Dartora et al., 2016).

The effect of co-inoculation may be related to the production of indole compounds (ICs), which according to Cortés-Patiño et al. (2021), *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. can coexist and produce larger quantities of ICs when co-inoculated, such as auxin and indole-3-acetic acid (IAA). These compounds have physiological importance in bacteria-plant interactions, promoting photostimulation (Spaepen et al., 2007) and the formation of lateral roots, decreasing the length of the primary root and increasing the formation of fine root (Vacheron et al., 2013). Therefore, allowing greater nutrient uptake and, consequently, higher biomass production.

Promoting growth effects can be intensified in soil environments that favour carbon input, enabling higher stability of the soil microbial community (Wang et al., 2020), as

reported by Semenov et al. (2020), who observed a positive influence of the soil carbon on the *Azospirillum* sp. population. In this work, historical management of no-tillage and swine wastewater use improve the efficiency of microbial bio-input in co-inoculation treatment (T3) (Figure 1D and 2B). No-tillage management and swine wastewater irrigation water generate higher biological quality of the soil (Table 1), where higher values of TOC, C-soluble, MBN, β -G, and DGS are observed (Table 1), indicating good soil quality and active microorganisms associated with the N cycle (Adeboye and Bala, 2011). The C-soluble indicator indicates labile C in the soil (Silveira et al., 2008).

Thus, the deposition of residues from the HNT plus the residual effect of irrigation with HSW increases labile organic carbon in the soil and higher biological quality. In this condition, bio-stimulation and/or bio-fertilization effects can also be generated by native bacteria (Adeli et al., 2008). Populations of *Azospirillum* spp. are widely distributed in tropical soils (Dobereiner and Day, 1976), mainly in the environment with no soil disturbance, higher organic matter content and live plants in the off-season (Bashan et al., 1995). The bacteria inoculation has provided significant increases in the grain yield of maize for soil attributes (organic matter, texture, tillage management), and, in general, clay soils and no-tillage management stand out (Barbosa et al., 2022).

Concerning the irrigation historical and conventional tillage, HSW generally decreased N levels in the plant without microbial inoculants. Such an effect may be related to the assimilation of N by the plant, a process that demands variable energy expenses depending on the available form of N in the soil. For the assimilation of NO_3^- , the plant consumes more energy than in comparison to NH_4^+ (Bloom et al., 1992; Bredemeier et al., 2000). In the study by Guidinelle (2019), it is observed that there is no addition of NO_3^- in the system due to the application of SW, being able to influence the final absorption of N in the function of the energy expenditure of the plant.

The biostimulant effect was better expressed in Factors 2 and 4 (Table 3). Considering the influence of microbial inoculants on root development, treatments T1, T2, and T3 stand out, which presented higher RDM (Figure 5B and 5D). This effect reinforces the hypothesis that microbial inoculants under abiotic stress conditions (lower fertility) tend to have more noticeable effects on root development when compared to a condition without microbial inoculants (Mahmud et al., 2021). According to Azevedo et al. (2019), applying *Herbaspirillum seropedicae* with humic substances causes physiological alterations in maize roots, increasing root length. A study by Barbosa et al. (2021), which compiled 60 studies conducted in different regions of Brazil, showed that

inoculating maize with *Azospirillum brasilense* increased root dry mass by an average of 12.1%.

The RDM responses were higher when the maize was cultivated in the soil with historical irrigation with raw water (HRW) (Figure 1E) and when associated with a strain of *Herbaspirillum* sp. (Treatments T1 and T3, Figures 1E and 1D). This bacteria is specialized in colonizing the inside of the plants, i.e. have better endophytic competence (Roesh et al., 2006). This represents an ecological advantage over bacteria such as *Azospirillum* sp., which usually colonize the rhizosphere. The biostimulant effect of this strain is associated with the produced compounds that generate the H⁺ concentration gradient in the cell due to the hydrolysis of the ATP proton pump, allowing the symport movement of molecules and the flow of nutrients in the apoplast (Olivares et al., 2017; Guan and Liu, 2020). The relationship between RDM and nutrients was low (non-significant correlations), demonstrating that the direct effect of root growth and nutrient uptake was less evident.

The bio-stimulant effects on plant physiology were better expressed by Factor 2 (Table 3). The positive effects of treatments with microbial inoculants were observed compared to 100% fertilization (Figure 6). In general, treatments T3 and T2 under HSW conditions (Figure 4F) showed the highest values of GS in the plant, which are directly correlated to Ci. This correlation can be explained by the higher photosynthetic rate, increasing the consumption of Ci, which may have stimulated stomatal opening, thus elevating GS (Kuwahara and Souza, 2009). It is a positive result, showing stomatal function controlling the absorption of CO₂ and, consequently, plant production (Costa and Marengo, 2007). In addition, microbial inoculants increased the instantaneous water use efficiency (A/E), meaning plants can produce more by consuming less water (Silva et al., 2016). Oliveira (2020) reported similar results when *Herbaspirillum seropedicae* is associated with humic substances.

Management practices focusing on using effective soil microbiomes under low fertility to promote healthy ecosystems and supporting the sustainable management of soil ensure world food security (Hungria and Vargas, 2000). A more stable production system under moderate nutrient stress consuming fewer non-renewable resources like fertilizer may be reached in a no-tillage system with swine wastewater use. In our work, N contents in HCT and HRW with 100% of fertilizer ($22.2 \pm 1.37 \text{ g kg}^{-1}$) are the no-significant difference ($P < 0.001$) to HNT and HSW with 40% of fertilizer ($21.7 \pm 1.68 \text{ g kg}^{-1}$). In the same way, SDM in HCT and HRW with 100% of fertilizer ($40.2 \pm 1.4 \text{ g kg}^{-1}$).

¹⁾ are the less expressive difference ($P < 0.05$) to HNT and HSW with 40% of fertilizer ($35.7 \pm 1.2 \text{ g kg}^{-1}$).

For leaf K content, it was observed that, in general, maize plants grown in soil HSW presented higher leaf values (Figure 2F), corroborating with soil K⁺ levels (Table 1) and with the results found by Guidinelle et al. (2023), who found higher leaf K contents when irrigating maize with swine wastewater compared to plants irrigated with raw water. Regarding foliar contents of Ca and Mg, maize plants grown in soil with HSW (Figure 5) decrease their uptake. There was no significant influence of the effects of soil management and treatments on leaf Ca and Mg contents. This fact is related to the high ion saturation in the soil solution, which can form ionic pairs with Ca²⁺ and Mg²⁺, reducing plant uptake. These results can be corroborated by the high electrical conductivity value (Table 1) and the composition of HSW, which is rich in sulfates, nitrates, and low molecular weight organic acids, according to Guidinelle et al. (2023). High values of sulfate and nitrite can form ionic pairs such as CaNO₃, CaSO₄, and MgSO₄, reducing the activity of the ion in solution and its uptake by the plant (Zambrosi et al., 2007).

5. CONCLUSION

Using microbial inoculants presents a promising avenue to reduce reliance on chemical fertilization while enhancing production efficiency. The treatments with reduced application of fertilizer doses associated with microbial inoculants exhibited satisfactory effects on morpho-agronomic attributes and resulted in the improved physiological quality of maize.

The soil with historical management with a no-tillage system and irrigation with swine wastewater provided a more favourable edaphic environment and biological quality, presumable maintaining the introduced microbial population and/or promoting the action of native bacteria. The beneficial effects of microbial inoculants on maize's vegetative development occurs mainly when *Azospirillum* and *Herbaspirium* were co-inoculated as bio-inputs.

6. REFERENCES

- ADEBOYE, M.; BALA, A.; OSUNDE, A.; UZOMA, A.; ODOFIN, A.; LAWAL, B. Assessment of soil quality using soil organic carbon and total nitrogen and microbial properties in tropical agroecosystems. **Agricultural Sciences**, 2, 34-40, 2011.
- ADELI, A.; BOLSTER, C. H.; ROWE, D. E.; MCCLAUGHLIN, M. R.; BRINK, G. E. Effect of long-term swine effluent application on selected soil properties. **Soil Science**, v. 173, n. 3, p. 223-235, 2008.
- ALVES, G. C.; DOS SANTOS, C. L.; ZILLI, J. E.; FABIO, B.; MARRIEL, I. E.; BREDÁ, F. A. D. F.; BODDEY, R. M. et al. Agronomic evaluation of *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE94 as an inoculant to improve maize yield in Brazil. **Pedosphere**, v. 31, n. 4, p. 583-595, 2021.
- ARDAKANI, M. R.; MAZAHARI, D.; MAFAKHERI, S.; MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. **Physiol Mol Biol Plants** 17:181–192, 2011.
- ÁVILA, J. S.; FERREIRA, J. S.; SANTOS, R. K.; ROCHA, P. A. D.; LIMA, M. C. Organic maize grown with *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense* associated with green manures. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 27, p. 567-574, 2023.
- AZEVEDO, I. G.; OLIVARES, F. L.; RAMOS, A. C.; BERTOLAZI, A. A.; CANELLAS, L. P. Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H⁺ flux and gene expression in maize roots seedlings. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2019.
- BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.
- BARBOSA, J. Z.; HUNGRIA, M.; SILVA SENA, J. V.; POGGERE, G.; REIS, A. R.; CORRÊA, R. S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, 2021.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil** 378:1–33, 2014.
- BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology, Lancaster**, v.99, p.1294-1301, 1992.
- BRASIL. **Decreto Nº 10.375**, de 26 de maio de 2020. Estabelecendo normas e diretrizes e criação do Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos, que ficara sob responsabilidade do Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento, 2020. Disponível em: < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-10.375-de-26-de-maio-de-2020-258706480> >. Acesso em: 12 de dezembro de 2021.

FONSECA BREDAS, F. A.; SILVA, T. F. R.; SANTOS, S. G.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 4, p. 547-558, 2019.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, p. 365-372, 2000.

BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Measurement of Microbial Biomass Phosphorus in Soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 14, n. 4, p. 319-329, 1 jan. 1982.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C.; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0174576, 2017.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant And Soil**, v. 366, n. 1-2, p.119-132. 2012.

CASIDA, L. E.; KLEIN, D. A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil science**. 98:371-376, 1964.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **J Plant Growth Regul** 33:440-459, 2013.

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. D. S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.

CORTES-PATINO, S.; VARGAS, C.; ALVAREZ-FLOREZ, F.; BONILLA, R.; ESTRADA-BONILLA, G. Potential of *Herbaspirillum* and *Azospirillum* consortium to promote growth of perennial ryegrass under water deficit. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 91, 2021.

COSTA, G. F.; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*), **Acta Amazonica**, v.37, n.2, p. 229-234, 2007.

CURÁ, J. A.; FRANZ, D. R.; FILOSOFÍA, J. E.; BALESTRASSE, K. B.; BURGUEÑO, L. E. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.

DARTORA, J.; MARINI, D.; GONÇALVES, E.; GUIMARÃES, V. F. Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, p. 545-550, 2016.

DAVISON, J. Bactérias benéficas para plantas. **Biotecnologia**, v.6, p. 282-286, 1988.

DE BRUIJN, F. J. **Biological Nitrogen Fixation**. In: Lugtenberg, B. (eds) Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer, Cham. 2015. p. 215-224.

DENG, S.; POPOVA, In. **Carbohydrate Hydrolases**. In: DICK, R. P., (Ed.). Methods of Soil Enzymology. Madison, Soil Science Society of America, 2011. p. 185-208.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant Cell Environ.** 2009, 32, 1682–1694.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, I. J. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, v.34, p.869-881, 1982.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

EIVAZI, F.; M. A. TABATABAI. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**. 20:601-606. 1988.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019.

SILVA FREITAS, G.; BARBOSA, G. F.; ZUFFO, A. M.; STEINER, F. Co-inoculação do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* promove maior tolerância à seca. **Research, Society and Development**. v.9, e69973690, 2020.

FUKAMI, J.; DE LA OSA, C.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Co-inoculação de milho com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* como estratégia para mitigar o estresse salino. **Functional Plant Biology**, v.45, p.328–339, 2018.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Embrapa Pantanal-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2006.

GIORI, F. G. G.; ALEVS, G.; MOREIRA, L. L. Q.; CHAVES, V. A.; MOREIRA, I. M.; PINTO NETA, L. C.; REIS, V. M. **Inoculação em sementes e via foliar da estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* em híbrido de milho BRS1010**. Embrapa Agrobiologia-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2010.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GUIDINELLE, R. B.; RANGEL, O. J. P.; PASSOS, R. R.; BAPTESTINI, J. C. M.; SOUZA, A. O. Chemical properties of Oxisol cultivated with maize in management systems of soil irrigated with swine production wastewater. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20201940, 2023.

GUIDINELLE, R. B. **Água residuária de suinocultura e sistema plantio direto no desenvolvimento do milho para produção de silagem**. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, Alegre, 2019.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688 p.

HARTMAN, K.; VAN DER HEIJDEN, M. G.; WITTWER, R. A.; BANERJEE, S.; WALSER, J. C.; SCHLAEPPI, K. Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. **Microbiome**, v. 6, p. 1-14, 2018.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, 31, p. 1-2, p.413-425, 2010.

ILYAS, N.; BANO, A. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, p. 393-406, 2010.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Soil quality indicators properties in Mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. **Journal of Soil and Water Conservation**, v.55, p.69-78, 2000.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inóculos para aumentar a produtividade da cultura. **Trends Biotechnol**, v.7, p.39-43, 1989.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B. D.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 64, n. 3, p.339-347, 2005.

KOUR, D.; RANA, K. L.; YADAV, N.; YADAV, A. N.; KUMAR, A.; MEENA, V. S.; SAXENA, A. K. **Rhizospheric Microbiomes: Biodiversity, Mechanisms of Plant Growth Promotion, and Biotechnological Applications for Sustainable Agriculture**. In: Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability. Springer, Singapore, 2019. p. 19-65.

KUWAHARA, F. A.; SOUZA, G. M. Fósforo como possível mitigador dos efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento e as trocas gasosas de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5 Vitória. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 2, p.261-267, 2009.

LIMA JÚNIOR, E. C. ALVARENGA, A. A.; DE CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; BARBOSA, J. P. R. A. D. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania*

vernalis Camb. Submetidas a diferentes níveis de sombreamento, **Revista Árvore**, v.30, n.31, p.33-41, 2006.

LINDEMANN, S. R.; BERNSTEIN, H. C.; SONG, H. S.; FREDRICKSON, J. K.; FIELDS, M. W.; SHOU, W.; BELIAEV, A. S. Engineering Microbial Consortia for Controllable Outputs. **The ISME journal**. 2016, 10, 2077–2084.

MAHMUD, A. A.; UPADHYAY, S. K.; SRIVASTAVA, A. K.; BHOJIYA, A. A. Biofertilizers: A Nexus between soil fertility and crop productivity under abiotic stress. **Current Research in Environmental Sustainability**, v. 3, p. 100063, 2021.

MALUSÁ E.; VASSILEV N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. **Appl Microbiol Biotechnol** 98:6599–6607, 2014.

MATTEOLI, F. P.; OLIVARES, F. L.; VENANCIO, T. M.; DA ROCHA, L. O.; DA SILVA IRINEU, L. E. S.; CANELLAS, L. P. **Herbaspirillum**. In: Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Academic Press, 2020. p. 493-508.

MBUTHIA, L. W.; ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; DEBRUYN, J.; SCHAEFFER, S.; TYLER, D.; ODOI, E.; EASH, N. Long-term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure, activity: implications for soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 89: 24–34, 2015.

MENDONÇA, E. S.; MATOS, E. S. **Matéria Orgânica do Solo - Métodos de Análises**. 2ª EDIÇÃO. 2017. 221p.

MORAIS, M.; AMARAL, H. F.; NUNES, M. P. Desenvolvimento e assimilação de nutrientes da cultura de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* e diferentes doses de nitrogênio e potássio. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 34, n. esp., p. 160-176, 2018.

MORAIS, T. P. D.; BRITO, C. H. D.; FERREIRA, A. D. S.; LUZ, J. M. Q. Aspectos morfofisiológicos de plantas de milho e bioquímico do solo em resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista Ceres**, v. 62, n. 6, p. 589-596, 2015.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ed. da UFLA, 2006.

NOVAIS, R. D.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. D. **Ensaio em ambiente controlado**. In. OLIVEIRA, A.J. et al. Métodos de pesquisa em fertilidade do solo. Brasília, DF: EMBRAPA-SEA, 1991. 392 p.

NUNES, R. D. O.; DOMICIANO A. G.; DE SOUSA, A. W.; APARECIDA, DE O. J.; CESAR, S. N., F., CANELLAS, P. L.; SOARES, M. R. Quantitative proteomic analysis reveals altered enzyme expression profile in *Zea mays* roots during the early stages of colonization by *Herbaspirillum seropedicae*. **Proteomics**, v. 21, n. 7-8, p. 2000129, 2021.

OLIVEIRA, D. M. **Potencial de insumos biológicos no desenvolvimento de forrageiras**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre, ES. 2020.

PEDROSA, F. O.; OLIVEIRA, A. L. M.; GUIMARÃES, V. F.; ETTO, R. M.; SOUZA, E. M.; FURMAM, F. G.; GALVÃO, C. W. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 45-56, 2020.

POLIDOO, G. P. **Água residuária de suinocultura e sistema plantio direto: Efeitos sobre atributos do solo, desenvolvimento e nutrição do milho**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alegre, 2021.

PREZOTTI, L. C.; OLIVEIRA, J. A.; GOMES, J. A.; DADALTO, G. G. **Manual de Recomendação de Calagem e Adubação para o estado do Espírito Santo – 5ª Aproximação**. Vitória – ES. SEEA/INCAPER/CEDAGRO, 2007. 305p

RAFFI, M. M.; CHARYULU, P. B. B. N. Azospirillum-biofertilizer for sustainable cereal crop production: Current status. In: Recent developments in applied microbiology and biochemistry. **Academic Press**, 2021. p. 193-209.

REVELLE, W. **psychTools: Tools to Accompany the 'psych' Package for Psychological Research**. Northwestern University, Evanston, Illinois. R package version 2.1.6. 2021.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growthpromoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p.552–555, 2004.

RUSSELL, L.; STOKES, A. R.; MACDONALD, H.; MUSCOLO, A.; NARDI, S. Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A₂. **Solo da Planta** 283:175–185, 2006.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 2021.

SEMENOV, M. V.; KRASNOV, G. S.; SEMENOV, V. M.; VAN BRUGGEN, A. H. Longterm fertilization rather than plant species shapes rhizosphere and bulk soil prokaryotic communities in agroecosystems. **Applied Soil Ecology**. 154, 103641, 2020.

SIGNORELL, A. **DescTools: Tools for Descriptive Statistics**. R package version 0.99.42. 2021.

SILVA, A. D., BRITO, M. E. B.; FRADE, L. J. G.; NOBRE, R. G.; COSTA, F. B. D.; MELO, A. S. D.; SILVA, L. D. A. Crescimento e trocas gasosas de genótipos de feijão-caupi sob estratégias de cultivo. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, n. 3, p.745-758, 23 jun. 2016.

SILVA, F. C. S. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

SILVEIRA, M. L.; COMERFORD, N. B.; REDDY, K. R.; COOPER, W. T.; EL-RIFAI, H. Characterization of soil organic carbon pools by acid hydrolysis. **Geoderma**, v. 144, n. 1-2, p. 405-414, 2008.

SKONIESKI, F. R.; VIÉGAS, J.; MARTIN, T. N.; MINGOTTI, C. C. A.; NAETZOLD, S.; TONIN, T. J.; MEINERZ, G. R. Effect of nitrogen topdressing fertilization and inoculation of seeds with *Azospirillum brasilense* on maize yield and agronomic characteristics. **Agronomy** 9: 812, 2019.

SOUZA, R. D.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, p. 401-419, 2015.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol Rev** 31:425-448. 2007.

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial and ¹⁴C-labeled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p.337–343, 1988.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

TURNER, I. M. **The ecology of trees in tropical the tropical rain forest**. Cambridge University Press, New York, 2001.

VACHERON, J.; DESBROSSES, G.; BOUFFAUD, M. L.; TOURAINÉ, B.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; MULLER, D.; PRIGENT-COMBARET, C. Prigent-Combaret, C. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e funcionamento do sistema radicular. **Frontiers in plant science**, 4, 1–19. 2013.

WANG, Z.; LI, Y.; LI, T.; ZHAO, D.; LIAO, Y. Tillage practices with different soil disturbance shape the rhizosphere bacterial community throughout crop growth. **Soil Tillage Res** 197: 104501, 2020.

YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. Comm. **Soil Science of Plants and Analyses**. v.19, p.1467-1476, 1988.

ZAMBROSI, F. C. B.; ALLEONI, L. R. F.; CAIRES, E. F. Aplicação de gesso agrícola e especiação iônica da solução de um Latossolo sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 110-117, 2007.

ZHANG, N.; NUNAN, N.; HIRSCH, P. R.; SUN, B.; ZHOU, J.; LIANG, Y. Theory of microbial coexistence in promoting soil–plant ecosystem health. **Biology and Fertility of Soils**, v. 57, p. 897-911, 2021.

CAPÍTULO 2 - CRESCIMENTO DE MILHO EM CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA: BIOINSUMOS BIOLÓGICOS E HISTÓRICOS DE MANEJO ⁽²⁾

RESUMO

Dada a limitação de recursos naturais para a produção agrícola, sobretudo solo e água, os estudos que buscam suprir essas necessidades se mostram cada vez mais importantes. Nesse cenário, os bioinsumos destacam-se como uma opção de grande potencial, devido à sua habilidade em modular mecanismos nas plantas que auxiliam na superação de estresses bióticos e abióticos, estimulando a capacidade de absorção de água e nutrientes em diversas condições de manejo. Deste modo, objetivou-se neste estudo é avaliar, em casa de vegetação, o efeito de bioinsumos à base de *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense* no crescimento inicial e nutrição do milho crioulo, sob condições de menor disponibilidade hídrica em solos com diferentes históricos de manejo. Foram avaliados dois históricos de sistemas de manejo do solo, dois históricos de irrigação e quatro níveis com bioinsumos microbianos: T0 - sem bioinsumos microbianos e doses de 100% de adubação NPK; T1 – *H. seropedicae* + substâncias húmicas (SH) e 40% de adubação NPK; T2 – *A. brasilense* e 40% de fertilização NPK; T3 – co-inoculação (*H. seropedicae* + SH e *A. brasilense*). Mesmo com uma redução de 60% na adubação NPK e em condições de menor disponibilidade hídrica, os bioinsumos surgem como uma tecnologia promissora na agricultura, com o potencial de aumentar a eficiência no uso de fertilizantes e a viabilidade de substituir parte das necessidades de adubação na cultura do milho. Quando em co-inoculação, houve uma redução média de 7,8% no teor foliar de N em comparação ao tratamento sem bioinsumos com 100% da adubação. As respostas observadas nos atributos fisiológicos indicam fortes influências dos tratamentos com aplicação dos bioinsumos biológicos.

Palavras chave: inoculantes microbianos, água residuária de suinocultura, sistema plantio direto, nutrição de milho, disponibilidade hídrica.

⁽²⁾ Artigo em submissão na Revista Caatinga - ISSN 0100-316X (IMPRESSO), 1983-2125 (ONLINE)

A MAIZE GROWTH UNDER WATER RESTRICTED CONDITIONS: BIOLOGICAL BIOINPUTS AND MANAGEMENT HISTORY

ABSTRACT

Given the limitation of natural resources for agricultural production, especially soil and water, studies that seek to meet these needs are increasingly important. In this scenario, bioinputs stand out as an option with great potential, due to their ability to modulate mechanisms in plants that help to overcome biotic and abiotic stresses, stimulating the capacity to absorb water and nutrients under different management conditions. Therefore, the objective of this study is to evaluate, in a greenhouse, the effect of bioinputs based on *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense* on the initial growth and nutrition of creole maize, under conditions of lower water availability in soils with different management histories. Two histories of soil management systems, two histories of irrigation and three treatments with microbial bioinputs were evaluated: T0 - without microbial bioinputs and doses of 100% NPK fertilizer; T1 – *H. seropedicae* + humic substances (SH) and 40% NPK fertilizer; T2 – *A. brasilense* and 40% NPK fertilization; T3 – co-inoculation (*H. seropedicae* + SH and *A. brasilense*). Even with a 60% reduction in NPK fertilization and in conditions of lower water availability, bioinputs emerge as a promising technology in agriculture, with the potential to increase efficiency in the use of fertilizers and the feasibility of replacing part of the fertilization needs in agriculture in maize culture. When in co-inoculation, there was an average reduction of 7.8% in foliar N content compared to the treatment without bioinputs with 100% fertilization. The responses observed in physiological attributes indicate strong influences of treatments with the application of biological bioinputs.

Keyword: microbial inoculants, pig farming wastewater, direct planting system, maize nutrition, water availability.

1. INTRODUÇÃO

A indisponibilidade de água apresenta uma tendência de se intensificar frente às mudanças climáticas, impactando diretamente a produção agrícola. Diversas alternativas adaptativas estão sendo pesquisadas e o uso de bioinsumos na agricultura vem se despontando como uma tecnologia promissora gerando efeito bioestimulante e de defesa natural contra stresses abióticos. São diversos os trabalhos científicos que demonstram seus efeitos positivos nas mais diversas culturas e condições de uso e manejo do solo, destacando-se os inoculantes microbianos e em particular as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (Alves et al., 2021; Nunes et al., 2021).

Dentre elas as dos gêneros *Azospirillum* (Cassán & Diaz-Zorita, 2016) e *Herbaspirillum* (Matteoli et al., 2020), se destacando quanto ao incrementando na produtividade das culturas agrícolas mesmo em situações edafoclimáticas adversas de stresses abióticos e bióticos. Além disso, a construção de um ambiente edáfico diversificado em função de diferentes formas de manejo pode gerar respostas diferenciadas para uma mesma BPCV. A eficiência de inoculantes microbianos no milho é influenciada por diversos fatores como manejo (Wang et al. 2020), tipo de solo, umidade e temperatura (Whipps et al., 2008), quantidade de adubação e tipo de cultivares, variedades e híbridos (Skonieski et al., 2019).

O uso do *Azospirillum* sp. na agricultura é consolidado, existindo cepas selecionadas com potencial de uso para diferentes culturas (Santos et al., 2021), sendo um gênero versátil possuindo inúmeros mecanismos potenciais de bioestimulação e biofortificação que influenciam positivamente o crescimento da planta (Bashan et al., 2010). Já o *Herbaspirillum* sp. apresenta mecanismos atribuídos à produção de fitohormônios, fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Fonseca et al., 2016) e alterações fisiológicas nas plantas que potencializam o aproveitamento de água e nutrientes (Azevedo et al., 2019).

Com a hipótese de que o efeito promotor de crescimento de plantas de estirpes selecionadas de *Azospirillum* sp. e *Herbaspirillum* sp. em condições de menor disponibilidade hídrica podem apresentar respostas variáveis a depender das condições de manejo, objetivou-se neste estudo avaliar, em casa de vegetação, o efeito de bioinsumos à base de *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54) associado com substâncias húmicas e *Azospirillum brasilense* (estirpes CNPSo 2083 e 2084) no crescimento inicial e nutrição do milho crioulo, sob condições de menor disponibilidade

hídrica em solos com histórico de uso sob irrigação com água residuária de suinocultura e sob sistema plantio direto e convencional.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Histórico de manejos e caracterização do solo

O solo foi coletado em uma unidade experimental permanente na qual se avalia a longo prazo o efeito de dois modelos de manejo sustentáveis: plantio direto e uso de água residuária de suinocultura. As parcelas fixas foram implantadas no início de 2017, onde foram conduzidos quatro ciclos consecutivos de cultivo de milho (*Zea mays L.*) em dois sistemas de manejo do solo: sistema plantio direto (SPD) e sistema plantio convencional (SPC) irrigados com água residuária de suinocultura (ARS) e água bruta (AB) (suprindo 100% da demanda hídrica da cultura). No SPD, realiza-se o plantio da mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) no período de pousio do solo. No SPC realiza-se a aração e gradagem do solo antes do plantio de cada ciclo de cultivo do milho. Com relação a ARS foram aplicados $5.169,5 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ durante os 4 ciclos de cultivo do milho. As amostras usadas no presente estudo são representativas do efeito desses quatro tipos de manejos sobre o solo durante 5 anos.

Coletou-se amostras da profundidade de 0-20 cm. Amostras compostas (10 amostras simples) representativas do solo de cada manejo foram coletadas para condução do experimento em casa de vegetação e caracterização (Tabela 1). Parte dessas amostras foram armazenadas refrigeradas ($\pm 4^\circ\text{C}$), para realização da caracterização dos atributos biológicos: β -glucosidase ($\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (β -B), desidrogenase ($\mu\text{g TPF g}^{-1}$ solo) (DSN), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), carbono da biomassa microbiana (CBM), carbono orgânico total do solo (COT) e carbono extraído com sulfato de potássio (C-solúvel) (Tabela 1) (Jat et al., 2020). A granulometria do solo utilizado no trabalho era composta de 640 g kg^{-1} de areia, 100 g kg^{-1} de silte e 260 g kg^{-1} de argila, tratando-se de um solo de textura média.

Tabela 1 – Atributos químicos das amostras de solos antes da implantação do estudo em casa de vegetação, em diferentes sistemas de manejo

Atributos		Manejo			
		HSPD + HARS	HSPC + HARS	HSPD + HAB	HSPC + HAB
CE	mS m ⁻¹	134,2	154,2	120,4	128,8
COT	g kg ⁻¹	14,2	12,3	12,9	10,9
C-solúvel	mg kg ⁻¹	22,0	19,8	9,7	8,0
CBM	mg kg ⁻¹	484,3	481,2	475,6	469,0
NBM	mg kg ⁻¹	75,7	35,9	45,7	34,5
β -G		82,9	65,2	80,4	68,4
DSN		138,2	103,4	136,3	114,3

CE: Condutividade elétrica. COT: Carbono Orgânico Total; C-solúvel: Carbono solúvel; NBM: Nitrogênio da Biomassa Microbiana; CBM: Carbono da Biomassa Microbiana; β-G: Enzima β-Glucosidase (μg p-nitrofenol h⁻¹ g⁻¹); DSN; Enzima Desidrogenase (μg TPF g⁻¹ solo).

2.2 - Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e as temperaturas variaram, entre 35 e 25 °C, de máximas e de 20 e 12 °C de mínimas. O experimento foi conduzido em esquema fatorial em blocos casualizados 2x2x4, com quatro repetições. No primeiro fator foi estudado o efeito do histórico de manejo com sistema plantio direto (HSPD) e plantio convencional (HSPC). No segundo fator avaliou-se o efeito acumulado de irrigações sucessivas com água residuária de suinocultura (HARS) e água bruta (HAB), equivalente a 100% da evapotranspiração real da cultura do milho – Etc. O terceiro fator, como forma de avaliar o efeito dos históricos de uso sob a eficiência de bioinsumos microbianos do crescimento do milho, delineou-se 4 níveis: T0 - sem os bioinsumos e 100% da adubação, T1 – *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54) + Substâncias Húmicas como veículo (SH) com 40% da adubação, T2 – *Azospirillum brasilense* (estirpes CNPSO 2083 e 2084) com 40% da adubação e T3 - co-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54) + Substâncias Húmicas como veículo (SH) com *Azospirillum brasilense* (estirpes CNPSO 2083=Ab-V5 e CNPSO 2084=Ab-V6) e 40% da adubação. As doses dos fertilizantes minerais (N, P₂O₅ e K₂O - NPK) foram baseados nas recomendações de Novais et al. (1991), para a cultura.

2.3 - Implantação, condução do experimento e restrição hídrica

Para realizar o experimento, foram empregados recipientes de 5 dm³, designados como unidades experimentais. Esses recipientes passaram por um processo de desinfestação, e as sementes de milho utilizadas pertencem à variedade crioula Fortaleza, obtidas de um agricultor familiar regional. Antes do plantio, as sementes foram submetidas à desinfestação.

A adubação seguiu recomendações de Novais et al. (1991) para estudos em ambiente controlado (100 mg dm⁻³ de N, 300 mg dm⁻³ de P e 150 mg dm⁻³ de K). O nível T0 recebeu 100% da recomendação e os níveis T1, T2 e T3 40% da adubação. Para adubação com micronutrientes todos os tratamentos receberam 100% da seguinte recomendação: 0,81 mg dm⁻³ de B, 1,33 mg dm⁻³ de Cu, 1,55 mg dm⁻³ de Fe, 3,66 mg dm⁻³ de Mn, 0,15 mg dm⁻³ de Mo e 4,00 mg dm⁻³ de Zn. Para o fornecimento de macro e micronutrientes foram utilizados reagentes para análises (p.a.). O solo previamente triturado e peneirado em peneira de 4,0 mm, foi incubado por um período 30 dias para realização da correção da acidez, elevando a saturação de bases (V) a 60% em todos os tratamentos.

O *A. brasilense* (estirpes CNPSO 2083=Ab-V5 e CNPSO 2084=Ab-V6) foi adquirido por inoculante comercial com de 2 x 10¹¹ Unidade Formadora de Colônias (UFC) L⁻¹ no produto, sendo aplicado e homogeneizado 100 mL para cada 60.000 sementes de milho. O *H. seropedicae* (estirpe HRC54) foi adquirido da coleção da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Realizou-se a multiplicação do *H. seropedicae* e diluição em substâncias húmicas (SH) a fim de obter 40 mg L⁻¹ de C das SH e 10⁸ células mL⁻¹ (Thiengo et al., 2023).

Antes do plantio as sementes foram inoculadas com *A. brasilense*. O plantio foi realizado com 5 sementes de milho por vaso e, após uma semana de germinação, realizou-se o desbaste, mantendo duas plantas por vaso. A aplicação do *H. seropedicae* + SH foi realizada via foliar, em dois estádios de desenvolvimento das plantas (V4 e V8) (Giori et al., 2010), aplicando-se 5 mL por planta em cada aplicação, recobrando-se totalmente a superfície das folhas. O processo para a co-inoculação foi realizado de forma similar à inoculação do *A. brasilense* e do *H. seropedicae* + SH, porém, repetido na mesma planta.

A restrição hídrica foi imposta realizando uma irrigação correspondente a 45% do volume total de poros. Assim, a manutenção da umidade do solo foi realizada através da pesagem diária do material experimental unidades.

2.4 - Atributos morfoagronômicos, teores foliares e parâmetros fisiológicos

Após 60 dias de emergências das plantas foi realizado o desmonte do experimento. Em relação aos atributos morfoagronômicos foram avaliados: altura de planta (AP), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR). MSPA e MSR foram avaliados depois da secagem em estufa.

Avaliou-se a medição de trocas gasosas em folhas totalmente expandidas por meio do analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo LI 6400 XT *Portable Photosynthesis Siystem* (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em $1000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos. As medições foram realizadas em uma planta por vaso entre 7:30 e 11:30 horas obtendo-se as seguintes variáveis: A – taxa de assimilação líquida de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E – taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); gs – condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Ci – concentração interna de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Calculou-se também a eficiência instantânea no uso da água (EUA) (A/E) [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) / (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$] e a eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) / (\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1})$]. A clorofila total (CT), obtida com a utilização do clorofilômetro portátil ClorofiLOG (modelo CFL 1030 Falker).

Nas amostras de folha de milho, coletadas ao término do experimento, foram avaliados os teores de N, P, K, Ca e Mg, seguindo a metodologia descrita por Silva (2009), assistido por forno de micro-ondas para digestão foliar utilizando-se ácido nítrico.

2.5 - Análise estatística

Com os resultados dos dados experimentais foi realizado a análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F ($p \leq 0,05$) para verificar a significância dos efeitos dos fatores e das suas interações. A distribuição normal foi avaliada pela assimetria, curtose e teste de normalidade Shapiro-Wilks e a homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Quando não atendida tais pressuposições, foram efetuadas transformações logarítmicas a fim de adequar os dados à análise de variância. Em caso de efeito significativo para as interações, aplicou-se o teste Tukey para comparação das médias a 5% e 1% de probabilidade.

Foi realizada a Análise de Componente Principais (ACP) (Hair et al., 2009), a partir da matriz de correlação das variáveis, obtendo-se os autovalores, autovetores e grupos de variáveis inter-relacionadas. Foram selecionados os Componentes com autovalor maior que 1 (Hair et al., 2009). Os escores foram avaliados por meio de média e erro padrão.

Os procedimentos estatísticos foram realizados por meio dos softwares Open Source R utilizando-se os pacotes *DescTools* e *Psych* (R Core Team, 2016).

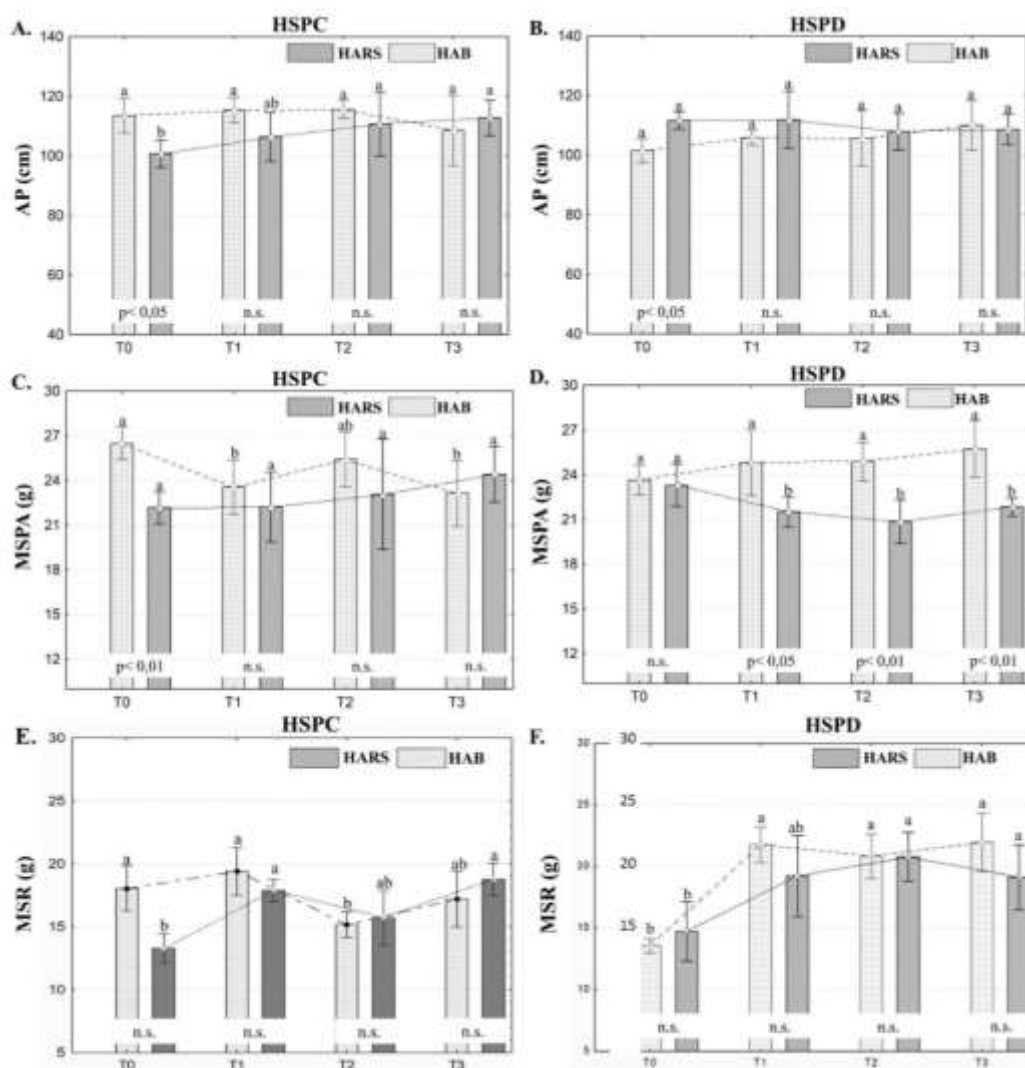
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Atributos Morfoagronômicos, teores foliares e fisiologia

Para a característica Altura de Planta (AP), foi observado que sob efeito de histórico de manejo com sistema plantio convencional (HSPC) e histórico de manejo com água residuária de suinocultura (HARS) (Figura 1A), o T0 (100% de adubação NPK) foi estatisticamente inferior aos demais tratamentos e, em contrapartida, histórico de manejo com água bruta (HAB) (Figura 1A) os tratamentos se mostraram estatisticamente iguais. Para o histórico de manejo com sistema plantio direto (HSPD) (Figura 1B), independente do histórico de irrigação no campo todos os resultados foram estatisticamente iguais em relação à AP. Com relação à MSPA, existe uma tendência geral de menores valores sob HARS (Figura 1C e 1D). Destaca-se tratamento T0 estatisticamente igual ao tratamento T2 (*A. brasilense* + 40% da adubação) sob efeito de HSPC e HAB. O tratamento T0 é estatisticamente superior aos demais considerando o HSPD e HARS. Para MSR sob efeito do HSPC todos os tratamentos foram estatisticamente iguais independente do histórico de irrigação no campo. Para HSPD os tratamentos T0, nas duas condições de histórico de irrigação no campo, foram estatisticamente inferiores aos demais tratamentos, exceto, T0 em ARS que não difere de T1.

Em relação aos resultados morfoagronômicos, majoritariamente observou-se que não houve diferença significativa entre tratamentos com bioinsumos em diferentes históricos de irrigação no campo e manejo. Nos resultados de AP e MSPA no HSPC para o tratamento T0, o HAB foi estatisticamente superior ao HARS, enquanto nos tratamentos com bioinsumo (T1, T2 e T3) os resultados foram estatisticamente iguais para HAB e HARS ($p < 0,05$) (Figura 1 A e C), resultado semelhante foi observado para MSR no HSPD (Figura 1 F). De acordo com Rojas et al. (2012) diversos fatores podem estar ligados a melhoria das BPCV sobre a salinidade, incluindo o aumento da capacidade antioxidante

da planta, síntese bacteriana de hormônios vegetais promovendo incremento vegetal ou regulação de transportadores de íons que resultaram em um equilíbrio celular.



*Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de amostras com histórico irrigação no campo, ao nível de 5% de significância. Os valores de n.s (não significativo), $p < 0,001$ (0,1% de significância), $p < 0,01$ (1% de significância) e $p < 0,05$ (5% de significância) comparam os tipos de água.

Figura 1 – Influência dos bioinsumos, históricos de água de irrigação (HAB – histórico de irrigação com água bruta e HAr – histórico de irrigação com água residurária) e manejo do solo (HSPC – Histórico de sistema plantio convencional, HSPD - Histórico de sistema plantio direto) nos atributos de desenvolvimento vegetativo do milho crioulo.

Na Figura 2 são apresentados os resultados de nutrição mineral da cultura do milho. Analisando o teor de N na condição de HSPC (Figura 2A) o T0 se sobressaiu aos demais tratamentos, independente da condição do histórico de irrigação no campo. Para o HSPD,

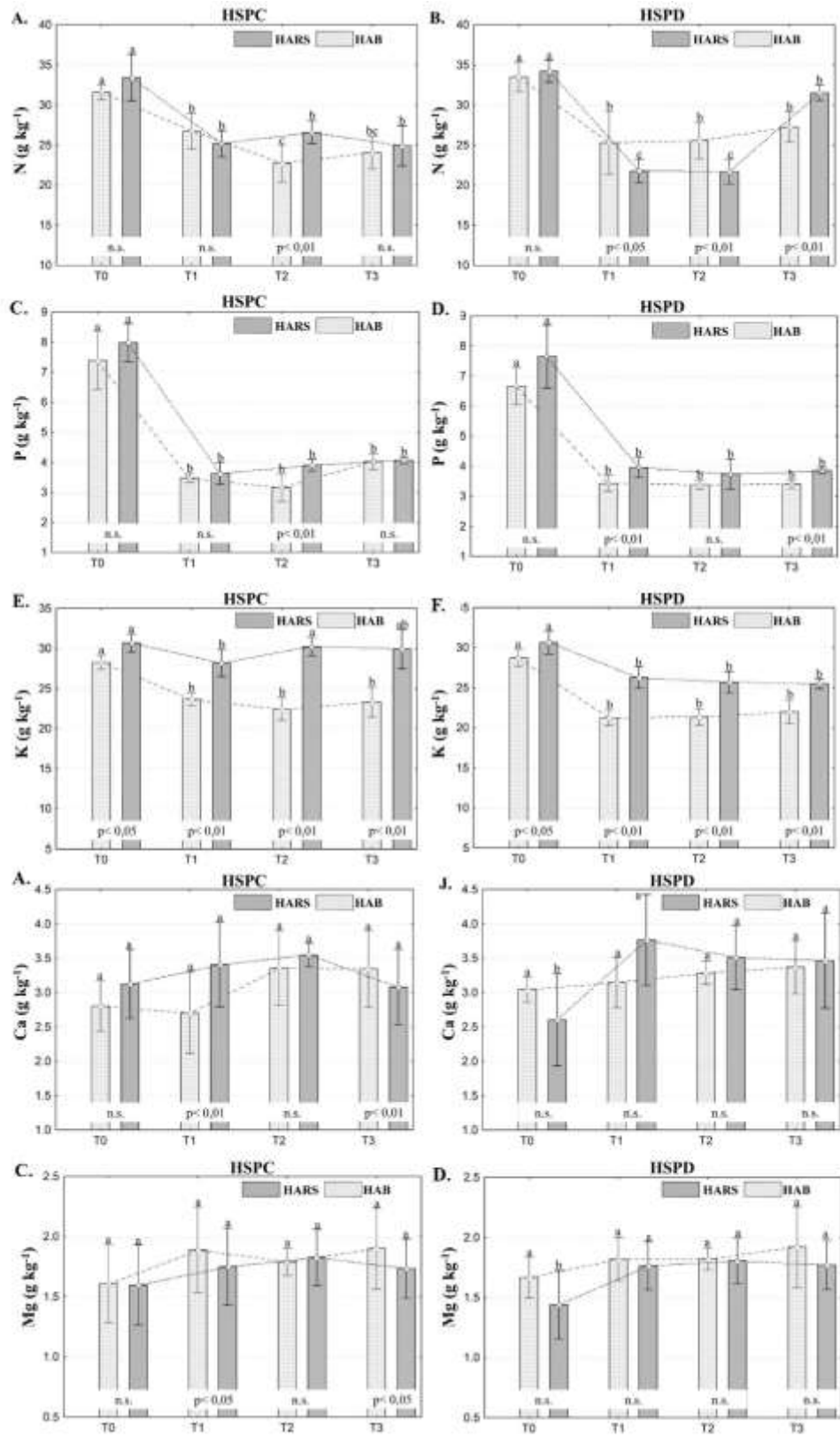
apesar do T0 se sobressair em relação aos demais tratamentos (Figura 2B), o tratamento T3 apresentou resultado mais próximo ao T0, ou seja, mesmo com diminuição em 60% na dose de N, verificou-se uma diminuição média de 7,8% no teor foliar de N. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira et al. (2017) sob redução de 80% na adubação de N, onde as plantas de milho inoculadas com bioinsumos apresentaram rendimentos iguais as plantas totalmente fertilizadas. O trabalho de Nascimento (2020) relata, proporcionalmente, maior absorção de N em uma condição de baixa fertilidade do solo.

Em relação aos teores de P observa-se que os tratamentos T0 apresentaram resultados estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Destaca-se que, em geral, os efeitos do HARS geram valores superiores ao HAB no teor foliar de P (Figura 2 C e D). Quando avaliado o teor foliar de P, verificou-se respostas diferentes às observadas para os teores de N e K (Figura 2). Na condição desse estudo, os bioinsumos mostraram-se indiferentes no aumento da absorção e dos teores foliar de P nas diferentes condições. Na literatura é relatado incrementos do teor foliar de P pelo efeito de solubilização de fosfatos com a utilização de *H. seropedicae* e *A. brasilense* (Breda et al., 2019). De maneira contrária, Nascimento (2017) não relataram efeito dos bioinsumos no aumento dos teores foliares de P na cultura do milho, ou seja, os efeitos biofortificantes auxiliando na aquisição do P depende de outras variáveis como formas de disponibilidade de P no solo, pH do solo, condições hídricas do solo entre outros.

Em geral, os teores foliares de K foram superiores nos tratamentos com HARS (Figura 2E). Os tratamentos T2 e T3 foram estatisticamente iguais ao T0 mesmo com uma redução de 60% na adubação e já para HAB o tratamento T0 foi estatisticamente superior aos demais (Figura 2E). Para o HSPD o tratamento T0 foi estatisticamente superior aos demais, contudo, destaca-se que quando comparado o tratamento T0 HAB com os tratamentos T1, T2 e T3 do HARS (Figura 2F), em média, a diferença de incremento de K foi de apenas 10,5%. Na maior parte dos resultados nutricionais observou-se efeito positivo dos bioinsumos nas diferentes condições de histórico de manejo do solo sob menor disponibilidade hídrica, confirmando a capacidade de modulação dos bioinsumos em promover incremento vegetal e nutrição mineral, mesmo sob uma condição de redução de adubação.

Em termos dos teores de K, as plantas de milho apresentaram maiores valores sob HARS (Figura 2 G e H), sendo atribuído ao fornecimento de nutrientes proporcionado pela ARS (Guidinelle et al. 2023). Destaca-se a capacidade dos de BPCV em melhorar a produção do milho sob condições de maior salinidade (Li & Jiang, 2017). Os solos sob

HARS apresentam maior condutividade elétrica (Tabela 1), principalmente quando sob HSPC.



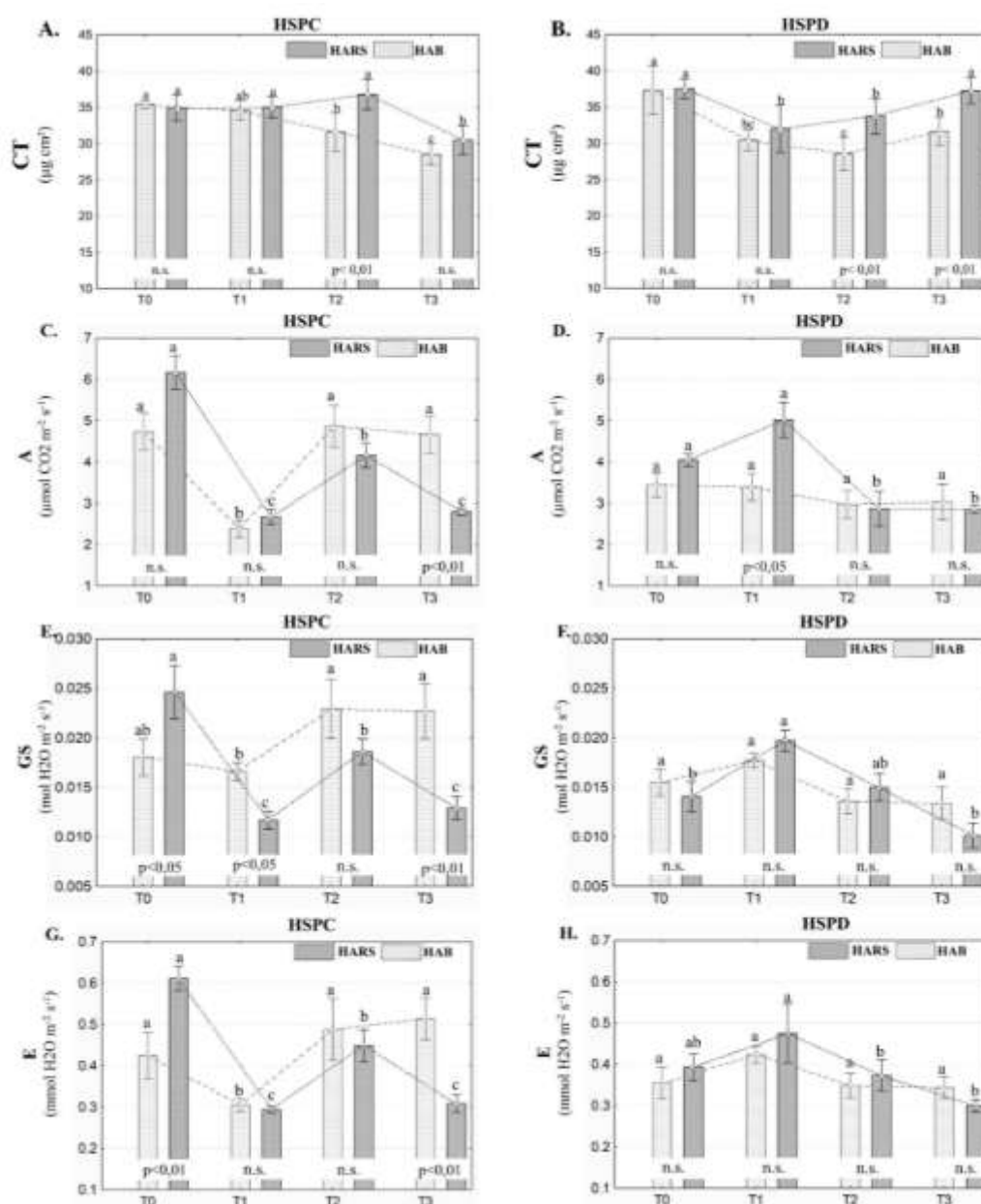
*Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de amostras com histórico irrigação no compo, ao nível de 5% de significância. Os valores de n.s (não significativo), $p < 0,001$ (0,1% de significância), $p < 0,01$ (1% de significância) e $p < 0,05$ (5% de significância) comparam os tipos de água.

Figura 2 – Influência dos bioinsumos, históricos de água de irrigação (HAB – histórico de irrigação com água bruta e HAB – histórico de irrigação com água residurária) e manejo do solo (HSPC – Histórico de sistema plantio convencional, HSPD - Histórico de sistema plantio direto) nos teores foliares do milho crioulo.

Em relação aos teores de Ca e Mg (Figura 2 G, H e I, J), de modo geral não houve diferença entre os tratamentos (T1, T2 e T3). Destacando-se o tratamento T0, apresentou resultados inferiores aos demais tratamentos sob condições de HSPD e HARS, ou seja, mesmo com 100% da dose recomendada para correção da acidez em todos tratamentos, aqueles com bioinsumos promoveram uma maior absorção de Ca e Mg. As doses de Ca e Mg foram as mesmas para todos os tratamentos, demonstrando que existe maior absorção de Ca e Mg para os tratamentos com aplicação de bioinsumos (T1, T2 e T3), como observado para HSPD quando em HARS (Figura 2, H e J). Alguns autores relatam resultados semelhantes, como no trabalho desenvolvido por Araújo et al. (2015), em que foram evidenciados maiores teores de Ca e Mg nos grãos de milho, quando inoculados com *A. brasilense*. No trabalho de Lim et al. (2017), com inoculação de *H. seropedicae*, os autores verificaram acúmulo de Ca e Mg no tecido foliar de plantas de dendezeiro.

Os resultados de CT, no HSPC, independentemente do tipo de irrigação, T1 (40% da adubação) é estatisticamente igual ao T0 (100 % de adubação). Na condição de HSPD e HARS tratamento T3 é estatisticamente igual ao T0. Em geral, os valores de CT sob condições de HARS são superiores estatisticamente ao HAB (Figura 3A e B). Os teores de CT e N se correlacionam positivamente, podendo o teor de N ser estimado a partir dos valores de CT.

De maneira geral, no HSPC para HARS o T0 apresenta maiores valores de A, GS e E (Figuras 3 C, E e G). Em contraste, quando associado ao HSPC, em geral, os resultados para o T1 são superiores aos demais tratamentos. Por outro lado, o T1 apresenta menores valores no HSPC. No HSPD mais o efeito residual da irrigação com HARS, proporcionam incremento de carbono orgânico no solo (Tabela 1). Maior estabilidade da comunidade microbiana inserida e seu aumento populacional têm sido observados em ambientes edáficos que favorecem o aporte de carbono (Wang et al. 2020) com isso, seu efeito bioestimulante e/ou biofertilizante pode ser potencializado.



*Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de amostras com histórico irrigação no compo, ao nível de 5% de significância. Os valores de n.s (não significativo), $p<0,001$ (0,1% de significância), $p<0,01$ (1% de significância) e $p<0,05$ (5% de significância) comparam os tipos de água.

Figura 3 – Influência dos bioinsumos, históricos de água de irrigação (HAB – histórico de irrigação com água bruta e HAB – histórico de irrigação com água residurária) e manejo do solo (HSPC – Histórico de sistema plantio convencional, HSPD - Histórico de sistema plantio direto) na fisiologia do milho crioulo.

3.2 - Estatística Multivariada - Análise de Componentes Principais

A avaliação dos grupos de variáveis inter-relacionadas e sua relação com os tratamentos foi realizada a Análise de Componentes Principais (Tabela 2). Foram avaliados os 4 primeiros fatores que explicaram 87% da variabilidade total dos dados e que apresentaram autovalores maiores que 1 (Hair et al., 2009).

Tabela 2 – Variância explicada, acumulada e autovalores da ACP e correlação ⁽¹⁾ entre atributos morfoagronômicos, teores foliares, atributos fisiológicos e componentes principais

Autovalor	5.37	2.99	1.81	1.16
Variância Total %	41.3	23.0	13.9	9.0
Variância Acumulado %	41.3	64.3	78.2	87.2
Variáveis ⁽²⁾	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
AP	0.19	0.00	<u>0.66</u>	0.66
MSPA	-0.19	-0.23	0.87	-0.18
MSR	0.84	-0.13	0.14	-0.07
N	-0.77	-0.47	-0.04	-0.26
P	-0.93	-0.15	0.01	-0.20
K	-0.74	-0.24	-0.33	0.30
Ca	0.45	<u>0.51</u>	<u>-0.53</u>	0.33
Mg	0.87	0.28	-0.05	-0.04
CT	<u>-0.59</u>	-0.50	-0.33	0.31
A	<u>-0.67</u>	0.73	0.07	0.01
GS	-0.36	0.86	0.14	-0.14
E	-0.49	0.84	0.00	-0.17
A/E	<u>-0.68</u>	0.27	0.24	0.50

⁽¹⁾ Correlações: forte = $\geq 0,7$ e moderada - entre 0,7 e 0,5 (Hair et al, 2009). ⁽²⁾ AP - altura de planta, MSPA - massa seca da parte aérea, MSR - massa seca de raiz, N – teor foliar de nitrogênio, P– teor foliar de fósforo, K– teor foliar de potássio, Ca– teor foliar de cálcio, Mg– teor foliar de magnésio, CT – Clorofila Total; A – taxa de assimilação líquida de CO₂, GS – condutância estomática, E – taxa de transpiração e A/E - Eficiência instantânea no uso da água.

O PC 1 reteve 41,3% da variabilidade total dos dados originais, e as maiores correlações negativas estiveram relacionadas aos atributos N, P e K, para MSR e Mg os valores são positivos (Tabela 2). Ocorreu relação inversa entre MSR e teores de macronutrientes, indicando que o crescimento de raiz não está acompanhando a adubação

realiza. Destaca-se a correlação moderada de CT, A e A/E. Grande parte da variação associado à PC1 está sendo controlada pelos tratamentos, com menor participação do tipo de manejo e irrigação. De forma geral, os escores negativos e associados com PC1 atribui-se ao efeito da adubação com 100% da dose (T0). Escores negativos de PC1 estão associados ao HSPD e HARS, ou seja, existe tendência de maiores nutrientes e maior CT, A e A/E em plantas de milho nesses sistemas. Como o MRS apresenta correlação positiva em PC1, e escores positivos são atribuídos aos T1, T2 e T3, demonstra-se o efeito positivo dos bioinsumos do crescimento de raízes, principalmente sob HSPD e HAB.

O resultado atribuído a MSR está relacionado as alterações fisiológicas provocadas pelos bioinsumos, conforme relatado por Azevedo et al. (2019). Estudo realizado por Barbosa et al. (2021), reunindo 60 trabalhos conduzidos em diferentes regiões do Brasil, evidenciou que a inoculação do milho com *A. brasilense* aumentou, em média, 12,1% a massa seca das raízes, o que pode refletir em maior ganho de massa da parte aérea das plantas. O menor MSR no solo com histórico de sistema plantio convencional (HSPC) (Figura 4A), sugerindo que as plantas estão enfrentando maior estresse. De acordo com Schulz-Bohm et al. (2018), quando as plantas enfrentam situações de estresse, elas tendem a liberar uma quantidade maior de exsudatos no solo, atraindo uma concentração maior microrganismos. Consequentemente, isso resulta em uma maior população microbiana, que pode, por sua vez, gerar efeitos benéficos ampliados para as plantas.

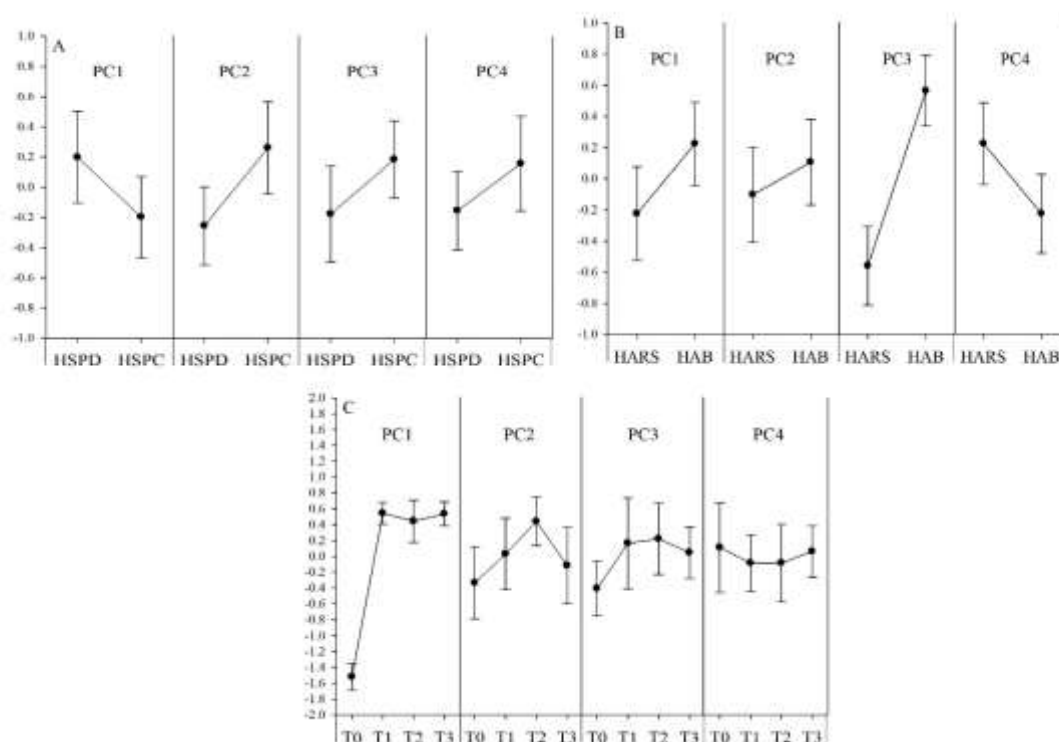


Figura 4 - Representação da média e erro padrão dos escores dos fatores (PC1, PC2, PC3 e PC4), agrupados nos tratamentos, histórico do solo e histórico de irrigação.

O grupo dos atributos A, GS e E tiveram correlações positivas no PC 2 (23,0% da variância explicada) (Tabela 2), associado diretamente a alterações fisiológicas da planta, os quais não apresentaram relação direta com os atributos morfoagronômicos ou nutricionais, com exceção da correlação moderada do Ca em PC2. Observa-se escores positivos atribuídos a HSPC e uma tendência de maiores escores para T2. Dessa forma, esses fatores estão associados as correlações positivas de A, GS e E (forte) e correlação positivas moderada com Ca.

As respostas observadas nos atributos fisiológicos são amplamente influenciadas pelos tratamentos que envolvem bioinsumos biológicos (Figura 4C), revelando melhorias quando o solo está sob o histórico de sistema plantio convencional (HSPC) (Figura 4A). No entanto, de acordo com Yu et al. (2012), em situações consideradas estressantes, a aplicação de bioinsumos microbianos pode não ser bem-sucedida se o ambiente não oferecer as condições mínimas necessárias para a sobrevivência dos microrganismos. Sendo assim, no caso deste estudo, a escassez de água pode ter sido o fator decisivo. Mesmo que HSPD apresente atributos de solo superiores, os bioinsumos microbianos responderam de forma mais eficaz no solo HSPC em relação aos atributos fisiológicos.

O PC 3 (13,9% da variação explicada) e o PC 4 (9,0 % da variação explicada) tiveram menor participação na variação dos dados, com maior destaque para o efeito de tratamentos sob a variância desses fatores. Em PC3, destaca-se MSPA (correlação forte positiva) e AP (correlação moderada positiva) e Ca (correlação moderada negativa) e a forte influência de HAB, ou seja, em sistemas com água residuária e maior restrição hídrica observa-se menor MSPA e maior absorção do Ca. Na produção de MSPA (Figura 1, C e D), observa-se que de modo geral os resultados dos tratamentos com bioinsumos (T1, T2 e T3) são estatisticamente iguais ao T0 com 100% da adubação, resultados corroborados com a análise componentes principais PC2 (Tabela 2, Figura 4C).

Já o PC4, o AP e A/E são de maior contribuição positiva, e fraca associação com HAB e HSPC, ou seja, existe uma tendência de menor eficiência do uso da água e menor crescimento em altura nesses sistemas, sem a influência de tratamentos.

Na maior parte dos resultados observou-se efeito positivo dos bioinsumos nas diferentes condições de histórico de manejo do solo sob baixa disponibilidade hídrica, confirmando a capacidade de modulação dos bioinsumos em promover incremento

vegetal e nutrição mineral, mesmo sob uma condição de redução de adubação. Esses resultados são relevantes do ponto de vista agrônomo, pois com apenas 40% da adubação com NPK os tratamentos T1, T2 e T3 com aplicação de bioinsumos apresentaram respostas similares ao T0, onde foi aplicado 100% da adubação com NPK nas diferentes condições de irrigação.

Os resultados do presente estudo indicam que sob condição de HSPD para HARS a co-inoculação dos bioinsumos (T3) podem proporcionar um maior incremento de N para as plantas de milho crioulo, mesmo em uma condição de menor adubação, podendo ser atribuído a melhor condição biológica e química do solo (Tabela 1). Corroborando com o trabalho de Cortés-Patino et al. (2021), que avaliaram a co-inoculação de *A. brasilense* e *Herbaspirillum* sp. verificando o potencial e a capacidade dos bioinsumos em coexistir possibilitando maior incremento de N foliar. A co-inoculação de bioinsumos tem potencial de modular a severidade da resposta ao estresse, sejam eles hídricos ou de fertilidade (Cortés-Patiño et al., 2022). A co-inoculação é uma estratégia que pode ser utilizada para aumentar a eficácia da inoculação, uma vez que os resultados apontam que as bactérias irão atuar mutuamente na planta, o que promove um melhor desempenho, podendo ser revertido em maior desenvolvimento de planta e absorção de nutrientes.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstraram que, em condições de menor disponibilidade hídrica, os bioinsumos são uma tecnologia promissora na agricultura, com potencial de aumentar a eficiência no uso dos fertilizantes e com viabilidade em substituir parcialmente a demanda de adubação pela cultura do milho crioulo, aumentando a eficiência na produção agrícola e no uso de água na agricultura.

Demonstrando ainda uma tendência positiva em relação a co-inoculação (*Herbaspirillum seropedicae* + Substância Húmicas com *Azospirillum brasilense*) no incremento foliar de Nitrogênio sobretudo em sistemas com histórico de Sistema Plantio Direto irrigado com Água residuária de suinocultura.

Na condição de baixa disponibilidade hídrica do presente estudo os bioinsumos microbianos (*Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*) contribuíram com melhores resultados fisiológicos nos tratamentos com histórico de sistema plantio convencional.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, G. C.; DOS SANTOS, C. L.; ZILLI, J. E.; FABIO, B.; MARRIEL, I. E.; BREDÁ, F. A. D. F.; BODDEY, R. M. Agronomic evaluation of *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE94 as an inoculant to improve maize yield in Brazil. **Pedosphere**, v. 31, n. 4, p. 583-595, 2021.
- ARAÚJO, É. D. O.; MERCANTE, F. M.; VITORINO, A. C. T. Effect of nitrogen fertilization associated with inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* on maize. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 3, p. 137-145, 2015.
- AZEVEDO, I. G.; OLIVARES, F. L.; RAMOS, A. C.; BERTOLAZI, A. A.; CANELLAS, L. P. Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H⁺ flux and gene expression in maize roots seedlings. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2019.
- BARBOSA, J. Z.; HUNGRIA, M.; DA SILVA SENA, J. V.; POGGERE, G.; DOS REIS, A. R.; CORRÊA, R. S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, 2021.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BREDÁ, F. A.; DA SILVA, T. F. R.; DOS SANTOS, S. G.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 4, p. 547-558, 2019.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biol Biochem** 103:117–130, 2016.
- CORTÉS-PATÍÑO, S.; VARGAS, C. D.; ALVAREZ-FLÓREZ, F.; ESTRADA-BONILLA, G. Co-Inoculation of Plant-Growth-Promoting Bacteria Modulates Physiological and Biochemical Responses of Perennial Ryegrass to Water Deficit. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2543, 2022.
- CORTES-PATINO, S.; VARGAS, C.; ÁLVAREZ-FLÓREZ, F.; BONILLA, R.; ESTRADA-BONILLA, G. Potential of *Herbaspirillum* and *Azospirillum* consortium to promote growth of perennial ryegrass under water deficit. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 91, 2021.
- FONSECA, A. F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51:45–52, 2016.
- GIORI, F. G. G.; ALEVS, G.; MOREIRA, L. L. Q.; CHAVES, V. A.; MOREIRA, I. M.; PINTO NETA, L. C.; REIS, V. M. **Inoculação em sementes e via foliar da estirpe ZAE**

94 de *Herbaspirillum seropedicae* em híbrido de milho BRS1010. Embrapa Agrobiologia-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2010.

GUIDINELLE, R. B.; RANGEL, O. J. P.; PASSOS, R. R.; BAPTESTINI, J. C. M.; SOUZA, A. O. Chemical properties of Oxisol cultivated with maize in management systems of soil irrigated with swine production wastewater. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20201940, 2023.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688 p.

JAT, H. S.; CHOUDHARY, M.; DATTA, A.; YADAV, A. K.; MEENA, M. D.; DEVI, R.; SHARMA, P. C. Temporal changes in soil microbial properties and nutrient dynamics under climate smart agriculture practices. **Soil and Tillage Research**, v. 199, p. 104595, 2020.

LI, H. Q.; JIANG, X. W. Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 64, p. 235-241, 2017.

LIM, S. L.; SUBRAMANIAM, S.; ZAMZURI, I.; AMIR, H. G. Growth and biochemical profiling of artificially associated micropropagated oil palm plantlets with *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 173-181, 2018.

MATTEOLI, F. P.; OLIVARES, F. L.; VENANCIO, T. M.; DA ROCHA, L. O.; DA SILVA IRINEU, L. E. S.; CANELLAS, L. P. *Herbaspirillum*. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 493-508.

NASCIMENTO, F. C. do. **Absorção de nitrogênio e fósforo em milho, soja e cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas em diferentes níveis de adubação**. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária. Universidade Estadual Paulista – UNESP Campus de Jaboticabal, 2020.

NASCIMENTO, J. **Avaliação da associação de rizobactérias na cultura do milho**. Trabalho de conclusão de curso (Agronomia), Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul. 2017.

NOVAIS, R. D.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. D. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A.J. et al. **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília, DF: EMBRAPA-SEA, 1991. 392 p.

NUNES, R. D. O.; DOMICIANO, A. G.; DE SOUSA A. W.; APARECIDA, O. J.; CESAR, S. N. F.; CANELLAS, L. P.; SOARES, M. R. Quantitative proteomic analysis reveals altered enzyme expression profile in *Zea mays* roots during the early stages of colonization by *Herbaspirillum seropedicae*. **Proteomics**, v. 21, n. 7-8, p. 2000129, 2021.

OLIVEIRA, A. L.; SANTOS, O. J.; MARCELINO, P. R.; MILANI, K. M.; ZULUAGA, M. Y.; ZUCARELI, C.; GONÇALVES, L. S. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate

results in high productivity under low N fertilizer input. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1873, 2017.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2016.

ROJAS-TAPIAS, D.; MORENO-GALVÁN, A.; PARDO-DÍAZ, S.; OBANDO, M.; RIVERA, D.; BONILLA, R. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 264-272, 2012.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 2021.

SCHULZ-BOHM, K.; GERARDS, S.; HUNDSCHIED, M.; MELENHORST, J.; DE BOER, W.; GARBEVA, P. Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles. **The ISME Journal**, v. 12, n. 5, p. 1252-1262, 2018.

SILVA, F. C. DA SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

SKONIESKI, F. R.; VIÉGAS, J.; MARTIN, T. N.; MINGOTTI, C. C. A.; NAETZOLD, S.; TONIN, T. J.; MEINERZ, G. R. Effect of nitrogen topdressing fertilization and inoculation of seeds with *Azospirillum brasilense* on maize yield and agronomic characteristics. **Agronomy**, v. 9, n. 12, p. 812, 2019.

THIENGO, C. C.; DE OLIVEIRA, D. M.; BERNARDES, J. V. S.; DA ROCHA, L. O.; DE SA MENDONÇA, E.; OLIVARES, F. L.; BURAK, D. L. Bio-inputs promoting marandu grass growth: Productivity, physiological response and nitrogen accumulation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 17, n. 5, p. 423-430, 2023.

YU, X.; LIU, X.; ZHU, T. H.; LIU, G. H.; MAO, C. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 112-117, 2012.

CAPÍTULO 3 - CO-INOCULAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* COM *Azospirillum brasilense* EM MILHO IRRIGADO COM ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA SOB SISTEMA PLANTIO DIRETO

RESUMO

Em um contexto de produção agrícola em agroecossistemas, a utilização de bioinsumos microbianos é favorecida devido aos melhores índices biológicos do solo, em comparação com os sistemas de cultivo convencionais. Quando em co-inoculação os microrganismos geralmente demonstram resultados superiores, graças à sua atuação em uma variedade de mecanismos distintos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da co-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense* em diferentes condições de manejo do solo, sob diferentes lâminas de irrigação com água residuária de suinocultura (ARS), no crescimento de milho destinado à produção de silagem. Foram avaliados a co-inoculação com 70% da adubação NPK e, tratamentos sem aplicação de bioinsumos microbianos com 100% da adubação NPK, aplicando-se cinco lâminas irrigação com ARS (50%, 75%, 100%, 125% e 150% da evapotranspiração ETc), conduzidos em uma área sob sistema plantio direto (SPD), comparando com duas testemunhas adicionais, irrigadas com água bruta com 100% da ETc, conduzidos sob sistema plantio convencional SPC, a testemunha 1 foi conduzida sem a aplicação de bioinsumos microbianos com 100% da adubação NPK, a testemunha 2 avaliou a co-inoculação com 70% da adubação NPK. Os resultados demonstram que sob um solo com qualidade biológica melhor a co-inoculação apresenta melhores resultados. Sob menor disponibilidade de nutrientes a co-inoculação apresentou melhores resultados para altura de planta, diâmetro do colmo, nitrogênio foliar, índice SPAD, taxa de assimilação líquida de CO₂ e taxa de transpiração. Sugerindo um sinergismo positivo entre a co-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* com *Azospirillum brasilense* sob sistema plantio direto irrigado água residuária de suinocultura.

Palavras chave: Inoculantes microbianos, Manejo do solo, Produção de milho, Atributos fisiológicos, Nutrição Mineral.

CO-INOCULATION OF *Herbaspirillum seropedicae* WITH *Azospirillum brasilense* IN MAIZE IRRIGATED WITH SWINE WASTEWATER UNDER NO-TILL PLANTING SYSTEM

ABSTRACT

In a context of agricultural production in agroecosystems, the use of microbial inputs is favored due to the better biological indexes of the soil, compared to conventional cultivation systems. When co-inoculated, microorganisms generally demonstrate superior results, thanks to their action in a variety of different mechanisms. Therefore, the objective of this study is to evaluate, in a field experiment, the impact of co-inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense* in different soil management conditions, under different irrigation depths with swine wastewater (ARS), on growth of maize intended for silage production. Co-inoculation with 70% of NPK fertilizer and treatments without application of microbial inputs with 100% of NPK fertilizer were evaluated, applying five irrigation depths with ARS (50%, 75%, 100%, 125% and 150% of evapotranspiration ET_c), conducted in an area under no-tillage system (SPD), compared with two additional controls, irrigated with raw water with 100% of ET_c, conducted under conventional planting system SPC, control 1 was conducted without the application of inputs microorganisms with 100% NPK fertilization, control 2 evaluated co-inoculation with 70% NPK fertilization. The results demonstrate that under soil with better biological quality, co-inoculation presents better results. Under lower nutrient availability, co-inoculation showed better results for plant height, stem diameter, leaf nitrogen, SPAD index, net CO₂ assimilation rate and transpiration rate. Suggesting a positive synergism between the co-inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* with *Azospirillum brasilense* under a direct planting system irrigated with swine wastewater.

Keyword: Microbial inoculants, Soil management, Maize Production, Physiological characteristics, Mineral nutrition.

1. INTRODUÇÃO

Tecnologias agrícolas sustentáveis tem sido amplamente estudada em função da necessidade de uma agricultura eficiente, ecologicamente correta e alinhadas com preceitos da sustentabilidade. Menor degradação do solo, diminuição das emissões de CO₂, manutenção do carbono orgânico no solo, diminuição da dependência de fertilizantes químicos, ciclagem de nutrientes e reaproveitamento de resíduos são desafios constantemente colocados que necessitam ser estudados para os mais diferentes tipos de arranjos produtivos, tipos de manejo e culturas (Stella et al., 2019; Qaim, 2020; Ofori et al., 2021). Conciliar a segurança alimentar e funções ambientais e ecológicas do solo torna-se mais desafiador em meio as condições climáticas adversas (Kelbessa et al., 2023).

O Brasil se destaca como pioneiro na utilização da interação entre microrganismos-plantas, sendo reconhecido internacionalmente na adoção dessa tecnologia como uma alternativa à fertilização química tradicional (Peoples et al., 2021). Os inoculantes microbianos desempenham serviços essenciais nos agroecossistemas, aumentando os rendimentos das culturas diminuindo a utilização de insumos industriais, promovendo benefícios econômicos e ambientais (Hungria e Mendes, 2015; Shahwar et al., 2023).

Existem numerosos inoculantes microbianos com potencial aplicação na agricultura, agindo por meio de uma variedade de mecanismos e em diversas culturas (Kumar et al., 2022). A combinação desses inoculantes microbianos está se revelando cada vez mais promissora, possibilitando um incremento na produção em comparação com estudos individuais, uma vez que agem de maneira simultânea por meio de diferentes mecanismos nas plantas (Mukherjee et al., 2022; Verma et al., 2023).

Dentre os bioinsumos microbianos temos o *Azospirillum brasilense* (Ardakani et al., 2011; Cassán et al., 2014) e *Herbaspirillum seropedicae* (Brusamarello-Santos et al., 2017; Nunes et al., 2021), que promovem resultados positivos no desenvolvimento vegetal graças a uma variedade de mecanismos distintos. Quando co-inoculados, esses bioinsumos microbianos tendem a apresentar sinergismo e potencializar seus resultados (Cândido et al., 2020), muito em função das suas especificidades. Quando co-inoculados os autores Cortés-Patiño et al. (2021) observaram incremento da produção de biomassa vegetal de parte aérea e produção de compostos indólicos, Dartora et al. (2013) melhor desenvolvimento da cultura do milho e maior produtividade de grãos, Dartora et al. (2016) aumento de o teor foliar de P em milho.

Entretanto em função do tipo de ambiente e de manejo adotado o sinergismo entre inoculante microbianos pode não ocorrer (Yu et al., 2012). Dada a complexidade de definir os mecanismos de ação dos inoculantes microbianos e avaliá-los em uma ampla variedade de tipos de solo (O'Callaghan et al., 2022), até mesmo diferentes regimes de irrigação podem influenciar os resultados dos inoculantes microbianos (Harris et al., 2021). Em geral, solos com melhores características químicas e físicas, de base conservacionista, tendem a promover uma maior colonização e persistência microbiana e, conseqüentemente, resultados mais favoráveis (Thilakarathna & Raizada, 2017). Contudo, a própria diversidade nativa de microrganismo que contém em um determinado solo pode afetar o sucesso dos inoculantes microbianos, que serão inseridos naquele sistema em função da adaptabilidade (Mallon et al., 2018).

Nesse contexto, é importante promover a realização de pesquisas de campo para uma melhor compreensão desses mecanismos, especialmente em regiões caracterizadas pela diversidade de práticas agrícolas, como é o caso do Brasil, um país de clima tropical. No Brasil, encontramos sistemas conservacionistas, como o plantio direto, que desempenham um papel fundamental na redução dos efeitos da degradação do solo e na progressiva melhoria de sua qualidade ao longo do tempo (Zhao et al., 2019; Jiang et al., 2019). No entanto, ainda persistem práticas convencionais de cultivo que contribuem para a degradação do solo e para a emissão de gases de efeito estufa (Costa et al., 2020; Ramos et al., 2022). Adicionalmente, é amplamente adotada a reutilização de resíduos, como, por exemplo, a água residuária da suinocultura, que possui elevada carga orgânica e teor de nutrientes (Cunha et al., 2021; Guidinelle et al., 2023), apresentando um grande potencial para ser utilizada na irrigação de diversas culturas, desde que sejam seguidas as regulamentações pertinentes.

Gerar tecnologias que permitam o uso conjunto de bioinsumos (microrganismos eficientes), água residuária de suinocultura e sistema plantio direto torna a agricultura menos dependente do uso das águas de abastecimento humano e industrial, bem como menos dependente de fertilizantes.

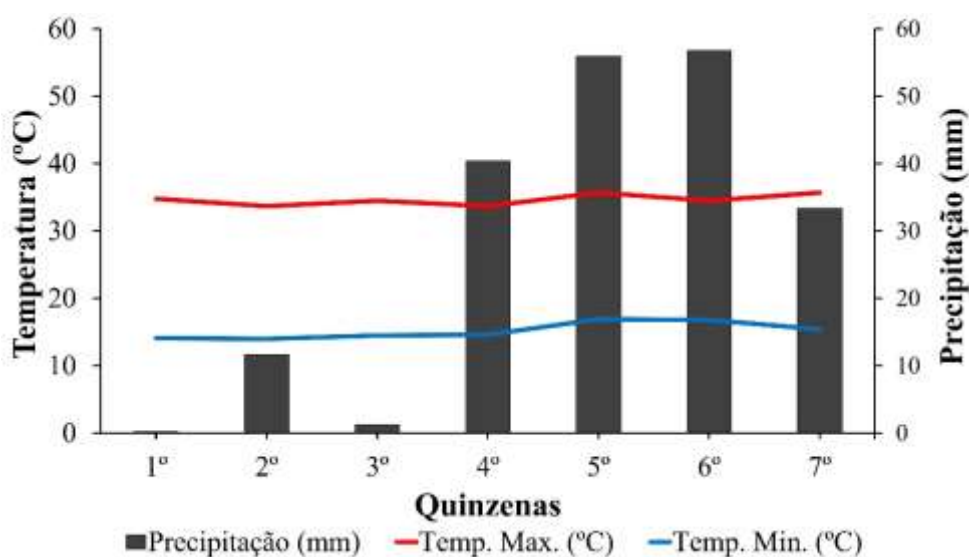
Diante do exposto e objetivando entender as relações solo-microrganismo-planta, avaliou-se em condição de campo o efeito da co-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* (cepa HRC54) com *Azospirillum brasilense* (cepas Ab-V5=CNPSO 2083 e Ab-V6=CNPSO 2084), em diferentes condições de manejo do solo, sistema plantio direto e sistema plantio convencional, sob diferentes lâminas de irrigação com água residuária

de suinocultura e água bruta o desenvolvimento do milho (Milho crioulo variedade fortaleza) para produção de silagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Histórico e caracterização da área experimental

A área experimental na qual o experimento foi conduzido, localiza-se no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes) - Campus de Alegre, no município de Alegre, sul do estado do Espírito Santo (20° 45' 48" Sul, 41° 27' 28" Oeste), com altitude de 110 metros do nível do mar. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo “Cwa”, ou seja, tropical quente úmido, inverno frio e seco, com temperatura média anual de 23,1 °C e precipitação média anual de 1341 mm. A Figura 1 retrata o histórico de chuvas e temperaturas máximas e mínimas durante o período de condução do experimento.



*Dados referente a precipitação foram coletados com auxílio de um pluviômetro, acoplado ao equipamento irrigâmetro instalado próximo ao local de condução do experimento; os dados referentes a temperatura máximas e mínimas foram obtidos da estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática, Alegre-A617, localizada no município de Alegre na área experimental do CCAE-UFES (INMET, 2023). Os dados foram coletados no dia 1º de agosto de 2022 até o dia 07 de novembro de 2022.

Figura 1 - Precipitação e temperaturas mínimas e máximas observadas durante a condução do experimento.

A área de estudo é uma unidade experimental permanente na qual avalia-se a dinâmica da matéria orgânica e nutrientes a longo prazo sob o efeito de dois modelos de manejo sustentáveis: plantio direto e uso de água residuária de suinocultura. As parcelas fixas foram implantadas no início de 2017, onde foram conduzidos quatro ciclos consecutivos de cultivo de milho (*Zea mays* L.) em dois sistemas de manejo do solo: um sistema plantio direto com 4 anos de implantação (SPD) e um sistema plantio convencional (SPC) com mais de 30 anos de cultivo intensivo; associados ao uso da água residuária de suinocultura (ARS) na irrigação da cultura do milho, comparado com água bruta (AB) (suprindo 100% da demanda hídrica da cultura).

2.2 - Delineamento experimental

O experimento consistiu em um arranjo 2x5+2, com três repetições. No primeiro fator foi estudado a eficiência de bioinsumos microbianos no crescimento do milho, no qual, aplicou-se *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54) + Substâncias Húmicas como veículo (SH) com *Azospirillum brasilense* (estirpes CNPSO 2083=Ab-V5 e CNPSO 2084=Ab-V6) com 70% da adubação NPK (N, P₂O₅ e K₂O) (co-inoculação), comparando com tratamentos sem aplicação de bioinsumos microbianos com 100% da adubação NPK (100%NPK) recomendado para a cultura do milho (Prezoti et al., 2007). No segundo fator avaliou-se o efeito da irrigação com água residuária de suinocultura (ARS) aplicando-se cinco lâminas 50%, 75%, 100%, 125% e 150% da evapotranspiração (ET_c), da cultura do milho, conduzidos na área sob SPD.

Com efeito de comparação instalou-se duas testemunhas adicionais, conduzidas sob manejo de irrigação com água bruta com 100% da evapotranspiração (ET_c), da cultura do milho, o manejo do solo foi o sistema plantio convencional SPC. A testemunha 1 foi conduzida sem a aplicação de bioinsumos microbianos com 100% da adubação NPK (SPC+100%NPK), a testemunha 2 avaliou-se a co-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54) + Substâncias Húmicas como veículo (SH) com *Azospirillum brasilense* (estirpes CNPSO 2083=Ab-V5 e CNPSO 2084=Ab-V6) com 70% da adubação NPK (N, P₂O₅ e K₂O) (SPC+ co-inoculação).

2.3 - Preparo do solo e manejo de irrigação

Antes do plantio do milho, no período de pousio do solo, iniciou-se o manejo do solo sob SPD com o plantio da mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*), com intuito de produção de matéria seca para o plantio sob a palhada. Não houve adubação da leguminosa com o intuito dela se beneficiar somente da fertilidade presente no solo. Quando a mucuna-preta atingiu o estágio de florescimento, 4 meses após o plantio, foi realizado o corte, com deposição dos resíduos sobre o solo. Duas semanas após o corte da mucuna-preta efetuou-se o plantio do milho no SPD sobre os resíduos culturais. Nas parcelas testemunha sob o SPC, realizou-se o revolvimento do solo com aração e gradagem antes do plantio do milho.

Coletou-se amostras de solo na área experimental antes da implantação do experimento para caracterização dos atributos químicos e biológicos do solo, as amostras foram armazenadas e mantidas em câmara fria $\pm 4^{\circ}\text{C}$, avaliou-se: β -glucosidase ($\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (β -B) (Eivazi e Tabatabai, 1988), desidrogenase ($\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ solo}$) (DSN) (Casida et al., 1964), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), carbono da biomassa microbiana (CBM) (Brookes et al., 1982; Sparling e West, 1988; Islam e Weil, 2000), carbono orgânico total do solo (COT) e carbono extraído com sulfato de potássio (C-solúvel) (Yeomans e Bremner, 1988; Silveira et al., 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 – Atributos biológicos do solo antes da implantação do estudo

Atributos		Testemunha	Lâminas de irrigação de ARS				
			50%	75%	100%	125%	150%
COT	g kg^{-1}	10,9	15,4	15,6	14,2	16,1	15,9
C-solúvel	mg kg^{-1}	8,0	20,8	21,2	22,0	21,6	22,5
CBM	mg kg^{-1}	469,0	484,5	488,7	484,3	498,0	513,3
NBM	mg kg^{-1}	34,5	70,9	71,5	75,7	79,2	83,9
β -G ⁽¹⁾		68,4	85,4	81,4	82,9	90,8	93,9
DSN ⁽²⁾		114,3	139,2	137,9	138,2	141,7	141,1

COT: Carbono Orgânico Total; C-solúvel: Carbono solúvel; NBM: Nitrogênio da Biomassa Microbiana; CBM: Carbono da Biomassa Microbiana; β -G: Enzima β -Glucosidase ; DSN; Enzima Desidrogenase ⁽¹⁾ $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ⁽²⁾ ($\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ solo}$).

O manejo da irrigação foi realizado utilizando a tecnologia do irrigâmetro (Oliveira & Ramos, 2008), instalado próximo à área experimental. As leituras da evapotranspiração

foram realizadas a cada 24h, avaliando-se assim a necessidade de irrigação diária em cada fase de desenvolvimento da cultura.

A irrigação foi realizada com ARS proveniente do processo de digestão anaeróbia, que ocorre no biodigestor instalado no setor de suinocultura do Ifes-Campus de Alegre. Durante o período de condução do experimento foram aplicados 558,7 m³ ha⁻¹, 838,1 m³ ha⁻¹, 1117,8 m³ ha⁻¹, 1396,8 m³ ha⁻¹ e 1676,2 m³ ha⁻¹ nas respectivas lâminas de irrigação, 50%, 75%, 100%, 125% e 150%. O sistema de irrigação empregado foi o de aspersão convencional, integrado ao um conjunto motobomba que era responsável por bombear a ARS para a área experimental. Antes da implantação do experimento, foi realizado a caracterização química da ARS (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização química da água residuária de suinocultura utilizada na irrigação da cultura do milho

pH	Fe	Na	Zn	Cu	P	K	Ca	Mg	B*	Mn	NO ₃	NH ₃	CE
-	----- mg L ⁻¹ -----												μS/cm
8,09	0,33	20,0	0,08	0,07	52,0	140,0	8,90	12,0	<0,1	0,08	1,0	338,7	3130,0

CE – Condutividade Elétrica. * <Limite de quantificação.

2.4 - Implantação e condução do experimento

Os microrganismos utilizados neste estudo são bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), especificamente o *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54) e o *Azospirillum brasilense* (estirpes CNPSO 2083=Ab-V5 e CNPSO 2084=Ab-V6). Essas bactérias foram selecionadas com base em um experimento prévio realizado em casa de vegetação, o qual verificou que a co-inoculação resulta em um efeito sinérgico, incrementado significativamente a produção de milho.

O *A. brasilense* (estirpes CNPSO 2083=Ab-V5 e CNPSO 2084=Ab-V6) foi adquirido por inoculante comercial com de 2 x 10¹¹ Unidade Formadora de Colônias (UFC) L⁻¹ no produto, sendo aplicado e homogeneizado 100 mL para cada 60.000 sementes de milho. O *H. seropedicae* (estirpe HRC54) foi adquirido da coleção da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. A multiplicação do *H. seropedicae* foi efetuada de acordo com o método de Döbereiner et al. (1995), realizando-se a diluição das bactérias em SH (Canellas et al. 2012) a fim de obter 40 mg L⁻¹ de C das SH e 108 células mL⁻¹. O teor de C das SH foi obtido de acordo com o método de

Yeomans e Bremner (1988). As SH foram extraídas em água, em uma proporção de 1:10 (Thiengo et al, 2023).

As sementes de milho são da variedade crioula Fortaleza provenientes de um produtor familiar da região, as sementes foram desinfestadas evitando eventuais contaminações (Hungria et al., 2010). O plantio foi realizado no dia 1º de agosto de 2022, antes do plantio as sementes foram inoculadas com *A. brasilense* e foram dispostas ao ar em um local fresco por 15 minutos para secar. O plantio foi no espaçamento de 0,8 x 0,2 m, utilizando semeadora-adubadora para plantio direto com 5 cm de profundidade de deposição das sementes, estabelecendo-se um estande de 5 plantas por metro linear. Inicialmente realizou-se desinfecção da plantadeira e, logo após, efetuou-se o plantio nas parcelas que não receberam a aplicação do *A. brasilense*, posteriormente ao plantio, realizou-se novamente a desinfecção da plantadeira (Morais et al., 2015), iniciando o plantio nos tratamentos com aplicação do *A. brasilense*. Cada parcela foi constituída por 6 linhas de plantio com 10 metros de comprimento.

A adubação para o tratamento com 100% da adubação sem os inoculantes microbiano foi, para o plantio, 15 kg ha⁻¹ de ureia, 145 kg ha⁻¹ de superfosfato simples e 32 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio, a primeira adubação de cobertura foi de 145 kg ha⁻¹ de ureia e 32 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio, a segunda adubação de cobertura foi de 145 kg ha⁻¹ de ureia, para o tratamento com co-inoculação, utilizou-se 70% da adubação recomendada (Prezotti et al., 2007). Antes do plantio realizou-se a calagem do solo. Para o controle de ervas daninhas foi realizado capinas manuais e roçadas semi-mecanizadas; não houve aplicação de agrotóxicos em nenhum momento da condução do experimento.

A aplicação do *H. seropedicae* + SH foi realizada via foliar, em dois estádios de desenvolvimento das plantas, com 4 e 8 folhas totalmente expandidas (Giori et al., 2010), aplicando de forma uniforme um volume de calda suficiente para recobrir totalmente a superfície das folhas. Ao final do processo obteve-se co-inoculação dos microrganismos com aplicação na mesma planta de *H. seropedicae* + *A. brasilense*.

2.5 - Coleta e análise dos dados

Para as avaliações dos atributos morfoagronômicas, foram consideradas duas linhas de plantio como bordadura, coletando seis plantas nas quatro linhas centrais de plantio em cada parcela. A colheita ocorreu no dia 05 de novembro de 2022, aos 91 dias após a germinação, quando as espigas de milho apresentaram características adequadas para

silagem, com grãos no estágio pré-farináceo. Os atributos avaliados foram: altura de plantas (AP), diâmetro do colmo (DC), massa seca da espiga (MSE) e massa seca da planta (MSP).

As folhas para realização das análises químicas foram amostradas de acordo com a recomendação de Malavolta et al. (1997), na área útil de cada parcela. Nas amostras de folhas foram avaliados os teores de N, K, P, Ca, Mg, Cu e Zn seguindo a metodologia descrita por Silva (2009), assistido por forno de micro-ondas para digestão foliar utilizando-se ácido nítrico. A análise do teor de N seguiu a metodologia de Galvani e Gaertner (2006).

Avaliou-se medições de trocas gasosas em folhas totalmente expandidas por meio do analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo LI 6400 XT *Portable Photosynthesis System* (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em $1000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos. As medições foram realizadas entre 7:30 e 11:30 horas obtendo-se as seguintes variáveis: A – taxa de assimilação líquida de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E – taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); gs – condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Calculou-se também a eficiência instantânea no uso da água (EUA) $(A/E) [(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) / (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})]$ (Konrad et al., 2005).

Avaliou-se o teor relativo de clorofila das folhas, por meio do índice SPAD, utilizando o aparelho SPAD-502-PLUS, no horário de 08 às 11hs, com leituras em três pontos na face adaxial de cada folha, obtendo-se uma média. Também foram realizadas análises de fisiologia da folha com Fluorômetro Multiplex® (Force-A, França) com múltiplas fontes de excitação de luz (ultravioleta, azul, verde e vermelho), permitindo estimar os índices relacionados ao teor de metabólitos secundários e balanço nitrogênio (Rossato et al., 2012). Obtendo-se assim, os índices de vários compostos, como o balanço de nitrogênio (NBI-R e NBI-G), antocianina (ANT-RG e ANT-RB) e flavonoides (FLAV). Essas foram mensuradas no horário de 08 às 11hs, onde o equipamento foi apontado para a folha totalmente expandida. Os índices obtidos pelo Multiplex®, são derivados das diferentes combinações de comprimentos de ondas emitidos pelo fluorômetro. Os índices com a letra G são obtidos com a luz verde, índices com a letra B pela luz azul e os índices com a letra R pela luz vermelha.

2.6 - Análise estatística

O experimento foi implantado no esquema em faixas com dois fatores, devido às complicações de ordem técnica e operacional na instalação e casualização do sistema de irrigação. Os princípios estatísticos do experimento seguiram as recomendações descritas por Duarte (1996). Na análise de variância avaliou-se a significância da interação entre lâminas de irrigação com ARS (50%, 75%, 200%, 125% e 150% ETc) e aplicação de bioinsumos (co-inoculação e 100%NPK), bem como os efeitos isolados dos mesmos fatores. Nos casos de significância da interação, realizou-se o estudo do desdobramento das lâminas de irrigação, dentro da aplicação de bioinsumos, por meio da análise de regressão. A escolha do modelo estatístico de melhor ajuste foi baseada no grau de significância da regressão e no coeficiente de determinação de cada modelo com ajuste significativo. A avaliação da influência dos bioinsumos (co-inoculação e 100%NPK), dentro de cada lâmina de irrigação, foi realizada pelo teste Tukey a 5% de significância. Para comparar as testemunhas adicionais (Testemunha 1 SPC+100%NPK – e Testemunha 2 SPC+co-inoculação) com os demais tratamentos comuns foi utilizado o teste Dunnett a 5% de significância. Os procedimentos estatísticos foram realizados por meio dos softwares Open Source R (R Core Team, 2016) utilizando-se os pacotes ‘*agricolae*’ (Mendiburu, 2023) e ‘*Trataento.ad.*’ (Azevedo, 2022).

Foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP) (Hair et al., 2009), a partir da matriz de correlação das variáveis, obtendo-se os autovalores, autovetores e grupos de variáveis inter-relacionadas. Foram selecionados os Componentes com autovalor maior que 1 (Hair et al., 2009). Os escores foram avaliados por meio de média e erro padrão. Os procedimentos estatísticos foram realizados por meio dos softwares Open Source R (R Core Team, 2016) utilizando-se os pacotes ‘*DescTools*’ (Signorell et al., 2021) e ‘*Psych*’ (Revelle, 2022).

3. RESULTADOS

Nas Tabelas 3 e 4 são exibidos os resumos estatísticos para os atributos avaliados. Os resultados indicam que a irrigação (I) teve um impacto significativo nos atributos morfoagronômicas e nos teores foliares. Por outro lado, os bioinsumos microbianos (B) em sua maioria não mostraram diferenças significativas entre os tratamento co-inoculação (*Herbaspirillum seropedicae* + *Azospirillum brasilense*) com 100%NPK. Não foi encontrada nenhuma interação significativa entre as fontes de variação (I*B) em relação aos atributos morfoagronômicas e aos teores foliares. Ao se comparar as testemunhas

adicionais (SPC+100%NPK e SPC+co-inoculação) com os tratamentos comuns, observou-se que houve diferenças significativas para todos os atributos morfoagronômicas e nos teores foliares.

Tabela 3 – Resumo ANOVA (p-value) e valores referentes a aplicação dos bioinsumos para os atributos de desenvolvimento vegetativo e nutrição mineral

FV	AP	DC	MSE	MSPA	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn
	----- P-Valor -----										
I	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,072	0,102	0,000	0,032
B	0,006	0,000	0,111	0,693	0,019	0,204	0,022	0,495	0,885	0,210	0,186
I*B	0,058	0,438	0,400	0,903	0,727	0,419	0,106	0,466	0,254	0,490	0,873
Test.	0,764	0,225	0,006	0,311	0,026	0,211	0,478	0,121	0,302	0,615	0,118
Test. Vs Trat	0,000	0,951	0,029	0,000	0,087	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Bloco	0,341	0,072	0,229	0,069	0,829	0,415	0,101	0,597	0,480	0,061	0,765
CV %	5,70	8,68	5,67	7,21	7,31	12,84	4,49	6,43	13,38	6,86	5,67
Co-inocul.	3,29 a	21,8 a	191 a	403 a	30,7 a	6,17 a	25,31 b	2,9 a	3,17 a	12,6 a	29,0 a
100%NPK	3,20 b	20,5 b	184 a	408 a	28,7 b	5,81 a	26,3 a	2,58 a	3,15 a	13,0 a	29,7 a

I – Irrigação, B - Tratamentos com bioinsumos microbianos. AP- altura de planta, DC – diâmetro do colmo, MSE – massa seca espiga, MSPA – Massa seca parte aérea, N – teor foliar de nitrogênio, P– teor foliar de fósforo, K– teor foliar de potássio, Ca– teor foliar de cálcio, Mg– teor foliar de magnésio, Cu - teor foliar de cobre, Zn - teor foliar de zinco.

Ao analisar a Tabela 4 com o resumo da anova para os atributos fisiológicos, observa-se que para as trocas gasosas A, gs, E, e A/E, houve maiores efeitos significativos para as fontes de variação irrigação (I) e bioinsumos microbianos (B), quando os resultados eram significativos para a fonte de variação B, a aplicação do tratamento co-inoculação era superior ao 100% NPK. Basicamente não houve interação significativa entre I*B. Para a variáveis relacionadas aos metabólitos secundários antocianina (ANT-RG e ANT-RB) e flavonoides (FLAV) e, balanço de nitrogênio (NBI-R e NBI-G) não houve efeitos significativos para as fontes de variação irrigação (I) e bioinsumos microbianos (B), apresentando interação significativa I*B para NBI-G e NBI-R. Ao comparar as testemunhas adicionais com os tratamentos comuns, observou-se que houve diferenças significativas em praticamente todos os atributos fisiológicos.

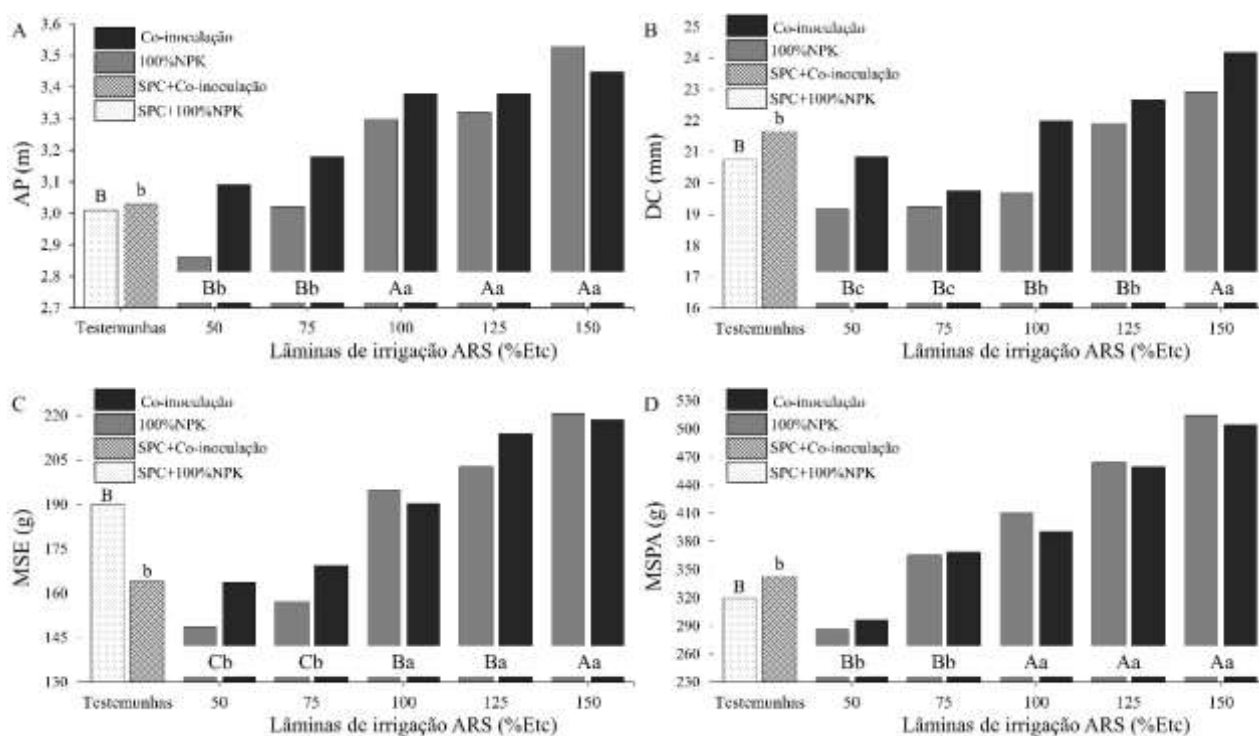
Tabela 4 – Resumo ANOVA (p-value) e valores referentes a aplicação dos bioinsumos para os atributos fisiológicos

FV	SPAD	A	E	A/E	FLAV	ANTH- RG	ANTH- RB	NBI-G	NBI-R
----- p-Valor -----									
I	0,000	0,000	0,000	0,012	0,153	0,842	0,202	0,401	0,640
B	0,000	0,001	0,042	0,965	0,131	0,350	0,773	0,359	0,081
I*B	0,377	0,184	0,154	0,407	0,090	0,496	0,206	0,023	0,007
Test.	0,000	0,759	0,619	0,704	0,000	0,001	0,040	0,003	0,000
Test. Vs Trat	0,000	0,338	0,001	0,000	0,000	0,151	0,592	0,000	0,000
Bloco	0,000	0,916	0,187	0,119	0,872	0,959	0,238	0,727	0,439
CV %	1,24	8,06	14,96	16,55	28,36	-187,61	-6,56	24,95	24,16
co-inoculação	60,7 a	33,1 a	4,52 a	7,60 a	0,36 a	-0,03 a	-0,52 a	2,00 a	1,53 a
100%NPK	57,8 b	29,6 b	4,04 b	7,62 a	0,32 a	-0,02 a	-0,52 a	2,12 a	1,70 a

I – Irrigação, B - Tratamentos com bioinsumos microbianos. A – taxa de assimilação líquida de CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); gs – condutância estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹); E – taxa de transpiração (mmol H₂O m⁻² s⁻¹); A/E - eficiência instantânea no uso da água (EUA) (A/E) [(μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) / (mmol H₂O m⁻² s⁻¹)]. Índices médios de flavonóides (FLAV), antocianina (ANT-RG e ANT-RB), balanço de nitrogênio (NBI-G e NBI-R).

3.1 - Atributos morfoagronômicos

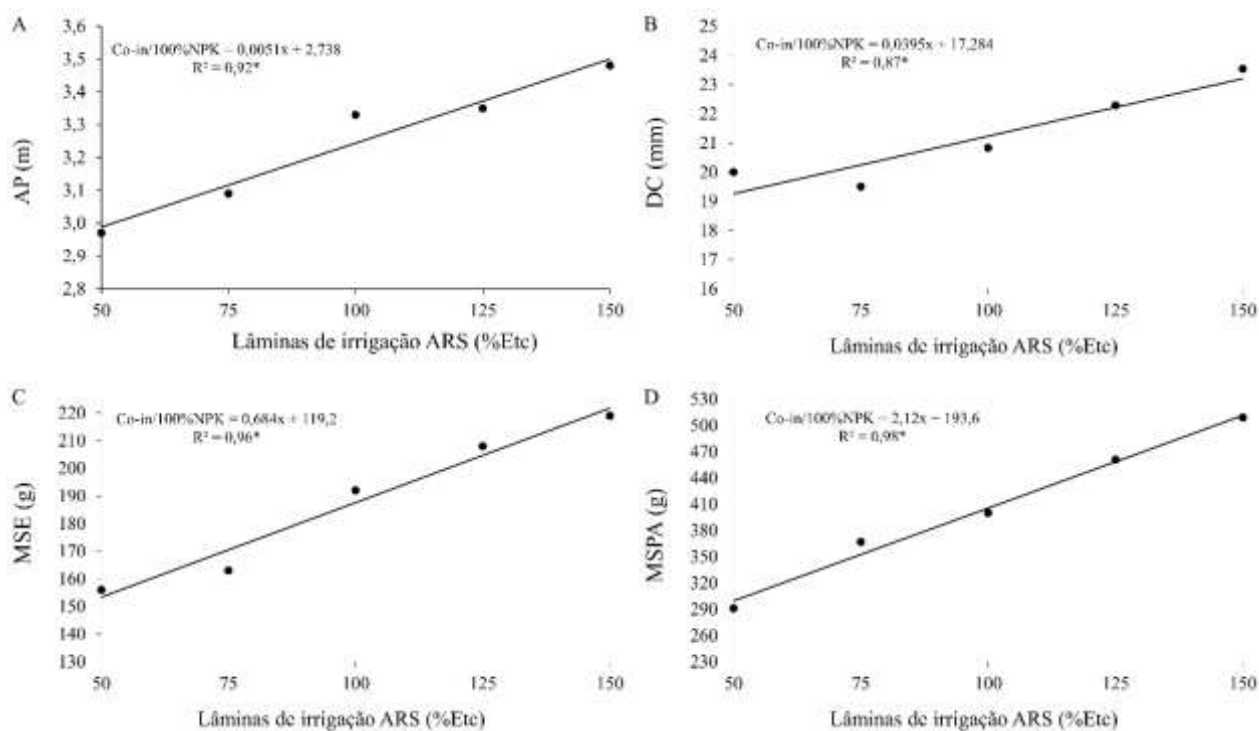
Os tratamentos com co-inoculação (adubação 30% menor) são estatisticamente iguais aos com 100% de adubação (100%NPK), para todos os atributos morfoagronômicos. As maiores lâminas de irrigação (100%, 125% e 150% de irrigação com ARS) são estatisticamente superiores as testemunhas, como observado para AP e MSPA (Figura 2 A e D). Para o DC (Figura 2 B) as lâminas de irrigação com 100% e 125% de ARS, são estatisticamente iguais às testemunhas, enquanto para as lâminas de 50% e 75% de ARS, a testemunha SPC+co-inoculação se destaca estatisticamente. Em relação à MSE (Figura 2 C) para as lâminas de irrigação com 100% e 125% de ARS, observa-se que a testemunha SPC+co-inoculação tem um desempenho estatisticamente inferior. Em relação às lâminas de 75% e 50% de ARS são estatisticamente iguais, enquanto a testemunha SPC+100%NPK apresentaram melhor desenvolvimento.



As letras maiúsculas comparam a testemunha adicional SPC+100%NPK, enquanto as letras minúsculas comparam a testemunha adicional SPC+Co-inoculação, com as lâminas de aplicação de ARS, com um nível de significância de 5%, usando o teste Dunnet. Não houve diferença significativa entre os tratamentos Co-inoculação x 100%NPK, dentro de cada lâmina de irrigação pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Figura 2 - Atributos morfoagronômicos em função das aplicações dos bioinsumos e irrigação com água residuária de suinocultura comparado com as testemunhas.

A Figura 3 ilustra a variação dos atributos morfoagronômicos em função das lâminas de irrigação com ARS (50%, 75%, 100%, 125% e 150% da ETc). Observa-se que, todas as características morfoagronômicas apresentaram incrementos lineares em resposta ao aumento das lâminas de irrigação com ARS.



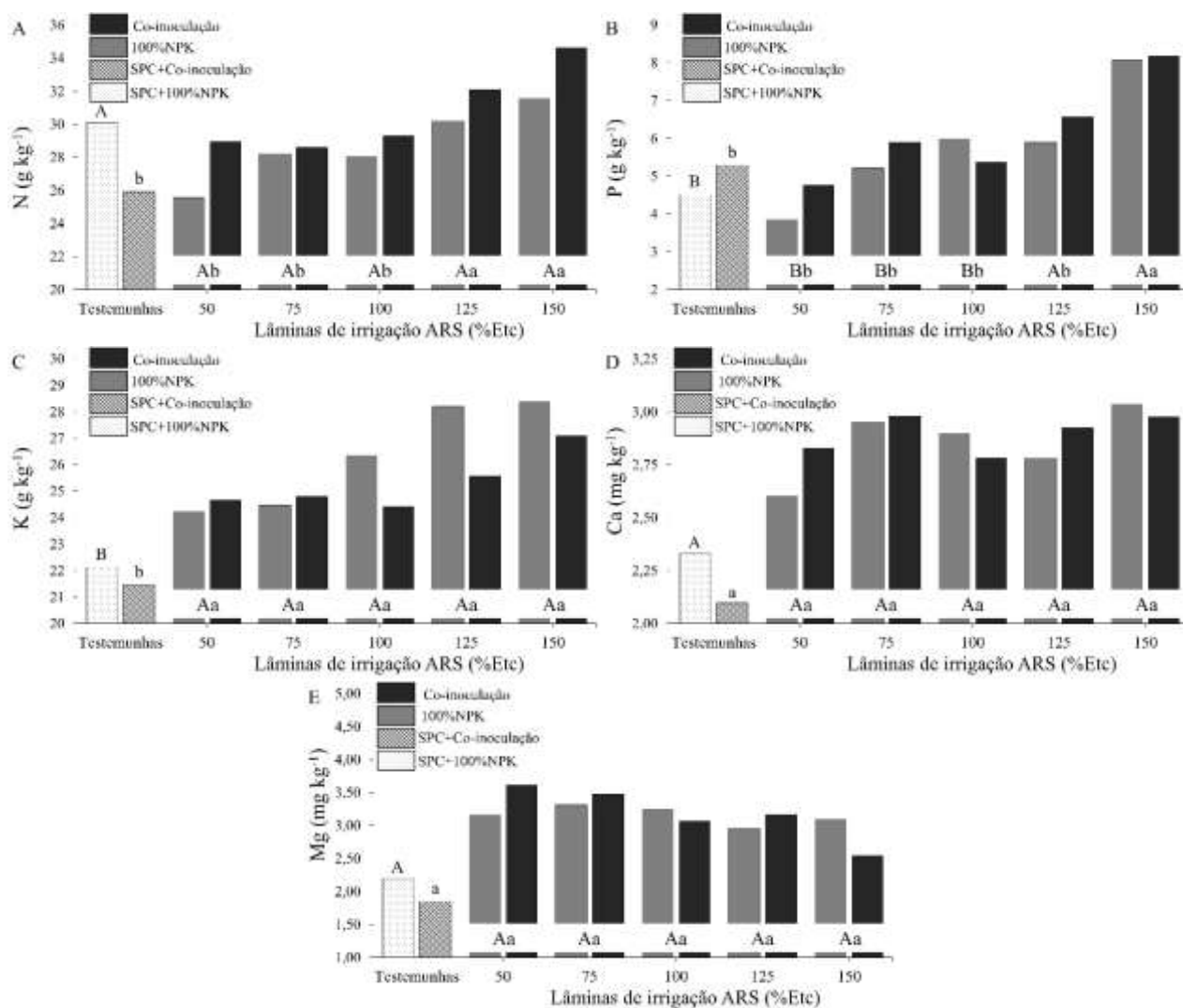
* significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Figura 3 - Efeito das lâminas de irrigação com ARS, em diferentes aplicações de bioinsumos microbianos, nos atributos morfoagronômicos no cultivo de milho

3.2 - Teores foliares do milho

Os tratamentos com co-inoculação (adubação 30% menor) são estatisticamente iguais aos com 100% de adubação (100%NPK), para os todos os teores foliares do milho (Figura 4).

Para os teores foliares de N a testemunha 1 (SPC+100%NPK) é estatisticamente igual a todas as lâminas de irrigação com ARS (Figura 4 A). Em relação a testemunha 2 (SPC+co-inoculação), a igualdade estatística é observada somente para as lâminas de 50 a 100%, sendo maiores teores de N observado nas lâminas maiores que 100%. Ao analisar a variação atribuída exclusivamente aos bioinsumos microbianos, nota-se que mesmo quando a co-inoculação recebe 30 pontos percentuais a menos de adubação, os teores de N ($30,7 \text{ g kg}^{-1}$) são estatisticamente superiores aos teores de N ($28,7 \text{ g kg}^{-1}$) do tratamento com 100%NPK. Isso representa um aumento de 6,5% nos teores de N, mesmo com uma redução de 30% na adubação nitrogenada.



As letras maiúsculas comparam a testemunha adicional SPC+100%NPK, enquanto as letras minúsculas comparam a testemunha adicional SPC+Co-inoculação, com as lâminas de aplicação de ARS, com um nível de significância de 5%, usando o teste Dunnett. Não houve diferença significativa entre os tratamentos Co-inoculação x 100%NPK, dentro de cada lâmina de irrigação pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Figura 4 – Teores foliares em função das aplicações dos bioinsumos e irrigação com água residuária de suinocultura comparado com as testemunhas

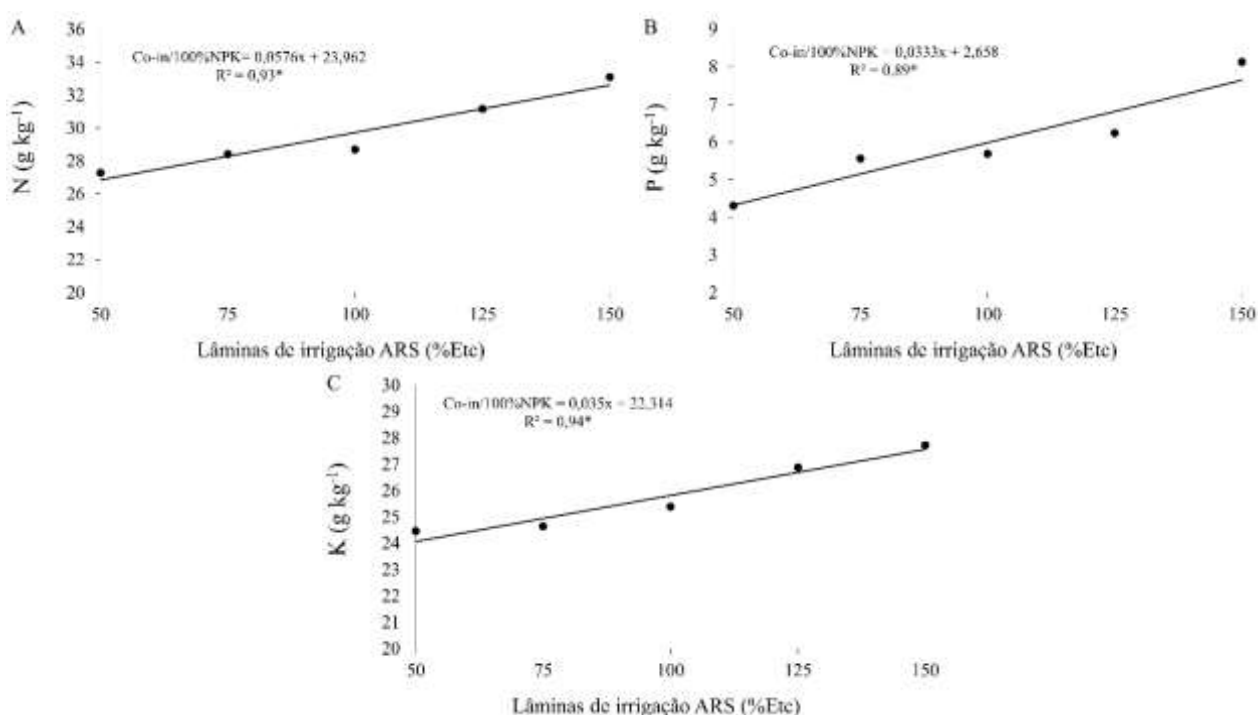
Os teores foliares de P (Figura 4 B) indicam que as lâminas de 150% e 125% de ARS são superiores a testemunha 1 (SPC+100%NPK). Enquanto para a testemunha 2 (SPC+Co-inoculação) somente a lâmina de 150% de ARS é superior.

Para os teores foliares de K, todas as lâminas de irrigação com ARS demonstraram níveis mais elevados em comparação com as testemunhas. Essa tendência pode ser explicada pelos consideráveis teores de K (140 mg L^{-1}) presentes na ARS (Tabela 2).

Durante a execução do experimento, foram aplicados um de 1.117,8 m³ ha⁻¹ de ARS (100% Etc), adicionando-se e ao sistema produtivo aproximadamente 156 kg ha⁻¹ de K. Os teores foliares de K são estatisticamente superiores para o tratamento com 100%NPK (26,3 g kg⁻¹) quando comparado com a co-inculcação (25,3 g kg⁻¹), sendo o único atributo que apresentou esse resultado (Tabela 3).

Em relação aos teores foliares de Ca e Mg (Figura 4 D e E), foram adicionados ao sistema produtivo um total de 9,9 kg ha⁻¹ e 13,4 kg ha⁻¹, respectivamente, via ARS (100% Etc), contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente. Destaca-se que foi realizado calagem do solo antes da instalação do experimento.

A Figura 5, evidência a variação dos teores foliares em função das lâminas de irrigação com ARS (50%, 75%, 100%, 125% e 150% da ETc da cultura do milho) para os teores de N, P e K. Observa-se que, todas as características apresentaram incrementos lineares em resposta ao aumento das lâminas de irrigação com ARS.

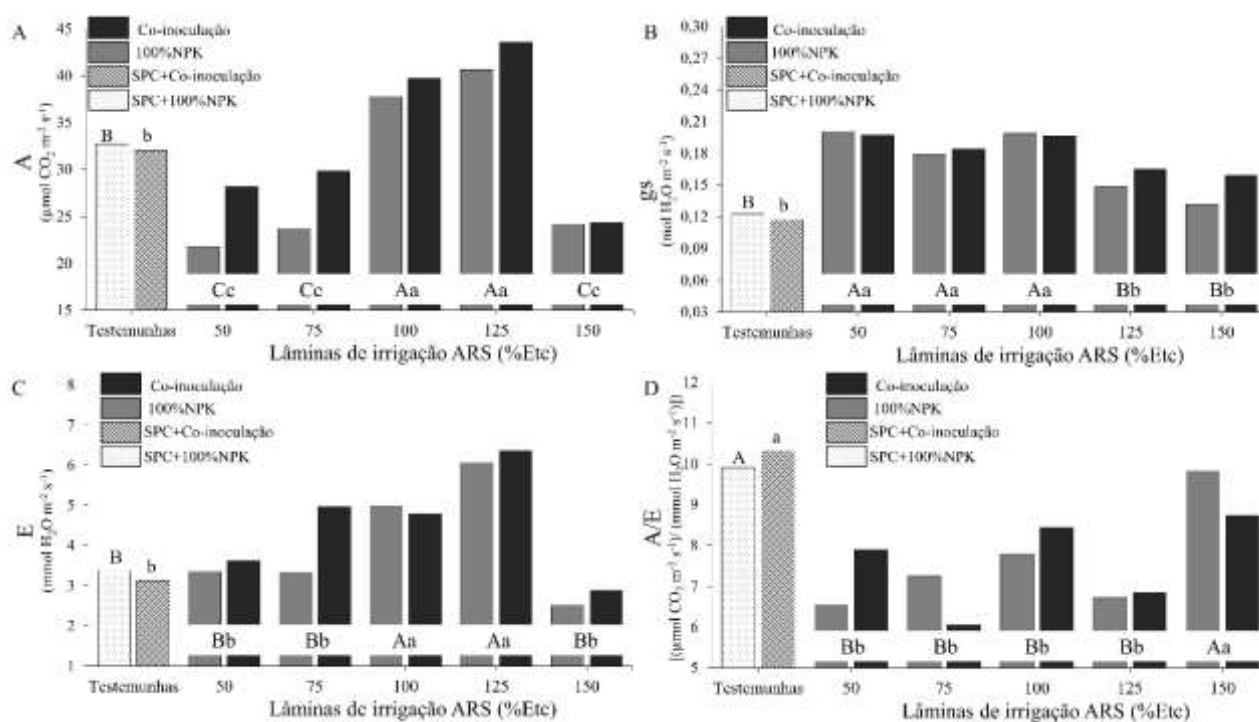


* significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Figura 5 - Efeito das lâminas de irrigação com ARS, em diferentes aplicações de bioinsumos microbianos, nos teores foliares no cultivo de milho crioulo

3.3 - Atributos Fisiológicos

Os tratamentos com co-inoculação (adubação 30% menor) são estatisticamente iguais aos com 100% de adubação (100%NPK), para os atributos de trocas gasosas (Figura 6).



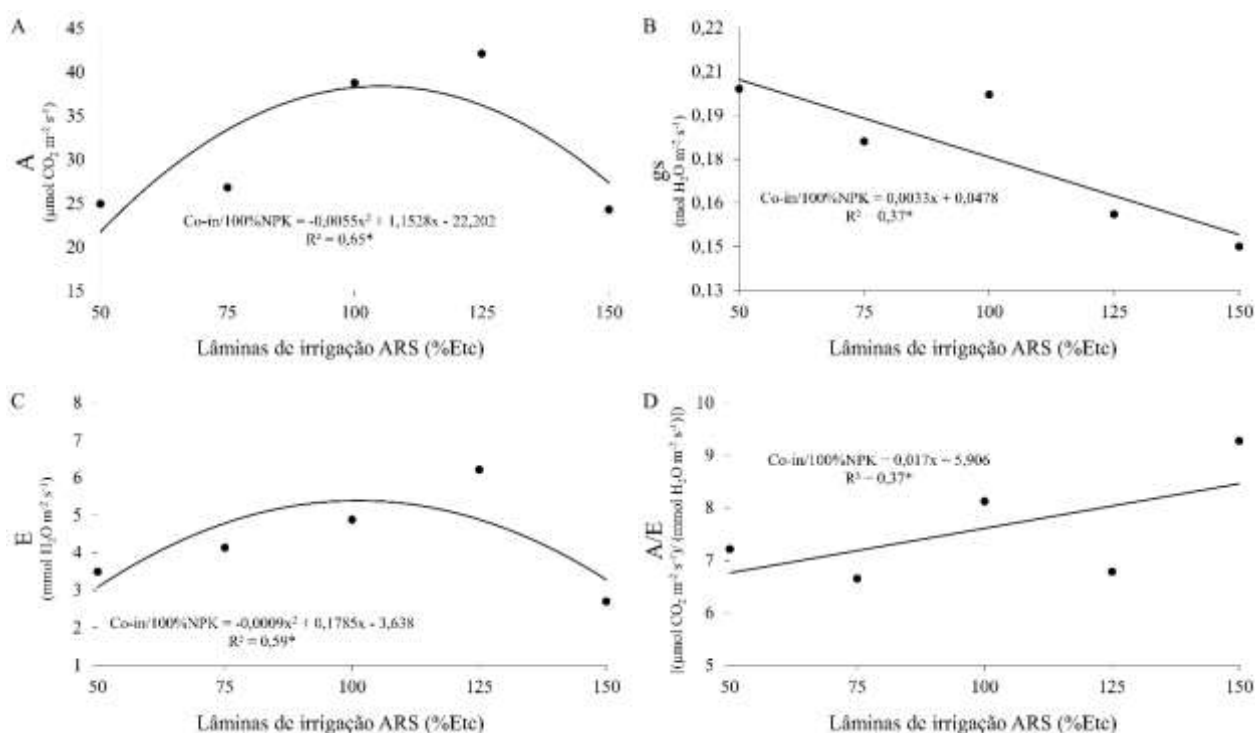
As letras maiúsculas comparam a testemunha adicional SPC+100%NPK, enquanto as letras minúsculas comparam a testemunha adicional SPC+Co-inoculação, com as lâminas de aplicação de ARS, com um nível de significância de 5%, usando o teste Dunnett. Não houve diferença significativa entre os tratamentos Co-inoculação x 100%NPK, dentro de cada lâmina de irrigação pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Figura 6 – Trocas gasosas em função das aplicações dos bioinsumos e irrigação com água residuária de suinocultura comparado com as testemunhas

Os resultados referentes à taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) revelam que as testemunhas apresentaram diferenças significativas em relação a todas as lâminas de irrigação com ARS (Figura 6A). As lâminas de 100% e 125% de ARS são superiores, enquanto as lâminas de 50%, 75% e 150% exibiram resultados inferiores, observando-se uma equação de segundo grau (Figura 7A). Embora não haja diferença significativa entre 100%NPK e co-inoculação nas lâminas de 50% e 75% de ARS (Figura 6A), é notável visualmente que, em média, a co-inoculação ($29,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) apresenta resultados maiores que 100%NPK ($22,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). De forma isolada, os valores de

assimilação líquida de CO₂, são estatisticamente superiores para co-inoculação (33,1 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) em relação ao 100%NPK (29,6 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) (Tabela 4).

Em se tratando da condutância estomática (gs) (Figura 6B), as lâminas de 50%, a 100% de ARS, exibiram valores estatisticamente superiores as testemunhas. Demonstrando uma tendência de diminuição da gs com o aumento das lâminas de irrigação com ARS (Figura 7 B).



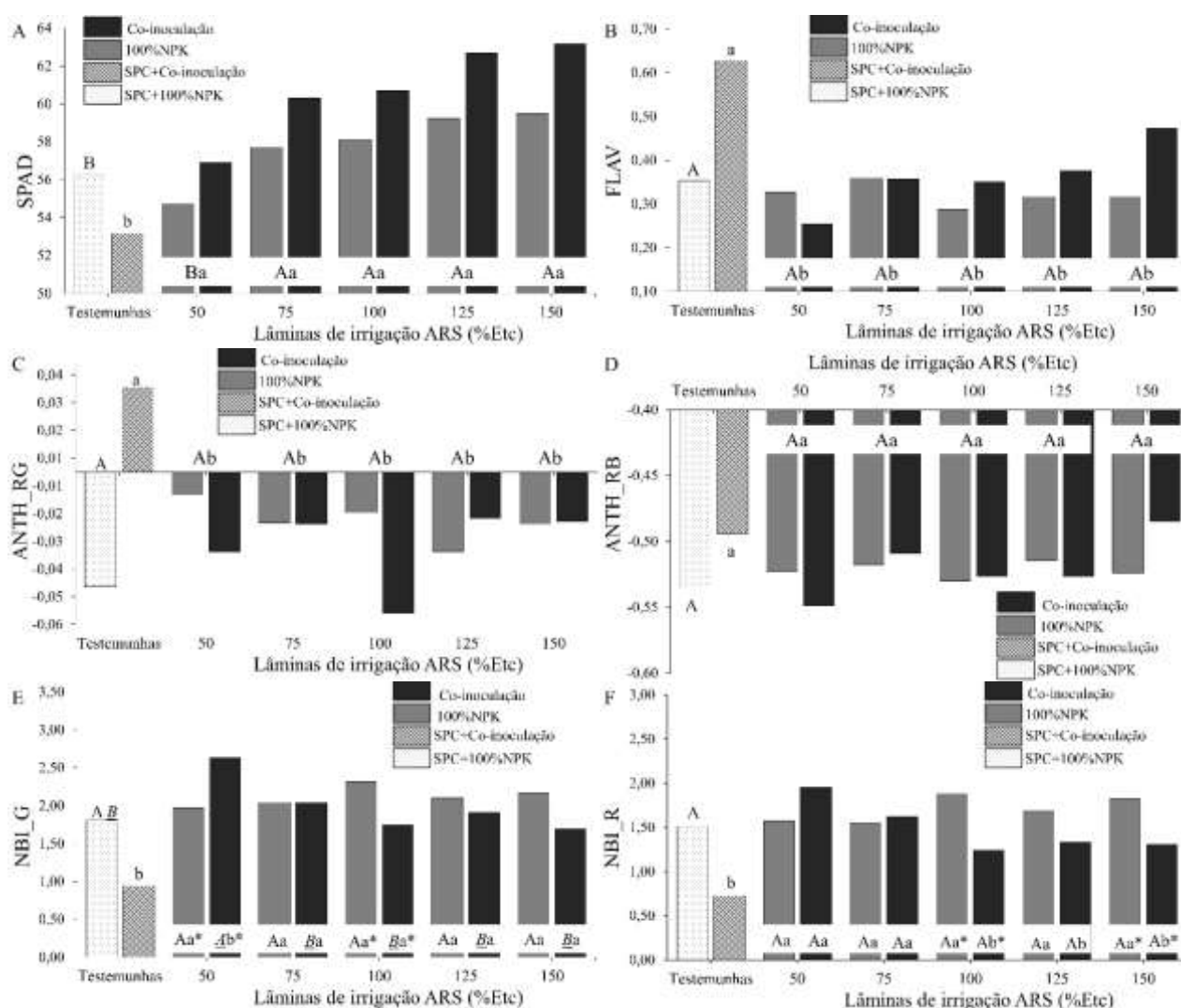
* significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Figura 7 - Efeito das lâminas de irrigação com ARS, em diferentes aplicações de bioinsumos microbianos, nos atributos fisiológicos de trocas gasosas no cultivo de milho crioulo

Os valores referentes à taxa de transpiração (E) revelam que as lâminas de 100% e 125% de ARS são estatisticamente superiores as testemunhas, enquanto as lâminas de 50%, 75% e 150% exibiram resultados estatisticamente iguais as testemunhas, demonstrando uma equação de segundo grau (Figura 7C). Embora não haja uma diferença significativa para 50% e 75% da aplicação de ARS (100%NPK X co-inoculação), é notável que, em média, a co-inoculação (4,29 mmol H₂O m⁻² s⁻¹) apresentou resultados superiores a 100%NPK (3,33 mmol H₂O m⁻² s⁻¹). Ao se analisar de forma isolada (Tabela

4), observa-se que a co-inoculação ($4,52 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) apresenta resultados superiores em relação ao 100%NPK ($4,04 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Para a eficiência instantânea no uso da água (A/E) (Figura 6E), as testemunhas são estatisticamente iguais a 150% de ARS, verificando-se um incremento linear conforme aumento das lâminas de irrigação (Figura 7E).

Na Figura 8 são apresentados os resultados da comparação das testemunhas (SPC+Co-inoculação e SPC+100%NPK) com os tratamentos comuns e, a interação da aplicação dos bioinsumos (co-inoculação e 100%NPK) dentro das lâminas de irrigação com ARS (50%, 75%, 100%, 125% e 150% da E_{Tc} da cultura do milho), para os atributos bioquímicos e fisiológico relacionados aos metabólitos secundários e balanço de nitrogênio (SPAD e MULTIPLEX).

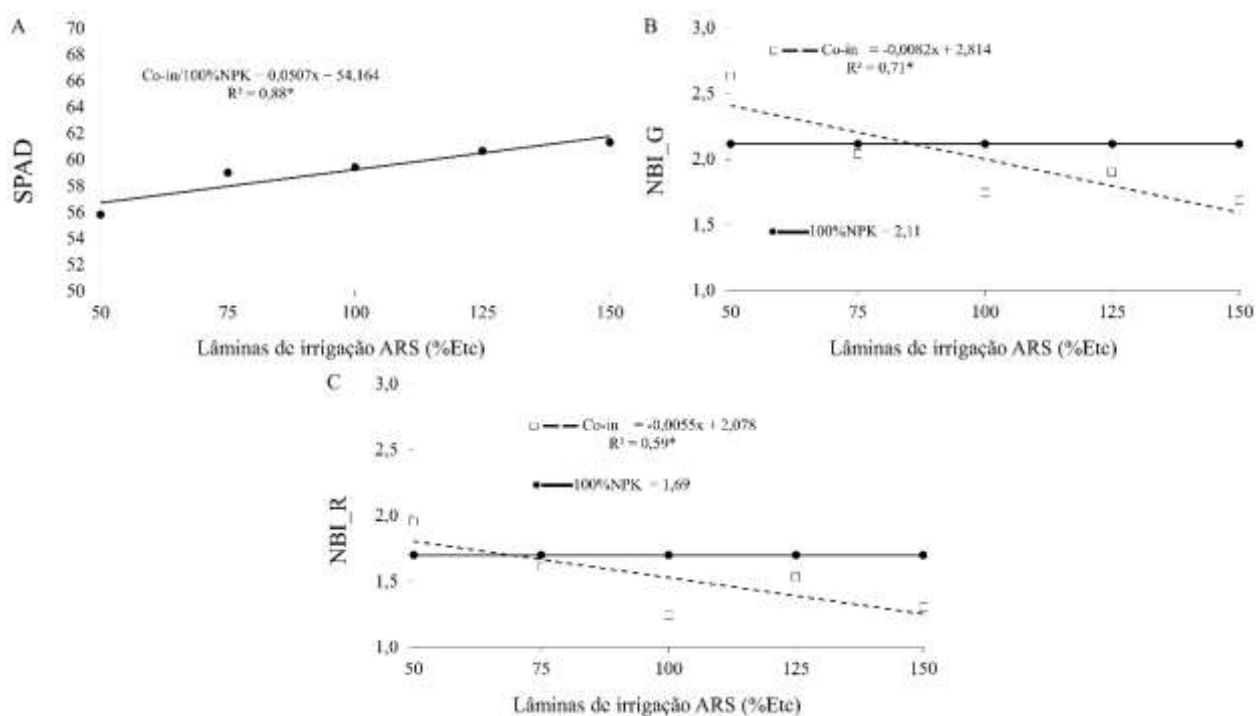


As letras maiúsculas comparam a testemunha adicional SPC+100%NPK, enquanto as letras minúsculas comparam a testemunha adicional SPC+Co-inoculação, com as lâminas de aplicação de ARS, com um nível de significância de 5%, usando o teste Dunnett. *Representa diferença

estatística ($p < 0,05$) quando comparado os tratamentos co-inoculação x 100%NPK, dentro de cada lâmina de irrigação pelo teste Tukey.

Figura 8 – Índice SPAD, índices médios de flavonóides (FLAV), antocianina (ANT-RG e ANT-RB) e balanço de nitrogênio (NBI-G e NBI-R) de folhas de milho em função das aplicações dos bioinsumos e irrigação com água residuária de suinocultura comparado com as testemunhas

Para o índice SPAD as testemunhas mostraram-se estaticamente inferiores para todos os tratamentos, exceto, SPC+100%NPK com a lâminas 50% de ARS. Apresentando acréscimo conforme o incremento das lâminas de ARS (Figura 9A). Apesar de não haver diferença estatística, os valores da co-inoculação foram em média 5,10% superiores ao tratamento com 100%NPK. De forma isolada (Tabela 4), o índice SPAD para a co-inoculação é estatisticamente superior a 100%NPK.



* significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Figura 9 - Efeito das lâminas de irrigação com ARS, em diferentes aplicações de bioinsumos microbianos, no índice SPAD e balanço de nitrogênio no cultivo de milho crioulo

Quanto aos índices médios de flavonoides (FLAV) (Figura 8B), nota-se que a testemunha SPC+co-incubação apresenta um desempenho estatisticamente superior em relação aos tratamentos com ARS. Por outro lado, a testemunha SPC+100%NPK é estatisticamente igual a todos os tratamentos. Esses mesmos resultados foram observados para a concentração de antocianinas obtida sob luz vermelha e luz verde (ANTH_RG) (Figura 8 B). Para a antocianinas obtida sob luz vermelha e luz azul (ANTH_RB), as testemunhas foram estatisticamente iguais a todos os tratamentos (Figura 8 C).

Para os valores de balanço de nitrogênio (NBI-G e NBI-R), observou-se uma interação significativa entre irrigação e os bioinsumos microbianos, obtendo-se assim o desdobramento entre os valores (Figura 8). De modo geral, a testemunha 1 SPC+100%NPK foi estatisticamente igual a todos os tratamentos (NBI-G e NBI-R), enquanto a testemunha 2 SPC+co-incubação apresentou resultados inferiores para um maior número de tratamentos. Os tratamentos sob co-inoculação demonstraram uma tendência de diminuição do NBI em função do aumento das lâminas de irrigação (Figura 9 B e D). Esses resultados indicam que à medida que as lâminas de irrigação aumentam, ocorre uma diminuição nos valores associados ao balanço de nitrogênio. Isso sugere que, nas condições do presente estudo, lâminas de irrigação menores estão associadas a um maior balanço de nitrogênio.

3.4 - Estatística Multivariada - Análise de Fatores

A avaliação dos grupos de variáveis inter-relacionadas e sua relação com os tratamentos foi realizada a Análise de Fatores (AF) (Tabela 3). Foram avaliados os 5 primeiros fatores que explicaram 80% da variabilidade total dos dados e que apresentaram autovalores maiores que 1 (Hair et al., 2009).

O Fator 1 reteve 35% da variabilidade total dos dados originais, e as maiores cargas fatoriais positivas estiveram relacionadas ao grupo de variáveis MSP, MSE, AP, DC, N, P, Cu e SPAD (Tabela 3). Ocorreu relação positiva entre MSP e teores de macronutrientes, indicando que a taxa de crescimento relativo de matéria seca acompanha às taxas de absorção relativa dos nutrientes. Observa-se uma forte influência do aumento das lâminas de irrigação por ARS, com escore positivos e associado ao grupo correlacionado com Fator 1 (Figura 10A). Observa-se uma correlação moderada negativa de Ci e ANTH_RG com o Fator 1. A co-inoculação promoveu contribuição para os escores positivos do Fator 1, ou seja, contribui positivamente e com menor expressividade

para o grupo de variáveis MSP, MSE, AP, DC, N, P, Cu e SPAD. Tal fato pode ser corroborado pelos maiores escores atribuído a testemunha Adicional T2 (SPC+co-inoculação), a qual foi inoculada.

O grupo dos atributos Mg e GS tiveram fortes cargas positivas no Fator 2 (22% da variância explicada) (Tabela 3), e já os atributos Ca e Zn tiveram cargas positivas moderadas. Cargas fatoriais negativas estiveram associadas ao Fator 2, associação ao atributo A/E (carga forte) e ANTH_RG (carga moderada). Escores positivos do Fator 2, estiveram associados às lâminas de 50, 75 e 100. Com lâmina de 150 e irrigação com água bruta, observa-se relação com A/E e ANTH_RG. Não houve influência da co-inoculação (Figura 10B).

Tabela 3 - Cargas fatoriais ⁽¹⁾ dos atributos morfoagronômicos, teores foliares, atributos fisiológicos, autovalores e variância explicada dos fatores após o método ortogonal Varimax

Autovalor	8.79	5.51	2.77	1.71	1.23	Comunalidade
Variância Explicada %	35.2	22.0	11.1	6.8	4.9	
Variância Acumulada %	35.2	57.2	68.3	75.1	80.0	
Variáveis ⁽²⁾	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	R ²
MSP	0.89	-0.01	-0.15	-0.10	0.24	0.89
MSE	0.84	-0.19	-0.33	0.12	0.15	0.89
AP	0.88	0.04	-0.19	0.01	-0.06	0.81
DC	0.74	-0.32	-0.11	-0.14	-0.07	0.70
N	0.78	-0.10	0.02	0.15	-0.16	0.67
P	0.79	0.03	-0.02	-0.09	0.35	0.76
K	<u>0.65</u>	0.31	-0.06	0.17	0.37	0.70
Ca	<u>0.55</u>	<u>0.60</u>	0.12	0.33	0.16	0.82
Mg	0.01	0.71	0.01	<u>0.50</u>	0.19	0.79
Cu	0.74	0.37	0.00	0.08	0.36	0.82
Zn	0.56	<u>0.59</u>	0.10	0.29	0.16	0.77
A	0.10	-0.01	-0.91	0.05	-0.15	0.87
gs	-0.15	0.74	-0.02	0.16	-0.23	0.65
E	0.02	0.44	-0.84	0.12	0.04	0.92
Ci	<u>-0.57</u>	0.25	<u>0.54</u>	0.23	0.00	0.74
A/Ci	0.45	-0.05	-0.84	-0.07	-0.08	0.93
A/E	0.17	-0.77	0.27	-0.11	-0.21	0.75
SPAD	0.82	0.39	-0.16	0.03	-0.10	0.86
ANTH_RB	0.18	0.10	0.12	-0.83	0.20	0.79
ANTH_RG	<u>-0.50</u>	-0.49	0.11	-0.32	<u>0.51</u>	0.87
FLAV	-0.04	-0.33	0.04	-0.88	0.02	0.89
NBI_G	0.08	0.35	0.06	0.88	0.16	0.94

NBI_R	0.10	0.25	0.04	0.88	0.32	0.95
SFR_G	0.41	0.42	0.20	0.42	0.09	0.57
SFR_R	0.29	0.11	0.18	0.22	0.72	0.69

⁽¹⁾ Cargas fatoriais: forte - $\geq 0,7$ e moderada - entre 0,7 e 0,5 moderada (Hair et al, 2009). ⁽²⁾ AP - altura de planta, MSPA - massa seca da parte aérea, MSR - massa seca de raiz, N – teor foliar de nitrogênio, P– teor foliar de fósforo, K– teor foliar de potássio, Ca– teor foliar de cálcio, Mg– teor foliar de magnésio, CT – Clorofila Total; A – taxa de assimilação líquida de CO₂, Gs – condutância estomática, Ci – concentração interna de CO₂, E – taxa de transpiração, A/E - Eficiência instantânea no uso da água e Ci - Eficiência instantânea de carboxilação.

O Fator 3 (11.1 %) e Fator 4 (6.8 %) apresentam forte contribuição dos atributos bioquímicos e associados às trocas gasosas. No Fator 3 observa-se uma carga fatorial forte negativa de A, E e A/Ci e seus escores negativos associados são atribuídos às lâminas de 100 e 125, assim com a testemunha sem inoculação (Figura 10C). No Fator 4 observa-se uma carga fatorial forte negativa de ANTH_RB e FLAV, e carga fatorial forte positiva do NBI_G e NBI_R. Nos gráficos de escores, os valores positivos (associados a NBI_G e NBI_R), ocorrem para 100 de lâmina bruta com co-inoculação e para 50 da lâmina. Os maiores escores negativos (associado à ANTH_RB e FLAV) são atribuídos a testemunha com 100 de adubação e sem inoculação. Fator 5 (4.9 %) apresentam forte contribuição de SFR_R, e apresenta forte relação com a testemunha com co-inoculação e no grupo com co-inoculação.

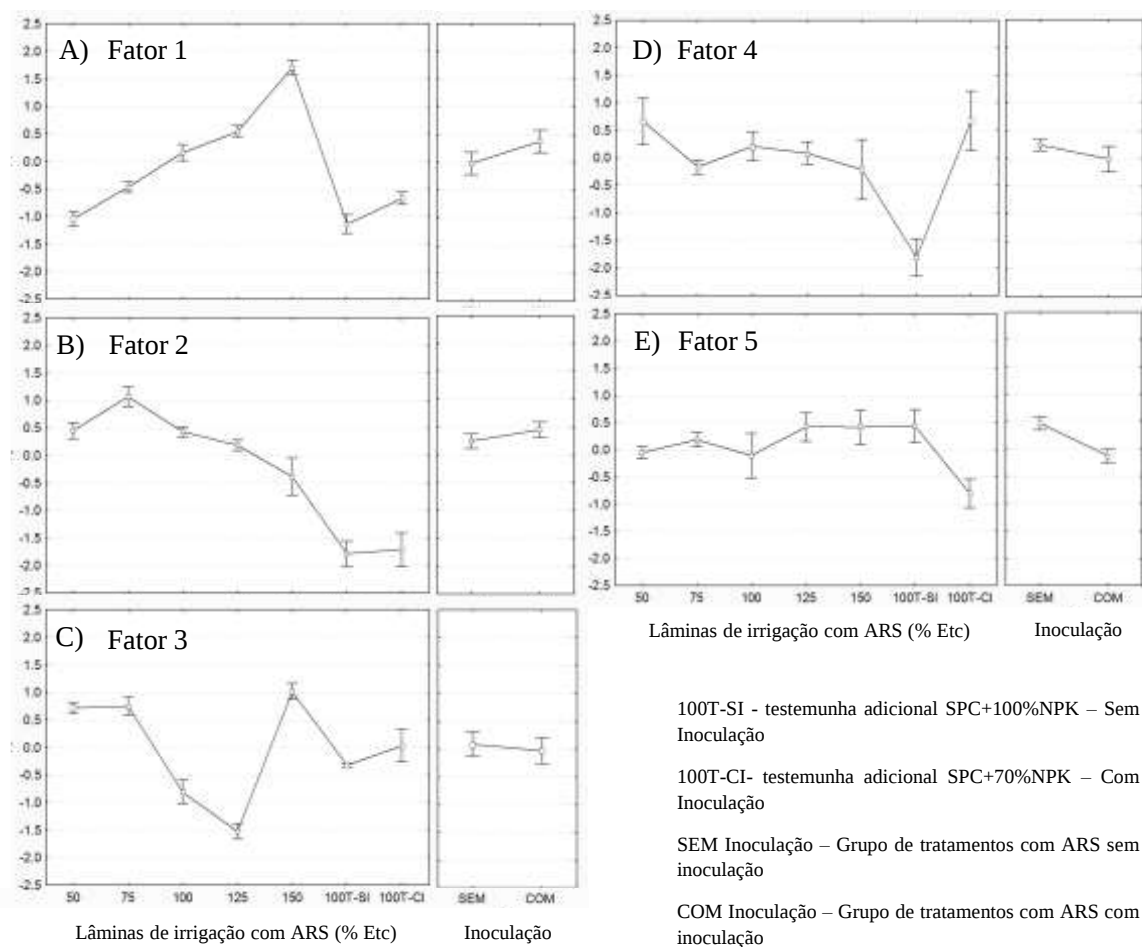


Figura 10 - Representação da média e erro padrão dos escores fatoriais de cada Fator (F1, F2, F3, F4 e F5) e suas explicações proporcionais da variação dos dados, agrupados nos tratamentos e testemunhas estudados

3. DISCUSSÃO

Práticas agrícolas sejam elas de natureza conservacionistas ou não modificam as propriedades biológicas, físicas e químicas do solo, controlando o fluxo de água, oxigênio e nutrientes no sistema, modulando assim as populações microbianas do solo (Schmidt et al., 2019; Hartmann e Seis, 2023). Os efeitos benéficos dos inoculantes microbianos são notavelmente amplificados em solos que oferecem condições biológicas mais favoráveis, ou seja, com quantidade e qualidade de matéria orgânica, encontrado especialmente em solos submetidos a práticas sustentáveis (Vida et al., 2020; Marque et al., 2023).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a literatura quando manejos mais sustentáveis são utilizados: reduzindo-se 30% na adubação NPK, associado à aplicação de BPCV (100%NPK + co-inoculação - *Herbaspirillum seropedicae* + SH

Azospirillum brasilense) são estatisticamente equivalentes para todos os atributos morfoagronômicos e teores foliares (Figuras 2 e 4). Nas Tabelas 3 e 4 evidencia-se ainda que os valores para co-inoculação são estatisticamente superiores para os parâmetros AP, DC, N, SPAD, A e E. De acordo com Li et al. (2020) os microrganismos são favorecidos quando sob o SPD, que possibilita um ambiente rizosférico ideal para sobrevivência e multiplicação dos microrganismos. Em contrapartida, solos de manejo convencional apresenta características indesejáveis para a manutenção e desenvolvimento da população de microrganismos do solo (Watt et al. 2006). O sinergismo da co-inoculação do *H. seropedicae* + SH com *A. brasilense* aliado ao sistema plantio direto (SPD), com maior qualidade biológica do solo (Tabela 1) gerou resultados satisfatório na produção do milho. Tal fato é corroborado pelos resultados obtidos na testemunha, em que a co-inoculação (SPC+co-inoculação) e doses reduzida (30% de redução) os resultados são inferiores, visto que a menor qualidade biológica do sistema convencional de cultivo (Tabela 1) pode ter resultado em diminuição da população dos microrganismos inoculados.

Corroborando com esses argumentos estão os resultados relacionado as testemunhas SPC+100%NPK e SPC+co-inoculação, conduzidas em uma área submetida ao sistema plantio convencional, com práticas de aração e gradagem, recebendo 100% da demanda hídrica necessária para a cultura e, com 100% e 70% (SPC+co-inoculação) da adubação NPK recomendada, apresentaram predominantemente resultados inferiores em relação aos atributos morfoagronômicos e teores foliares. De acordo com Kudoyarova et al. (2019) quando sob situações de estresse os bioinsumos microbianos tendem a apresentar melhores resultados quando comparados com condições ideais de manejo. Contudo, para Yu et al. (2012), em situações consideradas estressantes os resultados para a aplicações de bioinsumos microbianos podem ser malsucedidos, se o ambiente não fornecer condições mínimas para sobrevivência dos microrganismos. Situação essa observada na testemunha com o manejo sob SPC.

Mesmo com redução na adubação os microrganismos promotores de crescimento vegetal tendem suprir a carência de adubo por meio de estruturas especializadas (Etesami e Adl, 2020). Dentre os mecanismos descritos para o *H. seropedicae* e *A. brasilense* estão; fixação biológica de nitrogênio (Brusamarello-Santos et al., 2017), modulação de fitohormônios (Cassán et al. 2014), estimulação da resistência das plantas a estresses abióticos e mitigação do estresse hídrico (Fukami et al., 2018; Azevedo et al., 2019; Freitas et al., 2020), modulação de enzimas em resposta a diferentes tipos de estresse

(Nunes et al., 2021; Irineu et al., 2022), aumento da absorção de nutrientes e água (Ardakani et al., 2011), liberação de ácidos orgânicos, que podem solubilizar fosfatos de cálcio (Rodriguez et al., 2004).

Diversos autores relataram resultados significativos com a utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal. Fukami et al. (2016) trabalhou com a utilização de *A. brasilense* e observou que com menos adubação 25% nitrogenada ainda é possível encontrar resultados significativos de produção vegetal. Alves et al. (2021) quando inoculou milho com *H. seropedicae* + 40 kg ha⁻¹ de N encontrou resultados semelhantes com a adubação com 80 kg ha⁻¹ de adubação com N. Thiengo et al. (2023) verificou que a aplicação de *H. seropedicae* + SH pode promover até 89% de acúmulo de N com um tratamento controle. Rosa et al. (2020) utilizando *A. brasilense* + *Bacillus subtilis* reduziu 75% na adubação fosfata.

O fornecimento de nutrientes por meio ARS (Tabela 2) pode ser um fator que contribui para os maiores valores dos tratamentos com ARS em relação as testemunhas, visto que na Figura 3 e 5 houve incremento significativo para todas os atributos avaliados, uma vez que a aplicação da ARS contribui com o incremento da fertilidade do solo (Guidinelle et al., 2023). No entanto, essa explicação sozinha não é suficiente para se justificar, visto que as lâminas de 50% e 75% de ARS apresentaram resultados semelhantes ou estatisticamente superiores as testemunhas para a maioria dos atributos, conforme observado para AP, DC, MSPA, N, P, K, Ca e Mg (Figura 2 e 4), mesmo assim, ao se calcular o incremento de nutrientes via ARS os valores são inferiores a 100% da adubação da testemunha (SPC+100%NPK). Reforçando a hipótese de efeito sinérgico entre bioinsumo, sistema plantio direto e água residuária de suinocultura, conforme observado por Guidinelle (2019).

Com relação as trocas gasosas não houve diferença estatística entre (co-inculados X 100%NPK), tais resultados podem ser atribuídos as melhorias provocadas pelos bioinsumos no maquinário fotossintético da planta (Oliveira, 2020). Que estão associados à fixação biológica de nitrogênio, produção de pigmentos fotoprotetores, favorecendo o aumento da taxa fotossintética (Bashan et al., 2006; Bulegon et al. 2017). Efeitos benéficos da aplicação de *H. seropedicae* no aparelho fisiológico em plantas de milho foram relatados por Canellas et al. (2012), em que houve maior estímulo na abertura estomática, além do aumento na atividade da H⁺-ATPases. Kasim et al. 2013 relatou que *A. brasilense* poder condicionar os ajustes osmóticos no espaço apoplástico e ou simplástico, buscando mitigar efeitos adversos abióticos. Ramos et al. (2020) verificou

que a inoculação com de *H. seropedicae* estimula a assimilação líquida de carbono e a eficiência de carboxilação.

Em relação as lâminas de irrigação com ARS observa-se resultados distintos aos de trocas gasosas encontrados na literatura. Os mecanismos evolutivos das plantas em repostas a disponibilidade hídrica, ativam mecanismos de redução de gs para diminuir a perda de água para a atmosfera (Ávila et al. 2017), quando sob déficit hídrico, como relatado por Vitale et al. (2009). Porém, os resultados sugerem o oposto, como observado nas Figuras 7 (C), maior valor de gs. Esse resultado pode ser atribuído manutenção da água no sistema por meio do SPD, que já é amplamente discutido na literatura (Zhao et al., 2022), o que permite que as plantas tenham acesso suficiente à água para atender às suas necessidades fisiológicas, mesmo quando a irrigação é aplicada em quantidades menores. Como já mencionado por Cooper et al. (2014), as plantas de milho tendem a ser sensíveis a excesso de água, sendo esses um dos possíveis motivos para os resultados anormais para as trocas gasosas, com relação aos incrementos das lâminas de irrigação. Porém, salienta-se que não interferem no nível de produção conforme Figura 3. Contudo, corroborando com Marques et al. (2021), altas doses de irrigação podem resultar em maiores custos, energético para as plantas.

De modo geral a testemunha SPC+co-inoculação apresenta valores mais elevados para flavanoides (FLAV) e antocianina quando excitada sob luz vermelha e verde (ANTH_RG) (Figura A e B), que podem ser ligados a algum tipo de estresse que as plantas estão sofrendo (Kandil et al., 2004). Estudos sugerem que genes ligados aos flavonoides, sinalizam papéis de defesa durante as associações planta-micróbio (Hassan et al., 2012). Opostamente, observa-se uma diminuição dos valores relacionados ao balanço de nitrogênio (NBI_G e NBI_R) para SPC+co-inoculação (Figura D e E). Tal resultado pode ser atribuído ao fato que quando há aumento dos níveis de flavonoides em plantas, há uma redução no balanço de nitrogênio, ocorre devido ao acúmulo de carboidratos. Nessas condições, as plantas não conseguem utilizar eficazmente esses carboidratos para a síntese de aminoácidos ou outros compostos ricos em nitrogênio (FREITAS, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009). De acordo com Filho (2011) sugerindo potencial indicador de menores teores foliar de N.

Contudo, observa-se repostas contrastantes à essa afirmação quando analisado a Figura 9 (A e B), evidenciando-se uma diminuição linear nos valores de NBI_G e NBI_R conforme aumentam as lâminas de irrigação nos tratamentos que utilizam a co-inoculação, esses mesmo tratamentos apresentam maiores valores de N e índice SPAD

quando analisados as Figuras 5 e 7 (A e A). Em contrapartida, os resultados sem inoculação microbiana (100%NPK) não apresentaram significância estatística, ou seja, os microrganismos apresentam papel crucial nesses resultados.

Os bioinsumos microbianos possuem o potencial de influenciar respostas fisiológicas em plantas submetidas a estresses causados pela escassez de água, promovendo alterações no metabolismo de açúcares e no aparato fotossintético das plantas (Canellas et al., 2012; Cortés-Patiño et al., 2022). Que por sua vez pode ser potencializado pela aplicação foliar de *H. seropedicae* que foi realizada via foliar em dois estádios diferentes de desenvolvimento da cultura. Ou seja, sugere-se que na presente situação, menor disponibilidade hídrica, fornecida via ARS, que é notadamente uma situação que amplifica os efeitos positivos dos bioinsumos, quando comparado com uma situação ideal (Egamberdieva et al., 2017; Kudoyarova et al., 2019). Contribuiu com a modulação e o aumento inicial do balanço de nitrogênio, resultado similar ao descrito por Irineu et al. (2022).

Ainda assim, os resultados do presente estudo não são suficientes para compreender totalmente o papel dos bioinsumos na fisiologia vegetal, sendo necessárias pesquisas mais abrangentes para compreender essa situação completamente; no entanto, os resultados apresentados fornecem uma direção significativa para as valiosas potencialidades do uso de bioinsumos promotores de crescimento vegetal.

4. CONCLUSÃO

A utilização da co-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* + Substâncias Húmicas com *Azospirillum brasilense*, nas presentes condições desse estudo, revelou-se como uma abordagem eficiente para substituir 30% da adubação NPK. Resultando em uma redução parcial da dependência de insumos químicos, sem impactar negativamente a produção de milho.

O solo submetido ao sistema plantio direto e irrigado com água residuária de suinocultura criou um ambiente edáfico mais propício e uma qualidade biológica mais favorável para o crescimento da população microbiana introduzida no sistema. Corroboram com os resultados encontrando no estudo conduzido em ambiente controlado (Capítulo 1), agora confirmados em um experimento a campo.

Os parâmetros morfoagronômicos e os teores foliares do milho responderam de forma linear ao aumento das doses de água residuária de suinocultura, demonstrando um

desempenho superior em relação à testemunha. No entanto, em termos gerais, observou-se que as plantas apresentaram resultados fisiologicamente menos favoráveis com as maiores lâminas de água, correspondentes a 125% e 150% da demanda de evapotranspiração da cultura.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES, G. C.; DOS SANTOS, C. L.; ZILLI, J. E.; FABIO, B.; MARRIEL, I. E.; BREDÁ, F. A. D. F.; BODDEY, R. M. Agronomic evaluation of *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE94 as an inoculant to improve maize yield in Brazil. **Pedosphere**, v. 31, n. 4, p. 583-595, 2021.
- ARDAKANI, M. R.; MAZAHARI, D.; MAFAKHERI, S.; MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 181-192, 2011.
- ÁVILA, R. G.; MAGALHAES, P. C.; ALVARENGA, A. A.; LAVINSKY, A. D. O.; CAMPOS, C. N.; SOUZA, T. C.; GOMES JÚNIOR, C. C. Drought-tolerant maize genotypes invest in root system and maintain high harvest index during water stress. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 3, p. 450-460, 2016.
- AZEVEDO, A. M. **Pacote Para Análise De Experimentos Com Testemunhas Adicionais (Package ‘Tratamentos. ad’)**. R package version 0.2.4. 2022.
- AZEVEDO, I. G.; OLIVARES, F. L.; RAMOS, A. C.; BERTOLAZI, A. A.; CANELLAS, L. P. Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H⁺ flux and gene expression in maize roots seedlings. **Chemical and biological technologies in agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2019.
- BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J. J.; LEYVA, L. A.; HERNANDEZ, J.-p.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 4, p. 279-285, 2005.
- BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Measurement of Microbial Biomass Phosphorus in Soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 14, n. 4, p. 319–329. 1982.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C.; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **PloS One**, v. 12, n. 3, p. e0174576, 2017.
- BULEGON, L. G.; BATTISTUS, A. G.; GUIMARÃES, V. F.; INAGAKI, A. M.; OFFEMANN, L. C.; SOUZA, A. K. P.; OLIVEIRA, P. S. R. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and

rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**. v. 11, n. 10, p.1283-1289, 20 out. 2017.

CÂNDIDO, A. C. T. F.; CARVALHO, M. A. C. D.; FELITO, R. A., ROCHA, A.; YAMASHITA, O. M. Nitrogen rates and residual effect of co-inoculation of soybean on maize plants. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 633-643, 2020.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p.119-132, 2012.

CASIDA JR, L. E.; KLEIN, DONALD A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil science**, v. 98, n. 6, p. 371-376, 1964.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 440-459, 2014.

COOPER, M.; GHOSH, C.; LEAFGREN, R.; TANG, T.; MESSINA, C. Breeding drought-tolerant maize hybrids for the US maize-belt: discovery to product. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 21, p. 6191-6204, 2014.

CORTÉS-PATIÑO, S.; VARGAS, C. D.; ALVAREZ-FLÓREZ, F.; ESTRADA-BONILLA, G. Co-Inoculation of Plant-Growth-Promoting Bacteria Modulates Physiological and Biochemical Responses of Perennial Ryegrass to Water Deficit. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2543, 2022.

CORTÉS-PATIÑO, S.; VARGAS, C.; ÁLVAREZ-FLÓREZ, F.; BONILLA, R.; ESTRADA-BONILLA, G. Potential of *herbaspirillum* and *azospirillum* consortium to promote growth of perennial ryegrass under water deficit. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 91, 2021.

COSTA, A. A.; DIAS, B. D. O.; FRAGA, V. D. S.; SANTANA, C. C.; SAMPAIO, T. F. Physical fractionation of organic carbon in areas under different land uses in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 24, p. 534-540, 2020.

CUNHA, E. G.; GUIDINELLE, R. B.; RANGEL, O. J. P.; PASSOS, R. R. Biochar and swine wastewater: Effects on soil fertility of different textures and maize nutrition. **REVISTA CERES**, v. 68, p. 586-596, 2021.

DARTORA, J.; GUIMARAES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Nitrogen fertilization associated to inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in the maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1023-1030, 2013.

DARTORA, J.; MARINI, D.; GONÇALVES, E.; GUIMARÃES, V. F. Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, p. 545-550, 2016.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

DUARTE, J. B. **Princípios sobre delineamentos em experimentação agrícola**. Monografia (Especialização em Estatística e Informática) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1996.

EGAMBERDIEVA, D.; WIRTH, S. J.; ALQARAWI, A. A.; ABD_ALLAH, E. F.; HASHEM, A. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2104, 2017.

EIVAZI, F.; M.A. TABATABAI. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**. 20:601-606. 1988.

ETESAMI, H.; ADL, S. M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their action mechanisms in availability of nutrients to plants. **Phyto-Microbiome in stress regulation**, p. 147-203, 2020.

FREITAS, G. D. S.; BARBOSA, G. F.; ZUFFO, A. M.; STEINER, F. Co-inoculation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes greater tolerance to drought. **Research, Society and Development**. v.9, e69973690, 2020.

FREITAS, M. S. M. **Flavonóides e nutrientes minerais em folhas de maracujazeiro amarelo e deficiência de macronutrientes e boro em maracujazeiro doce**. 2006, 106 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2006.

FUKAMI, J.; DE LA OSA, C.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 3, p. 328-339, 2018.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **Amb Express**, v. 6, p. 1-13, 2016.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Embrapa Pantanal-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2006.

GIORI, F. G. G.; ALEVS, G.; MOREIRA, L. L. Q.; CHAVES, V. A.; MOREIRA, I. M.; PINTO NETA, L. C.; REIS, V. M. **Inoculação em sementes e via foliar da estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* em híbrido de milho BRS1010**. Ciência para o Desenvolvimento Sustentável. Embrapa Agrobiologia, 2010.

GUIDINELLE, R. B. **Água residuária de suinocultura e sistema plantio direto no desenvolvimento do milho para produção de silagem**. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, Alegre, 2019.

GUIDINELLE, R. B.; RANGEL, O. J. P.; PASSOS, R. R.; BAPTESTINI, J. C. M.; SOUZA, A. O. Chemical properties of Oxisol cultivated with maize in management systems of soil irrigated with swine production wastewater. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20201940, 2023.

HARRIS, B. A.; BAUSKE, E. M.; PENNISI, S. V. Cultural practices and microbial inoculants have variable impact on a bedding plant (*Lantana camara* L.) performance in the landscape. **Scientia Horticulturae**, v. 282, p. 110059, 2021.

HARTMANN, M.; SIX, J. Soil structure and microbiome functions in agroecosystems. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 4, n. 1, p. 4-18, 2023.

HASSAN, S.; MATHESIUS, U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: Opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 9, p. 3429-3444, 2012.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, 31, p. 1-2, p.413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C., Nitrogen fixation with soybean: the perfect ymbiosis?. In: de Bruijn, F.J. (Ed.), **Biological Nitrogen Fixation**. Wiley, Hoboken, New Jersey, pp. 1009–1023. 2015.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. **Estações Automáticas**. Disponível em: < <https://mapas.inmet.gov.br/>> Acesso em: 10 de setembro. 2023.

IRINEU, L. E. S. D. S.; SOARES, C. D. P.; SOARES, T. S.; ALMEIDA, F. A. D.; ALMEIDA-SILVA, F.; GAZARA, R. K.; OLIVARES, F. L. Multiomic approaches reveal hormonal modulation and nitrogen uptake and assimilation in the initial growth of maize inoculated with *Herbaspirillum seropedicae*. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 48, 2022.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Soil quality indicators properties in Mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. **Journal of Soil and Water Conservation**, v.55, p.69-78, 2000.

JIANG, S.; WANG, Q.; ZHONG, G.; TONG, Z.; WANG, X.; XU, J. Brief review of minimum or no-till seeders in china. **AgriEngineering**, v. 3, n. 3, p. 605-621, 2021.

KANDIL, F. E.; GRACE, M. H.; SEIGLER, D. S.; CHEESEMAN, J. M. Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L. leaves and their changes during leaf development and senescence. **Trees**, v.18, p.518-528, 2004.

KASIM, W. A.; OSMAN, M. E.; OMAR, M. N.; EL-DAIM, I. A. A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. **Journal of plant growth regulation**, v. 32, p. 122-130, 2013.

KELBESSA, B. G.; DUBEY, M.; CATARA, V.; GHADAMGAHI, F.; ORTIZ, R.; VETUKURI, R. R. Potential of plant growth-promoting rhizobacteria to improve crop productivity and adaptation to a changing climate. **CABI Reviews**, n. 2023, 2023.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B. D.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 64, n. 3, p.339-347, 2005.

KUDOYAROVA, G.; ARKHIPOVA, T.; KORSHUNOVA, T.; BAKAEVA, M.; LOGINOV, O.; DODD, I. C. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1368, 2019.

KUMAR, M.; AHMAD, S.; SINGH, R. P. Plant growth promoting microbes: Diverse roles for sustainable and ecofriendly agriculture. **Energy Nexus**, p. 100133, 2022.

LI, Y.; SONG, D.; LIANG, S.; DANG, P.; QIN, X., LIAO, Y.; SIDDIQUE, K. H. Effect of no-tillage on soil bacterial and fungal community diversity: A meta-analysis. **Soil and Tillage Research**, v. 204, p. 104721, 2020.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo, Ceres, 2006. 638p.

MALLON, C. A.; LE ROUX, X.; VAN DOORN, G. S.; DINI-ANDREOTE, F.; POLY, F.; SALLES, J. F. The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invaders niche. **The ISME Journal**, 12, 728–741.

MARQUES, D. J.; BIANCHINI, H. C.; MACIEL, G. M.; DE MENDONÇA, T. F. N.; SILVA, M. F. E. Morphophysiological changes resulting from the application of silicon in maize plants under water stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-16, 2021.

MARQUES, D. M.; MAGALHÃES, P. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES JÚNIOR, C. C.; DA SILVA, A. B.; DA SILVA, N. T. A.; DE SOUZA, T. C. *Azospirillum brasilense* Reduces the Effects of Water Stress and Increases Maize Yield in Irrigated Areas with High Soil Nitrogen Doses. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-12, 2023.

MENDIBURU, F. **Statistical Procedures for Agricultural Research (Package ‘agricolae’)**. R package version 1.3-6. 2023.

MORAIS, T. P. D.; BRITO, C. H. D.; FERREIRA, A. D. S.; LUZ, J. M. Q. Aspectos morfofisiológicos de plantas de milho e bioquímico do solo em resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista Ceres**, v. 62, n. 6, p. 589-596, 2015.

MUKHERJEE, A.; SINGH, S.; GAURAV, A. K.; CHOUHAN, G. K.; JAISWAL, D. K.; DE ARAUJO PEREIRA, A. P.; VERMA, J. P. Harnessing of phytomicrobiome for developing potential biostimulant consortium for enhancing the productivity of chickpea and soil health under sustainable agriculture. **Science of The Total Environment**, v. 836, p. 155550, 2022.

NUNES, R. D. O.; DOMICIANO, A. G.; DE SOUSA, A. W.; APARECIDA DE, O. J.; NOGUEIRA, F. C. S.; CANELLAS, L. P.; SOARES, M. R. Quantitative proteomic

analysis reveals altered enzyme expression profile in *Zea mays* roots during the early stages of colonization by *Herbaspirillum seropedicae*. **Proteomics**, v. 21, n. 7-8, p. 2000129, 2021.

O'CALLAGHAN, M.; BALLARD, R. A.; WRIGHT, D. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. **Soil Use and Management**, v. 38, n. 3, p. 1340-1369, 2022.

OLIVEIRA, D. M. **Potencial de insumos biológicos no desenvolvimento de forrageiras. Dissertação de mestrado**. 2020. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre, Espírito Santo. 2020.

OFORI, S.; PUŠKÁČOVÁ, A.; RŮŽIČKOVÁ, I.; WANNER, J. Treated wastewater reuse for irrigation: Pros and cons. **Science of The Total Environment**, v. 760, p. 144026, 2021.

OLIVEIRA, R. A.; RAMOS, M. M. **Manual do irrigâmetro**. Viçosa, MG: UFV, 2008.

PEOPLES, M. B.; GILLER, K. E.; JENSEN, E. S.; HERRIDGE, D. F. Quantifying country-to global scale nitrogen fixation for grain legumes: I reliance on nitrogen fixation of soybean, groundnut and pulses. **Plant Soil** p. 1-14, 2021.

PREZOTI, L. C.; GOMES, J. A.; DADALTO, G. G.; OLIVEIRA, J. A. **Manual de Recomendação de Calagem e Adubação para o estado do Espírito Santo – 5ª Aproximação**. Vitória – ES. SEEA/INCAPER/CEDAGRO, 2007. 305p

QAIM, M. Role of new plant breeding technologies for food security and sustainable agricultural development. **Applied Economic Perspectives and Policy**, v. 42, n. 2, p. 129-150, 2020.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2016.

RAMOS, A. C.; MELO, J.; DE SOUZA, S. B.; BERTOLAZI, A. A.; SILVA, R. A.; RODRIGUES, W. P.; DIAS, T. Inoculation with the endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* promotes growth, nutrient uptake and photosynthetic efficiency in rice. **Planta**, v. 252, p. 1-8, 2020.

RAMOS, M. L. G.; DE MELO, R. S.; SILVA, A. M. M.; SILVA, S. B.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, M. P. Carbon and nitrogen stocks in cultivation systems of a Quilombola community in the Brazilian Cerrado. **Regional Environmental Change**, v. 22, n. 3, p. 81, 2022.

REVELLE, W. **psychTools: Tools to Accompany the 'psych' Package for Psychological Research**. Northwestern University, Evanston, Illinois. R package version 2.1.6. 2021.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growthpromoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p.552–555, 2004.

ROSA, P. A. L.; MORTINHO, E. S.; JALAL, A.; GALINDO, F. S.; BUZETTI, S.; FERNANDES, G. C.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, p. 32, 2020.

ROSSATO, O. B.; ANDRADE-SANCHEZI, P.; GUERRA, S. P. S.; CRUSCIOL, C. A. C. Sensores de reflectância e fluorescência na avaliação de teores de nitrogênio, produção de biomassa e produtividade do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 8, p. 1133-1141, ago. 2012.

SCHMIDT, J. E.; KENT, A. D.; BRISSON, V. L.; GAUDIN, A. Agricultural management and plant selection interactively affect rhizosphere microbial community structure and nitrogen cycling. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2019.

SHAHWAR, D.; MUSHTAQ, Z.; MUSHTAQ, H.; ALQARAWI, A.; PARK, Y.; ALSHAHRANI, T.; FAIZAN, S. Role of microbial inoculants as bio fertilizers for improving crop productivity: A review. **Heliyon**, v. 9, n. 6, 2023.

SIGNORELL, A. **DescTools: Tools for Descriptive Statistics**. R package version 0.99.42. 2021.

SILVA, J. B. F. **Índices de nitrogênio na planta e produtividade de tubérculos de batata-semente em sistema hidropônico de três fases**. 2011.89p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2011.

SILVA, F. C.; DA SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

SILVEIRA, M. L.; COMERFORD, N. B.; REDDY, K. R.; COOPER, W. T.; EL-RIFAI, H. Characterization of soil organic carbon pools by acid hydrolysis. **Geoderma**, v. 144, n. 1-2, p. 405-414, 2008.

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial and ¹⁴C-labeled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p.337–343, 1988.

STELLA, T.; MOURATIADO, I.; GAISER, T.; BERG-MOHNICKE, M.; WALLOR, E.; EWERT, F.; NENDEL, C. Estimating the contribution of crop residues to soil organic carbon conservation. **Environmental Research Letters**, v. 14, n. 9, p. 094008, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 848p.

THIENGO, C. C.; DE OLIVEIRA, D. M.; BERNARDES, J. V. S.; DA ROCHA, L. O.; DE SA MENDONCA, E.; OLIVARES, F. L.; BURAK, D. L. Bio-inputs promoting marandu grass growth: Productivity, physiological response and nitrogen accumulation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 17, n. 5, p. 423-430, 2023.

THILAKARATHNA, M. S.; RAIZADA, M. N. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 105, p. 177-196, 2017.

VERMA, J. P.; JAISWAL, D. K.; GAURAV, A. K.; MUKHERJEE, A.; KRISHNA, R.; DE ARAUJO PEREIRA, A. P. Harnessing bacterial strain from rhizosphere to develop indigenous PGPR consortium for enhancing lobia (*Vigna unguiculata*) production. **Heliyon**, v. 9, n. 3, 2023.

VIDA, C.; DE VICENTE, A.; CAZORLA, F. M. The role of organic amendments to soil for crop protection: Induction of suppression of soilborne pathogens. **Annals of Applied Biology**, v. 176, n. 1, p. 1-15, 2020.

VITALE, L.; DI TOMMASI, P.; ARENA, C.; RIONDINO, M.; FORTE, A.; VERLOTTA, A.; MAGLIULO, V. Growth and gas exchange response to water shortage of a maize crop on different soil types. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 331-341, 2009.

WATT, M.; KIRKEGAARD, J. A.; PASSIOURA, J. B. Rhizosphere biology and crop productivity—a review. **Soil Research**, v. 44, n. 4, p. 299-317, 2006.

YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. Comm. **Soil Science of Plants and Analyses**. v.19, p.1467-1476, 1988.

YU, X.; LIU, X.; ZHU, T. H.; LIU, G. H.; MAO, C. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 112-117, 2012.

ZHAO, H.; QIN, J.; GAO, T.; ZHANG, M.; SUN, H.; ZHU, S.; NING, T. Immediate and long-term effects of tillage practices with crop residue on soil water and organic carbon storage changes under a wheat-maize cropping system. **Soil and Tillage Research**, v. 218, p. 105309, 2022.