



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RUBSON DA COSTA LEITE**

**CRESCIMENTO, RENDIMENTO DE GRÃOS E RENTABILIDADE DE SOJA  
(*Glycine max L. Merril*) COINOCULADA COM MICRORGANISMOS  
PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

**BELÉM - PA**

**2022**

**RUBSON DA COSTA LEITE**

**CRESCIMENTO, RENDIMENTO DE GRÃOS E RENTABILIDADE DE SOJA  
(*Glycine max L. Merril*) COINOCULADA COM MICRORGANISMOS  
PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

Tese submetida à Universidade Federal Rural da  
Amazônia, como parte dos requisitos do Curso de  
Doutorado em Agronomia, para obtenção do título  
de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Agronomia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Barata da Silva

**BELÉM- PA**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L533c Leite, Rubson da Costa  
CRESCIMENTO, RENDIMENTO DE GRÃOS E RENTABILIDADE DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) COINOCULADA COM MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS / Rubson da Costa Leite. - 2022.  
154 f. : il. color.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2022.  
Orientador: Prof. Dr. Gisele Barata da Silva

1. Agronomia. I. da Silva, Gisele Barata , orient. II. Título

CDD

633.34098115

---

**RUBSON DA COSTA LEITE**

**CRESCIMENTO, RENDIMENTO DE GRÃOS E RENTABILIDADE DE SOJA  
(*Glycine max L. Merril*) COINOCULADA COM MICRORGANISMOS  
PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

Tese submetida à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte dos requisitos do curso de Doutorado em Agronomia, para obtenção do grau de Doutor em Agronomia.

Data de aprovação: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

Documento assinado digitalmente



GISELE BARATA DA SILVA  
Data: 17/10/2022 08:17:20-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Barata da Silva – Orientadora  
Universidade Federal Rural da Amazônia**

Documento assinado digitalmente



MARIANGELA HUNGRIA DA CUNHA  
Data: 12/10/2022 20:59:23-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Pesquisadora Dr<sup>a</sup> Mariangela Hungria – 1<sup>a</sup> avaliadora  
Embrapa Soja**

---

**Prof. Dr. Marcos Antônio Souza dos Santos – 2<sup>o</sup> avaliador  
Universidade Federal Rural da Amazônia**

Documento assinado digitalmente



HELIO BANDEIRA BARROS  
Data: 13/10/2022 15:29:17-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Hélio Bandeira Barros 3<sup>o</sup> avaliador  
Universidade Federal do Tocantins**

Documento assinado digitalmente



GLEDSON LUIZ SALGADO DE CASTRO  
Data: 13/10/2022 20:40:44-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Gledson Luiz Salgado de Castro 4<sup>o</sup> avaliador  
Universidade Federal Rural da Amazônia**

Eu dedico inicialmente a Deus. Aos meus pais, Lucas e Valdirene. Meus irmãos, Robson e Dagna. À minha namorada, Ana Cristina. Meus avós, José (In memoriam), Benedita e Tereza.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus em primeiro lugar pela minha vida e por me agraciar com tantas bênçãos. A Jesus por estar sempre ao meu lado intercedendo por mim. Ao Espírito Santo por ir sempre a minha frente preparando os meus caminhos.

Aos meus pais, Lucas e Valdirene, por acreditarem nos meus sonhos e confiarem em mim. Aos meus irmãos Robson e Dagna, por todo o apoio. A minha namorada, Ana Cristina, pelo seu apoio e confiança.

À UFRA e à PGAgro. A minha orientadora, Gisele Barata, pelo exemplo de profissional dedicada ao que faz e apaixonada pela região amazônica. Aos avaliadores, pela ajuda durante a correção dos manuscritos. A minha ilustre coautora Mariangela Hungria e maior inspiração de pesquisadora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Aos colegas do grupo de pesquisa do LPP e PGAgro pela troca de conhecimento. À empresa Juparanã, em nome de Williams e Rickson, por todo o apoio durante os experimentos de campo.

E tudo o que fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor, e não aos homens.

Colossenses 3: 23

## RESUMO GERAL

A necessidade de nitrogênio da soja pode ser atendida pela simbiose com cepas elite de *Bradyrhizobium*, aplicadas através da inoculação de sementes durante a semeadura. Diversas pesquisas têm buscado potencializar os benefícios dessa associação através da coinoculação da soja com outros microrganismos benéficos. Adicionalmente, a Amazônia é reconhecida como um bioma rico em microrganismos com potenciais benefícios às plantas. Diante disso, estabeleceu-se a hipótese de que a coinoculação de plantas de soja pode ser estendida a outros microrganismos promotores de crescimento, promovendo benefícios aos indicadores de produtividade e rentabilidade, além de possibilitar a melhoria do crescimento em solo com resíduo de mineração incorporada. Estudos de campo e casa de vegetação foram conduzidos durante os anos de 2020 e 2021 nos municípios de Paragominas e Belém, no estado do Pará. Inicialmente, os experimentos foram realizados para avaliar o potencial de uso de produtos comerciais para coinoculação da soja em alternativa à adubação fosfatada. Em seguida, buscou-se potencializar o uso da coinoculação utilizando cepas regionalizadas de microrganismos benéficos isolados da região amazônica brasileira. Por fim, foi testada a capacidade dos microrganismos regionalizados em associação com baixas quantidades de lama vermelha, um subproduto da produção de alumínio. A coinoculação com produtos comerciais à base de cepas de *Bacillus* e fungos micorrízicos arbusculares promoveu o aumento de rendimento e rentabilidade da soja. Já o uso de cepas regionalizadas (*Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*) promoveu aumento do volume radicular das plantas, rendimento, número de vagens, ramos reprodutivos, altura da planta e o lucro líquido, em comparação com a inoculação padrão, mas não influenciou as trocas gasosas pela planta. Quanto à associação de coinoculação com lama vermelha (LV), a interação do resíduo com a coinoculação promoveu mudanças na arquitetura radicular, elevando o percentual de raízes finas (<1 mm) em comprimento e volume. A coinoculação das plantas de soja com *Bradyrhizobium* e cepas de microrganismos benéficos, regionalizadas ou não, proporcionou incremento em crescimento, nutrição, rendimento e rentabilidade às plantas de soja. Além da importância voltada a maior produtividade da soja, a coinoculação pode se tornar uma peça chave para promoção de uma agricultura mais ambientalmente sustentável.

**Palavras-chave:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, *Trichoderma asperellum*.



## GENERAL ABSTRACT

The nitrogen requirement of soybean can be supplied by the symbiosis with elite strains of *Bradyrhizobium*, applied as inoculant at sowing. Several studies have searched for enhancement of these benefits by the co-inoculation of soybean with other beneficial microorganisms. Additionally, the Amazon is recognized as a biome rich in microorganisms with potential benefits to plants. Given this, the hypothesis of this study was that the co-inoculation of soybean plants can be extended to other plant-growth-promoting microorganisms, resulting in benefits to productivity, profitability, besides enabling the improvement of growth in soil with incorporated mining waste. Field and greenhouse studies were conducted during the years 2020 and 2021 in the municipalities of Paragominas and Belém, in the state of Pará, northern Brazil. Initially, experiments were conducted to evaluate the potential of using commercial products for soybean co-inoculation as an alternative to phosphate fertilization. Next, the objective was to enhance the use of co-inoculation using regionalized strains of beneficial microorganisms isolated from the Brazilian Amazon region. Finally, the ability of regionalized microorganisms in association with low amounts of red mud, a by-product of aluminum production was evaluated. Co-inoculation with commercial products based on strains of *Bacillus* and arbuscular mycorrhiza fungi promoted increased soybean yield and profitability. The use of regionalized strains (*Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens*) promoted an increase in root volume, yield, number of pods, reproductive branches, plant height and net profit, compared with standard inoculation, but did not affect gas exchange by the plants. As for the association of co-inoculation with red mud (RM), the interaction of the residue with the co-inoculation promoted changes in root architecture, increasing the percentage of fine roots (<1 mm) in length and volume. Co-inoculation of soy plants with *Bradyrhizobium* and strains of beneficial microorganisms, regionalized or not, provided increment in growth, nutrition, yield and profitability to soy plants. In addition to the importance of higher soybean productivity, co-inoculation may become a key-element to promote a more environmentally sustainable agriculture.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, *Trichoderma asperellum*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 2

Figura 1. Localização geográfica dos campos experimentais (Paragominas-PA) e casa de vegetação (Belém-PA). .....	48
Figura 2. Dados médios de precipitação e temperatura da área experimental durante 2020 e 2021. ....	49
Figura 3. Altura de plantas (a), inserção de primeira vagem (b), vagens (c), grãos (d), grãos por vagem (e), ramos reprodutivos (f), peso de 1000 grãos (g) e rendimento (h) de soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de <i>Bacillus</i> e coinoculação com micorriza arbuscular em 2020. ....	53
Figura 4. altura de plantas (a), inserção da primeira vagem (b), vagens (c), grãos (d), grãos por vagem (e), ramos reprodutivos (f), peso de 1000 grãos (g) e rendimento de grãos (h) de plantas de soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de <i>Bacillus</i> e coinoculação com micorriza arbuscular em 2021. ....	55
Figura 5. Teor foliar de macronutrientes e micronutrientes em soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de <i>Bacillus</i> e coinoculação com micorriza arbuscular em 2020. ....	56
Figura 6. Teor foliar de macronutrientes e micronutrientes em soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de <i>Bacillus</i> e coinoculação com micorriza arbuscular em 2021. ....	57

### Capítulo 3

Figura 1. Localização geográfica do campo experimental no município de Paragominas e casa de vegetação no município de Belém. ....	76
Figura 2. Dados de precipitação e temperatura da área experimental durante os anos de 2020 e 2021. ....	80
Figura 3. Conteúdo total de macronutrientes em plantas de soja coinoculadas com microrganismos benéficos isolados de solo amazônico, em casa de vegetação. ....	83
Figura 4. Conteúdo total de micronutrientes em plantas de soja coinoculadas com microrganismos benéficos do solo isolados da Amazônia, em casa de vegetação. .	85
Figura 5. Teor de macronutrientes foliares de plantas de soja coinoculada com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, sob condições de campo nos anos 2020 (a, b, c, d, e e f) e 2021 (g, h, i, j, k e l).. ....	86

Figura 6. Teor de micronutrientes foliares de plantas de soja coinoculadas com microrganismos benéficos isolados de solo amazônico, sob condições de campo nos anos 2020 (a, b, c, d, e, f) e 2021 (g, h, i, j, k, e l).....	87
Figura 7. Altura de plantas (a), inserção da primeira vagem (b), vagens (c), grãos (d), grãos por vagem (e), ramos reprodutivos (f), peso de 1000 grãos (g) e rendimento de grãos (h) de plantas de soja com fertilização fosfatada e coinoculadas com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, em condições de campo (2020).....	89
Figura 8. Altura de plantas (a), inserção da primeira vagem (b), vagens (c), grãos (d), grãos por vagem (e), ramos reprodutivos (f), peso de 1000 grãos (g) e rendimento de grãos (h) de plantas de soja com fertilização fosfatada e coinoculadas com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, em condições de campo (2021).....	90
Figura 9. Custos fixos, variáveis, operacionais e totais das plantas de soja submetidas a fertilização fosfatada e coinoculação com microrganismos benéficos isolados dos solos amazônicos, sob condições de campo nos anos de 2020 (a) e 2021 (b). ....	92
Figura 10. Indicadores de rentabilidade da cultura da soja em função da fertilização fosfatada e coinoculação com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, em condições de campo durante os anos 2020 (a, b, c, e d) e 2021 (e, f, g, e h).....	93
Figura 11. Mapa de calor da correlação da Pearson entre crescimento, produção e parâmetros nutricionais das plantas de soja em condições de campo nos anos de 2020 (a) e 2021 (b).....	95

#### **Capítulo 4**

Figura 1. Cultivo de microrganismos isolados da Amazônia em meio de cultura sem incorporação de LV (linha superior) e com 1% de LV incorporada (linha inferior)...	116
Figura 2. Trocas gasosas de plantas de soja inoculadas com microrganismos isolados da Amazônia em solo com lama vermelha. -LV = sem aplicação de lama vermelha; + LV = com aplicação de 1% de lama vermelha. ....	120
Figura 3. Fluorescência da clorofila a em folhas de soja inoculada com microrganismos isolados da Amazônia em solo com lama vermelha. -LV = sem aplicação de lama vermelha.....	121

Figura 4. Comprimento (a), volume (b) diâmetro (c), massa seca (d) e porcentagem de classes radiculares em comprimento (e) e volume (f) em soja co-inoculada com microrganismos isolados da Amazônia em solo com lama vermelha. ....	123
Figura 5. Análise de Componentes principais das variáveis de crescimento (a), trocas gasosas e fluorescência da clorofila (b) e arquitetura radicular (c) de plantas de soja coinoculadas com microrganismos isolados da Amazônia em solo com resíduo de bauxita.....	125
Figura 6. Mapa de calor da correlação de Pearson das variáveis avaliadas de plantas de soja coinoculadas com microrganismos isolados da Amazônia em solo com resíduo de bauxita.....	126

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo (camada 0-20 cm) usado nos experimentos de campos. ....	47
Tabela 2. Rentabilidade da cultura da soja em função da inoculação padrão, coinoculação com cepas <i>Bacillus</i> e coinoculação com micorriza arbuscular durante os anos de 2020 e 2021.....	58
Tabela 3. Conteúdo de clorofilas, massa seca da parte aérea, número de nódulos, peso seco dos nódulos, volume e peso seco das raízes das plantas de soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de <i>Bacillus</i> e coinoculação com micorriza arbuscular em casa de vegetação.....	59

### Capítulo 3

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo (camada 0-20 cm) usado nos experimentos de casa de vegetação e campo. ....	77
Tabela 2. Parâmetros de crescimento, nodulação e raízes de plantas de soja coinoculadas com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, em casa de vegetação.....	84

### Capítulo 4

Tabela 1. Análise bioquímica de síntese de AIA, solubilização de fosfato e produção de sideróforos pelos isolados de <i>Trichoderma asperellum</i> and <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	115
Tabela 2. Atributos químicos e físicos do solo e solo com 1% de lama vermelha..	116
Tabela 3. Parâmetros de crescimento e nódulos de soja coinoculada com microrganismos isolados da Amazônia em solo com lama vermelha. ....	122

## LISTA DE ABREVIações

**FBN** - Fixação Biológica de Nitrogênio

**MPCPs** - Microrganismos Promotores de Crescimento em Plantas

**DO** - Densidade ótica

**UFC** - Unidade Formadora de Colônias

**PDA** - Potato dextrose agar

**DAS** - Dias após a semeadura

**ICP-AES** - Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy

**CO** - Custo operacional

**LL** - Lucro líquido

**CT** - Custo total

**IL** - Índice de lucratividade

**AC** - Acréscimo da coinoculação

**IAA** - Ácido indol-acético

**6PP** - 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone

**COV** - Composto orgânico volátil

**ck** - Citoquinina

**ACC** - 1-carboxylic acid-1-aminocyclopropane

**ABA** - Ácido abscísico

**AP** - Altura de plantas

**AIPV** - Altura de inserção de primeira vagem

**RR** - Ramos reprodutivos

**G/V** - Grãos/vagens

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	8
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	9
<b>CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	15
<b>HIPÓTESE</b> .....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	17
<b>Geral</b> .....	17
<b>Específicos</b> .....	17
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	18
1 Revisão bibliográfica .....	21
1.1 Aspectos morfológicos e cultivo da soja .....	21
<b>1.1.2 Cultivo de soja no brasil</b> .....	22
<b>1.1.3 Cultivo de soja no estado do pará</b> .....	24
1.2 Associação de soja com microrganismos benéficos .....	25
<b>1.2.1 Inoculação</b> .....	25
<b>1.2.2 Coinoculação</b> .....	26
1.3 Coinoculação de plantas sob solo contaminado com metais pesados .....	30
1.4 Cepas de microrganismos isolados da amazônia em associação com plantas ..	32
Referências Bibliográficas .....	33
<b>2 AUMENTO DE RENDIMENTO, TEOR DE NUTRIENTE FOLIAR E RENTABILIDADE DA SOJA COINOCULADA COM CEPAS DE <i>BACILLUS</i> E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES</b> .....	43
Resumo .....	43
abstract .....	44
2.1 introdução .....	45
2.2 material e métodos .....	47
2.3 resultados .....	52
2.4 discussão .....	60
2.5 conclusões .....	64
referências bibliográficas .....	64
<b>3 A COINOCULAÇÃO DA SOJA COM <i>BRADYRHIZOBIUM</i> SPP. E CEPAS AMAZÔNICAS DE <i>TRICHODERMA ASPERELLUM</i> E <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> AUMENTA A PRODUTIVIDADE E A RENTABILIDADE DA CULTURA</b> .....	72

<b>Resumo .....</b>	<b>72</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>73</b>
<b>3.1 Introdução.....</b>	<b>74</b>
<b>3.2 Material e métodos.....</b>	<b>76</b>
<b>3.3 Resultados .....</b>	<b>83</b>
<b>3.4 Discussão .....</b>	<b>95</b>
<b>3.5 Conclusões .....</b>	<b>100</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>101</b>
<b>4 DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO E ARQUITETURA RADICULAR DA SOJA COINOCULADA COM CEPAS AMAZÔNICAS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À APLICAÇÃO DE LAMA VERMELHA .....</b>	<b>110</b>
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>112</b>
<b>4.2 Material e Métodos .....</b>	<b>114</b>
<b>4.3 Resultados .....</b>	<b>120</b>
<b>4.4 Discussão .....</b>	<b>126</b>
<b>4.5 Conclusões .....</b>	<b>132</b>
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>133</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>140</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>141</b>



## CONTEXTUALIZAÇÃO

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é uma cultura de importância global e uma das mais amplamente cultivadas no mundo, com dupla aptidão como fonte de proteína e óleo, utilizada para consumo humano e animal e para fins industriais (SINGH, 2010). Na safra 2020/2021 a cultura ocupou uma área de 126,9 milhões de hectares no mundo, com uma produção de 353,4 megatoneladas. (FAOSTAT, 2021).

O Brasil é o maior produtor mundial desta oleaginosa, com uma área cultivada prevista de 40,4 milhões de hectares e 140,5 megatoneladas colhidas na safra 2021/2022 (CONAB, 2022). Parte do sucesso da soja brasileira se deve à economia de não utilizar fertilizantes nitrogenados (DÖBEREINER, 1997; HUNGRIA *et al.*, 2006). A necessidade de nitrogênio da soja é atendida pela simbiose com cepas elite de *Bradyrhizobium*, aplicadas através da inoculação da semente no momento da semeadura (RODRIGUES *et al.*, 2020). Além de economicamente viável, a inoculação da soja está de acordo com a demanda global por sistemas agrícolas mais sustentáveis (DÖBEREINER, 1997; HUNGRIA *et al.*, 2006; REIS JUNIOR *et al.*, 2011).

Como a inoculação é uma prática estabelecida e consolidada nas regiões brasileiras produtoras de soja, vários estudos têm procurado aumentar os benefícios desta associação através de um processo reconhecido como coinoculação (HUNGRIA, NOGUEIRA e ARAÚJO, 2013; BONONI *et al.*, 2020; RONDINA *et al.*, 2020). A coinoculação consiste em adicionar mais de um microrganismo benéfico às plantas para maximizar o seu desenvolvimento (FILIPINI *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020a, b).

A coinoculação da soja tem sido adotada pelos agricultores brasileiros nos últimos anos, através do uso das cepas Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* (SANTOS, NOGUEIRA e HUNGRIA, 2021). Uma meta-análise recente, com dados obtidos em experimentos de campo no Brasil, revelou que a coinoculação de soja com *A. brasilense* promove benefícios como aumento da massa radicular, número de nódulos, massa de nódulos, concentração de N na parte aérea e raiz, em produtividade e maior tolerância a estresses abióticos em comparação com a inoculação padrão (BARBOSA *et al.*, 2021). Rondina *et al.* (2020) também relataram que a coinoculação com *A. brasilense* promove melhorias nas características

morfológicas das raízes, aumento da capacidade da planta para superar o estresse hídrico em solos arenosos e maior rendimento em soja.

O uso de outros microrganismos benéficos na coinoculação da soja também tem sido destacado por outros autores. Estudos têm verificado o uso potencial de *Bacillus subtilis* na coinoculação da soja, relatando aumentos no rendimento, biomassa, qualidade dos grãos, número de nódulos, total de N na planta e melhorias na arquitetura das raízes (ARAUJO; HUNGRIA, 1999; ATIENO *et al.*, 2012; PRAKAMHANG *et al.*, 2015; MORETTI *et al.* 2020a, 2020b, 2021; ARAUJO *et al.*, 2021).

Com o uso de vários microrganismos na coinoculação da soja (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Serratia* sp. *A. brasilense* e *Trichoderma asperellum*), Silva *et al.* (2020a, 2020b) observaram que a coinoculação promoveu melhorias nas trocas gasosas, biomassa total (parte aérea e raízes) e conteúdo de macronutrientes, em comparação com a inoculação simples com *Bradyrhizobium*. Em estudos com a coinoculação da soja com a *B. amyloliquefaciens* (cepa LL2012) Masciarelli, Llanese e Luna (2014) afirmaram que a coinoculação alterou os parâmetros de crescimento das plantas e promoveu uma maior nodulação, tornando o seu uso atrativo para formulações em inoculantes comerciais.

Além da promoção do crescimento, podem ser selecionados microrganismos com a capacidade de promover outros benefícios para as plantas, como conferir às plantas maior tolerância a fatores bióticos e abióticos. Por exemplo, diversos estudos têm sido conduzidos com uso da coinoculação de microrganismos benéficos para melhoria da qualidade de plantas cultivadas em solos contaminados com metais potencialmente tóxicos (JU *et al.*, 2019; JU *et al.*, 2020; NEVHULAUDZI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021). Além disso, a aplicação de microrganismos em solos contaminados pode possibilitar a conversão de metais pesados tóxicos para outras formas não tóxicas ou menos biodisponíveis, reduzindo a fitotoxicidade (SINGH; CAMEOTRA, 2004; BANDARA *et al.*, 2017).

Assim, a diversidade de microrganismos benéficos com capacidade de aplicação em coinoculação da soja possibilita a realização de estudos visando maior produtividade da cultura e, também, aplicação em situações de estresses abióticos, como solos contaminados com metais potencialmente tóxicos.

## Hipótese

Microrganismos promotores do crescimento de plantas utilizados em coinoculação com *Bradyrhizobium* na soja podem promover ganhos de produtividade e rentabilidade e melhorar o crescimento das plantas em condições de estresse abiótico, em solos com resíduo de mineração.

## Objetivos

### Geral

Avaliar os benefícios da coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e outros Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas.

### Específicos

- Avaliar a coinoculação de soja com cepas de *Bacillus* e fungos micorrízicos arbusculares em dois níveis de fertilização fosfatada.
- Avaliar a coinoculação de plantas de soja com *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, com e sem fertilização fosfatada.
- Avaliar a aplicação da lama vermelha em solo utilizado para revegetação de áreas contaminadas associada à coinoculação da soja com cepas de microrganismos promotores de crescimento, isolados da Amazônia.

## Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, F.F. *et al.* *Bacillus subtilis* changes the root architecture of soybean grown on nutrient-poor substrate. **Rhizosphere**, v. 18, e100348, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100348>
- ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.9, p.1633-1643, set. 1999.
- ATIENO, M.; HERRMANN, L.; OKALEBO, R.; LESUEUR, D. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2541–2550, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1062-x>
- BANDARA, T. *et al.* Role of woody biochar and fungal-bacterial co-inoculation on enzyme activity and metal immobilization in serpentine soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 17, p. 665–673, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1243-y>
- BARBOSA, J.Z. *et al.* Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, e103913, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>
- BONONI L. *et al.* Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, v. 10, e2858, 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8>
- CASTRO, G.L.S. *et al.* Açai palm seedling growth promotion by rhizobacteria inoculation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 205–216, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00159-2>
- CONAB (National Supply Company). **Monitoring of the Brazilian grain harvest**. Brasília: Conab, 2022; 04. Available at: <http://www.conab.gov.br> Accessed at: January 2022.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00226-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00226-X)
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **World soybean production in 2021**. Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> Accessed at: January 2022.
- FERRAREZI, J.A. *et al.* Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria from the Brazilian Amazon on the bacterial community associated with maize in field. **Applied Soil Ecology**, v. 170, e104297, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104297>
- FILIPINI, L.D. *et al.* Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of**

**Microbiology**, v. 203, p. 1033–1038, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>

FRANÇA, S.K.S. *et al.* Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. **Agronomy for Sustainability Development**, v. 35, p. 317–324, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0244-3>

HUNGRIA M. *et al.* Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86 n. 4, p. 927-939, 2006. <http://dx.doi.org/10.4141/P05-098>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791–801, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

JU, W. *et al.* Co-inoculation effect of plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on EDDS assisted phytoremediation of Cu contaminated soils. **Chemosphere**, v. 254, e126724, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126724>

JU, W. *et al.* Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, n. 15, p. 218-226, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.016>

LIMA, J.V. *et al.* Hormonal imbalance triggered by rhizobacteria enhance nutrient use efficiency and biomass in oil palm. **Scientia Horticulturae**, v. 264, e109161, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109161>

MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. **Microbiological Research**, v. 169, p. 609–615, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.001>

MORETTI, L.V. *et al.* Bacterial consortium and microbial metabolites increase grain quality and soybean yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v. 20, p. 1923-1934, 2020a. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00263-5>

MORETTI, L.V. *et al.* Beneficial microbial species and metabolites alleviate soybean oxidative damage and increase grain yield during short dry spells. **European Journal of Agronomy**, p. 127, e126293, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2021.126293>

MORETTI, L.V. *et al.* Effects of growth-promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield. **Agronomy Journal**, v. 112, n. 1, p. 418-428, 2020b.

NEVHULAUDZI, T. *et al.* Interaction effect of *Bacillus subtilis* co-inoculation and mine water irrigation on cowpea's growth, physiology and nutritional quality. **Scientific African**, v. 9, e00541, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00541>

PRAKAMHANG, J. *et al.* Proposed some interactions at molecular level of PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on

soybean symbiosis and its potential of field application. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 38-49, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.009>

REIS JUNIOR, F.B. *et al.* Biological nitrogen fixation: a revolution in agriculture. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JUNIOR, F.B. (ed.). **Biotechnology: state of the art and applications in agriculture**. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF. p. 247-281, 2011.

RODRIGUES, T.F. *et al.* Impact of pesticides in properties of *Bradyrhizobium* spp. and in the symbiotic performance with soybean. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 172, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-020-02949-5>

RONDINA, A.B.L. *et al.* Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 537-549, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

ROSA, L. H. **Neotropical endophytic fungi: diversity, ecology, and biotechnological applications**. Springer, Cham, 2021. 395p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-53506-3>

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, e0200128, 2021. <https://doi.org/10.36783/18069657rbc20200128>

SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, n. 2, p. 291–297, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.155>

SINGH, G. **The soybean: botany, production and uses**. CAB International. Ludhiana, India; 2010, 506p. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845936440.0024>

SILVA, M.A. *et al.* Screening of beneficial microorganisms to improve soybean growth and yield. **Braz. Archives of Biology and Technology**, v. 63, e20190463, 2020a. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190463>

SILVA, M.A., *et al.* Individual and combined growth-promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. **Caatinga**, v. 33, n. 3, p. 619-632, 2020b. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252020v33n305rc>

WANG, X. *et al.* Improvement of alfalfa resistance against Cd stress through rhizobia and arbuscular mycorrhiza fungi co-inoculation in Cd-contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 277, e116758, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116758>

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Aspectos morfológicos e cultivo da soja

A soja cultivada [*Glycine max* (L.) Merrill] tem origem na região leste da Ásia, especificamente no nordeste da China, também conhecida como região da Manchúria (HYMOWITZ, 1970; SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). A soja, hoje cultivada em todo mundo, difere bastante de seus ancestrais de origem, pois era uma planta rasteira. Sua evolução ocorreu através do cruzamento natural de duas espécies selvagens. Sendo conhecida como um grão sagrado há mais de 5 mil anos no oriente, sua exploração como alimento no Ocidente foi ignorada até a segunda década do século 20. A partir dessa data, iniciou-se sua exploração comercial pelos Estados Unidos, inicialmente como forrageira e, finalmente, como grão (DALL'AGNOL et al., 2007).

A planta de soja é uma herbácea dicotiledônea anual, com germinação epígea, ciclo de vida variando de 70 a 200 dias, altura de plantas de 30 a 250 cm, inserção de primeira vagem de 10 a 20 cm, hábito de crescimento ereto e prostrado, crescimento determinado, semideterminado e indeterminado, resistência à deiscência de vagens, grupo de maturidade relativa (000 a 10 no mundo), hastes e vagens pubescentes na cor cinza ou marrom, com boa qualidade visual e fisiológica de sementes, resistência a pragas, doenças, herbicidas e alta produtividade (MATSUO; FERREIRA e SEDIYAMA, 2015).

É uma cultura de importância global e uma das mais cultivadas em todo o mundo, rica em óleo e proteínas, sendo utilizada para consumo humano, animal e fins industriais (SINGH, 2010). Os dois principais produtos do beneficiamento da soja são o óleo e farelo, sendo que este segundo é o principal produto oriundo do esmagamento da soja, destinado, em parte, para a cadeia produtiva de carnes (insumos fundamentais na elaboração de ração animal) na alimentação de bovinos, suínos, aves, animais domésticos, peixes e bezerros, podendo ser considerado um substituto do leite nesse último caso (SOUZA; BACCHI; ALVES, 2019). Já o óleo de soja é usado na alimentação direta de seres humanos e a principal fonte de lipídios usada na produção de biodiesel (SOUZA; BACCHI e ALVES, 2019; VIEIRA; NADALETI e SARTO, 2021; ZHANG et al., 2021).

Produtos à base de soja vêm sendo cada dia mais difundidos por todo o mundo, pelo fato dessa leguminosa ser rica em proteínas, com valor nutricional equivalente à proteína animal (GUO, 2009). Das diversas finalidades possíveis à base de soja, têm-

se alimentícias como tofu, leite de soja, margarinas, também para suplementos, anticorrosivos, detergentes, produtos farmacêuticos, plásticos, papéis, tintas, vernizes, pesticidas, cosméticos, entre outros (BARRETT, 2006; GUO, 2009; PRATAP et al., 2011; ZHANG: QIN, 2019). Além disso, alimentos à base de soja contêm uma variedade de componentes bioativos como saponinas, inibidores de protease, ácido fítico e isoflavonas (BARRETT, 2006).

A safra 2019/2020 de soja ocupou uma área plantada de 122,647 milhões de hectares em todo o mundo, com produção global de 337,298 megatoneladas (USDA, 2021). Os principais países produtores de soja são Brasil, Estados Unidos, Argentina, China, Índia e Paraguai (USDA, 2021). Quanto aos principais exportadores, são Brasil, Estados Unidos, Argentina e Paraguai. Já os importadores são China, União Europeia, México, Egito e Argentina.

#### 1.1.2 Cultivo de soja no Brasil

A história desse grão no país se iniciou em 1882, com introdução dos materiais genéticos oriundos dos Estados Unidos e testagem no estado da Bahia (GAVIOLI, 2013). Posteriormente, foram implantados alguns estudos experimentais no estado de São Paulo, porém, apenas décadas depois (em 1940) a soja foi cultivada comercialmente na região sul (HUNGRIA et al., 2005). Diferente do que ocorre hoje, a produção de soja era pouco expressiva até meados do ano de 1950, sendo consumida como forragem para bovinos ou como grão na engorda de suínos em pequenas propriedades do interior gaúcho (DALL'AGNOL et al., 2007).

A partir de 1970 a soja começou a se expandir no país e passou a se destacar na produção do grão, passando de 1,5 megatoneladas (Mt) em 1970 para mais de 15,0 Mt em 1979, devido ao aumento de hectares cultivados (1,3 para 8,8 milhões) mas, também, da produtividade (1140 para 1730 kg/ha), proporcionado pela disponibilização de novas tecnologias aos produtores (EMBRAPA, 2004). Essa expansão teve início nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (DOMINGUES; BERMANN, 2012). A partir da década de 1980, a soja começou a se expandir para a região do Cerrado brasileiro no centro do país e, em 1990 a região central já tinha destaque no cultivo desse grão, devido a expansão da cultura (DOMINGUES; BERMANN, 2012).

A grande expansão para a região do Cerrado brasileiro se deu devido a fatores como: baixo valor da terra; topografia e condições físicas do solo favoráveis à



mecanização, regime pluviométrico favorável, sistema cooperativista dinâmico e eficiente; melhorias no sistema de transportes; incentivos fiscais, um mercado internacional em alta e diversas pesquisas voltadas a melhoria da qualidade química do solo e seleção genética (EMBRAPA, 2004; DOMINGUES; BERMANN, 2012).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de soja com 137,3 megatoneladas colhidas em uma área de 38,9 milhões de hectares para a safra 2020/2021 (CONAB, 2021). Os atuais principais estados brasileiros produtores de soja são Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul e Bahia, com 80% da produção total brasileira do grão na safra 2020/2021 (CONAB, 2021). As principais regiões brasileiras produtoras de soja são, respectivamente, Centro-Oeste, Sul, Nordeste e Sudeste, sendo a região Norte a que possui menor participação da produção do grão (CONAB, 2021). No entanto, a região Norte tem apresentado elevado crescimento nos últimos anos, principalmente nos estados do Tocantins, Pará e Roraima (CONAB, 2021).

Devido à recente expansão na soja na região Norte, a agricultura é constantemente criticada por ativistas e algumas autoridades mundiais como sendo uma atividade contribuinte para o desmatamento da floresta amazônica (DOMINGUES; BERMANN, 2012), maior bioma da região. De fato, algumas regiões alocadas na Amazônia brasileira estão sendo ocupadas por extensas lavouras de soja, porém, em sua maioria se trata de áreas de pastagens degradadas e culturas abandonadas. Nesses casos, o cultivo de soja visa à recuperação do solo degradado, com correto manejo do solo, incorporação de matéria orgânica e reposição da fertilidade do solo. Ademais, Brandão, Rezende e Marques (2006) mencionam sobre a inviabilidade de abrir-se uma área de floresta para execução de cultivo de soja, sendo necessários vários anos com alguma outra atividade anterior (pastagens, principalmente) para que a área esteja passível da implantação da soja.

Segundo Rivero et al. (2009), o desmatamento na região amazônica tem sido causado pela atividade pecuária, agricultura de corte e queima ou associada à exploração madeireira. Esses autores relatam em seus resultados que houve baixa correlação entre a variável soja e o desmatamento, evidenciando o pouco impacto desse tipo de cultivo sobre a ocupação de novas áreas na Amazônia. Estudos mais recentes sobre a expansão da soja na América Latina demonstram que, em sua maioria, ela ocorreu em áreas que eram destinadas à produção de gado (SONG et al., 2021). Além disso, a partir do ano de 2006 foi estabelecido um tratado voluntário

entre os principais exportadores de soja brasileira, que consistia em não comprar soja cultivada em áreas desmatadas a partir daquele ano (moratória da soja) (GIBBS et al., 2015).

A elevada produção de soja brasileira é, em grande, parte justificada por um aumento constante de produtividade sem grandes alterações de área cultivada. Nos últimos dez anos, a área cultivada com a soja no país teve um aumento de 14,3 milhões hectares, enquanto a produção do grão saltou de 74,8 para 133,8 Mt anuais (CONAB, 2021).

### 1.1.3 Cultivo de soja no estado do Pará

O estado do Pará tem sido um exemplo típico de fronteira agrícola na região Amazônica, inicialmente com exploração de madeira, mineração e pecuária extensiva e, mais recentemente, por cultivo de soja em antigas áreas de pastagens (SAUER, 2018). No estado, o cultivo de soja teve início em meados da década de 1990, especificamente na região de Santarém (SAUER, 2018; HAMID et al., 2021).

A partir de 1990 produtores de grãos das regiões Centro e Sul do país, que possuíam experiência e capital, migraram para o entorno da região de Santarém, atraídos por fatores como: desenvolvimento de cultivares de soja adaptadas às características da área; logística facilitada; aptidão agrícola regional; aumento do valor internacional da soja; baixos preços da terra e incentivos governamentais (FILGUEIRAS; FERREIRA; SANTANA, 2007; COELHO et al., 2021; HAMID et al., 2021). Mais adiante, em 2003, houve uma melhora das condições logísticas, pela instalação do porto graneleiro multinacional Cargill (COELHO et al., 2021). Outro fator que contribui fortemente para a atual migração de produtores para o estado é o excelente regime de chuvas na região, visto que problemas com veranicos são constantes e ocorrem cada vez mais no centro e sul do país.

No ano safra 2020/2021 foram colhidos 2,2 Mt de grãos de soja no estado, alocando-o como o 12º maior produtor de soja no Brasil (CONAB, 2021). Os principais polos produtores do grão no estado são as regiões de Paragominas, Santana do Araguaia, Santarém, Conceição do Araguaia e São Félix do Xingu (HAMID et al., 2021). Apesar da baixa produção do estado frente aos grandes polos produtores do grão, diversos estudos ressaltam a rápida expansão do grão, com crescimento acima da média nacional e comparável a importantes fronteiras agrícolas do país, como a região do MATOPIBA (SAUER; PIETRAFESA, 2013; LEITE et al., 2015). Por

exemplo, entre 2011 e 2021 a área cultivada com soja no estado foi de 105,8 mil hectares para 731,9 mil hectares, representado um crescimento de 691,7% em área plantada (CONAB, 2021; IBGE, 2022). Assim, a expansão da sojicultura no estado é de grande expressão no cenário nacional, atribuindo ao estado o status de nova fronteira agrícola, não só pela elevada taxa de crescimento da produção, mas também pela região ser uma importante rota de escoamento (HAMID et al., 2021).

## **1.2 Associação de soja com microrganismos benéficos**

### **1.2.1 Inoculação**

Diversas espécies de leguminosas podem ter sua demanda por nitrogênio atendida através de relações simbióticas com bactérias capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) nos nódulos radiculares (WANG et al., 2021). A FBN é um processo chave para a sustentabilidade agrícola do cultivo de leguminosas, devido ao seu baixo impacto no ambiente em comparação à utilização de fertilizantes nitrogenados (VIEIRA, 2017). A simbiose entre leguminosas e rizóbios não é obrigatória, porém, em condições limitantes de nitrogênio (N) no solo, a interação entre micro e macrossimbiontes é estimulada (TAIZ et al., 2017).

O estabelecimento da simbiose ocorre em um processo onde há intensa troca de sinais moleculares. Segundo Taiz et al. (2017), inicialmente são secretadas (iso)flavonoides e betaínas pelas raízes das plantas, promovendo a migração de bactérias coletivamente reconhecidas como rizóbios para as raízes. No rizóbio, os atrativos gerados ativam a proteína do rizóbio *NodD*, que induz a transcrição de outros genes de nodulação, genes *nod*, responsáveis pela codificação das proteínas de nodulação. Moléculas são sintetizadas pelos rizóbios como resultado da expressão do gene *nod*, sendo denominadas como fatores de nodulação, ou fatores Nod, e são liberadas e receptadas pela planta hospedeira. Como resultado, ocorre um pronunciado enrolamento das células dos pelos radiculares, fazendo com que os rizóbios fiquem envolvidos pelo compartimento formado por esse enrolamento. Simultaneamente ao compartimento formado, a parede celular do pelo radicular é degradada em resposta aos fatores Nod, permitindo às células bacterianas o acesso direto à superfície externa da membrana plasmática.

Posteriormente, ainda de acordo com Taiz et al. (2017), ocorre a formação de um canal de infecção (uma extensão interna tubular da membrana plasmática, produzida pela fusão de vesículas derivadas do Golgi no local da infecção) que,

preenchido pelos rizóbios em proliferação, alonga-se através do pelo da raiz e das camadas de células corticais em direção ao primórdio nodular (uma área distinta no córtex, formado pelas células corticais que se desdiferenciam e iniciam a divisão). Em seguida, as células bacterianas são liberadas no citoplasma (possível pois a extremidade do canal de infecção se funde com a membrana plasmática de uma célula hospedeira e penetra no citoplasma), circundadas pela membrana plasmática da célula hospedeira, resultando na formação do simbiossomo, uma organela especializada. Após um sinal específico da planta, as bactérias presentes no interior desse simbiossomo que permaneciam se dividindo, cessam a divisão e começam a se diferenciar em bacteroides fixadores de nitrogênio.

Formados os nódulos, a planta hospedeira fornece às bacteroides fontes de carbono e ambiente adequado para FBN. Ao passo que os bacteroides, através da enzima nitrogenase, realizam a redução de  $N_2$  a  $2 NH_3$ , ao custo de  $8 e^-$ ,  $8 H^+$  e  $16ATPs$ ; a seguir,  $NH_3$  é transformado em  $NH_4^+$ , no ambiente aquoso do citoplasma (DIXON; KAHN, 2004; VIEIRA, 2017). Nos nódulos, os íons amônio, =produzida pelos bacteroides é exportada para a célula hospedeira via seiva do xilema, principalmente como ureídeos (alantoína e ácido alantóico) (VIEIRA, 2017; BARBOSA et al., 2021).

Segundo estudos de campo baseados em análises isotópicas ( $^{15}N$ ), as taxas de fixação de nitrogênio na soja podem alcançar até  $372 kg ha^{-1}$  (CIAMPITTI; SALVAGOTTI, 2018). Santos, Nogueira e Hungria (2019) estimam que 20 bilhões de dólares são economizados todos os anos pelo não uso de fertilizantes nitrogenados na soja. Visando garantir a eficiência da FBN e o não uso do fertilizante nitrogenado na soja, anualmente é realizada a inoculação na semeadura da soja com cepas elites de *Bradyrhizobium* (DÖBEREINER, 1997; HUNGRIA; MENDES, 2015).

### 1.2.2 Coinoculação

Com base no sucesso da inoculação das plantas de soja com rizóbios, diversos estudos têm buscado elevar os benefícios da associação soja-microrganismos através da coinoculação (LEITE et al., 2019; BARBOSA et al., 2021). A prática de coinoculação consiste na adição de mais de um microrganismo benéfico às plantas, a fim de otimizar o seu crescimento (FILIPINI et al., 2021; BARBOSA et al., 2021). O objetivo dessa técnica é aliar o benefício da inoculação com rizóbios na FBN, com outros mecanismos fornecidos pelos microrganismos coinoculados. Estes podem proporcionar benefícios como potencializar FBN (DÖBEREINER, 1997), solubilização

de fosfato (MAHANTA et al., 2014) e potássio (BASAK; BISWAS, 2010; BASAK et al., 2020), produção de sideróforos (LI; CHEN; BRUNER, 2016; YADAV et al., 2020) e síntese de fitohormônios (FUKAMI; CERZIN; HUNGRIA, 2018).

- Fixação biológica de Nitrogênio: semelhante a espécies de rizóbios, algumas bactérias promotoras de crescimento em plantas, com destaque para *A. brasilense*, possuem capacidade de fixar biologicamente o N<sub>2</sub> atmosférico e disponibilizá-lo para planta (DÖBEREINER; MARRIEL; NERY, 1976; LI; ALEXANDER, 1988). Assim, quando coinoculadas em plantas, essas bactérias podem proporcionar benefícios como maior número de nódulos e conteúdo de N na planta (MORETTI et al., 2021).
- Solubilização de fosfato: a coinoculação com microrganismos solubilizadores de fosfato pode disponibilizar parte do fósforo retido no solo às plantas de soja. Estes microrganismos podem atuar na liberação de compostos quelantes ou solventes minerais como ânions ácidos orgânicos, sideróforos, prótons, íons hidroxila e CO<sub>2</sub>; liberação de enzimas extracelulares como fosfatases ácidas não específicas, fitases, fosfonatases e C-P liases; e na liberação de P durante degradação de exopolissacarídeos (YI; HUANG; GE, 2008; SHARMA et al., 2013). Além disso, uma maior absorção de fósforo (P), água e outros nutrientes é relacionada com maior volume radicular e, conseqüentemente maior capacidade de exploração no solo.
- Solubilização de potássio (K): no solo, existem minerais compostos por nutrientes, entre estes o K, que permanecem indisponíveis às plantas (BASAK; BISWAS, 2010). Alguns microrganismos são reconhecidos pela capacidade de solubilização de K desses minerais através da liberação de ácidos orgânicos no solo, desempenhando um papel chave no aumento do fornecimento de K às plantas (BASAK et al., 2020; LODI et al., 2022). Ademais, fungos filamentosos podem exercer forças biofísicas que levam à ruptura dos minerais, reduzindo o tamanho das partículas e, conseqüentemente, criando superfícies reativas (OLIVEIRA-PAIVA et al., 2022).
- Sideróforos: são produtos naturais complexos e estruturalmente diversos, constituídos por aminoácidos e formam complexos estáveis com metais, especialmente Fe<sup>3+</sup>, com extraordinária especificidade e afinidade (LI; CHEN; BRUNER, 2016; TAIZ et al., 2017). A coinoculação com microrganismos

produtores de sideróforos pode beneficiar o crescimento das plantas (CHATTERJEE et al., 2012). Além disso, sideróforos são conhecidos por quelar e mobilizar vários outros metais, promovendo benefícios em solos contaminados (GHOSH; BERA; CHAKRABARTY, 2020; KHAN et al., 2020).

- Síntese de fitormônios: são compostos sinalizadores que regulam aspectos cruciais do crescimento, diferenciação e desenvolvimento (DAVIES, 2010; WAADT et al., 2022). Em coinoculação de plantas de soja com microrganismos capazes de produzir ou estimular a produção de hormônios vegetais, podem ocorrer diversas modificações nas plantas, como maior produção de biomassa de raízes e parte aérea, maior ramificação, rendimento de grãos, modificações na arquitetura radicular, entre outros (FUKAMI; CERZIN; HUNGRIA, 2018; RONDINA et al., 2020; MORETTI et al., 2021). Além disso, alterações no balanço hormonal da planta podem interferir na resposta da planta pelo ataque de herbívoros, patógenos e estresses abióticos (TAIZ et al., 2017).

A bactéria *Azospirillum brasilense* tem se destacado para combinação com rizóbios e uso em coinoculação da soja (CÁSSAN et al., 2020; BARBOSA et al., 2021). O maior interesse em pesquisas com essa bactéria ocorreu após a descoberta pela pesquisadora Dra. Johanna Döbereiner da sua capacidade de fixar biologicamente o N<sub>2</sub> atmosférico em associação com gramíneas (DÖBEREINER; MARRIEL; NERY, 1976). Já em 1979, estudos já relatavam o potencial de uso de *A. brasilense* para coinoculação em plantas de soja (SINGH; SUBBA, 1979). Desde então, diversos estudos foram conduzidos validando os benefícios da coinoculação de soja com essa bactéria.

Atualmente, a coinoculação de soja é amplamente adotada por agricultores em alguns países da América do Sul, principalmente no Brasil, após o lançamento de um inoculante comercial à base de cepas de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) em 2013 (CASSÁN et al., 2020; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021) e, mais recentemente, em 2021, um inoculante apropriado para coinoculação com a mistura das duas espécies bacterianas (ver tecnologia Masterfix Dual force®).

Entre os benefícios da coinoculação de soja com *A. brasilense*, são amplamente reconhecidos o aumento de raízes, número e peso de nódulos, concentração de N na parte aérea e raízes, aumento de rendimento e maior tolerância a estresses abióticos em comparação com a inoculação padrão (IRUTHAYATHAS; GUNASEKARAN; VLASSAK, 1983; GROPPA; ZAWOZNIK; TOMARO, 1998;

HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013; CASSÁN et al., 2020; BARBOSA *et al.*, 2021). Outros estudos relataram que a coinoculação promove alterações positivas na morfologia das raízes (comprimento, volume, número de pelos), assim aumentando a capacidade da planta para superar o estresse hídrico e promover maior rendimento em soja (MOLLA et al., 2001; RONDINA et al., 2020).

Esses efeitos benéficos proporcionados pela coinoculação ocorrem em função da capacidade promotora de crescimento proporcionada pelo microrganismo utilizado. Assim, diversos outros microrganismos também têm sido testados para coinoculação de soja, mas de forma mais modesta. Estudos já indicaram os gêneros *Pseudomonas* (AFZAL; BANO; FATIMA, 2010; SILVA et al., 2020b), *Burkholderia* sp. (SILVA et al., 2020a) *Actinomyces* sp. (NIMNOI; PONGSILP; LUMYONG, 2014), *Bacillus* sp. (LI; ALEXANDER 1988; ATIENO et al. 2012; SUBRAMANIAN et al. 2014; OLIVEIRA et al., 2020; MORETTI et al., 2021), *Trichoderma* (BONONI et al., 2020) e fungos micorrízicos (IGIEHON; BABALOLA, 2017; COFRÉ et al., 2020) como promotores de crescimento benéficos às plantas de soja.

Muitos estudos avaliaram a capacidade de *Bacillus subtilis* em promover benefícios à soja em coinoculação (LI; ALEXANDER, 1988; ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; ATIENO et al., 2012; PRAKAMHANG *et al.*, 2015; MORETTI et al., 2020a, 2020b; ARAUJO *et al.*, 2021; MORETTI et al. 2021). Estes relataram que a coinoculação de soja com este gênero pode favorecer o rendimento e a qualidade dos grãos, a biomassa, arquitetura radicular, o desempenho simbiótico dos rizóbios, induzir resistência sistêmica adquirida, liberar moléculas biocidas que proporcionarão inibição de patógenos e produção de fitormônios.

Em estudos com uma outra espécie de *Bacillus*, Masciarelli, Llanese e Luna (2014) afirmaram que a coinoculação com *B. amyloliquefaciens* (cepa LL2012) alterou os parâmetros de crescimento das plantas e promoveu maior nodulação. Adicionalmente, Oliveira et al. (2020) testaram diferentes espécies de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilis*, e *B. subtilis*) em coinoculação da soja, verificando maior nodulação e acúmulo de N na parte aérea, porém, a coinoculação não proporcionou aumento de rendimento de grãos.

Com o uso de vários microrganismos na coinoculação da soja (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Serratia* sp. *A. brasilense* e *Trichoderma asperellum*), Silva et al. (2020a, 2020b) observaram que a coinoculação promoveu melhorias nas trocas gasosas, biomassa total (parte aérea e raízes) e conteúdo de

macronutrientes, em comparação apenas com a inoculação simples com *Bradyrhizobium*. Um outro estudo avaliou o crescimento de plantas de soja coinoculadas com microrganismos promotores de crescimento (*A. brasilense*, *T. asperellum*, *T. virens*, *B. amyloliquefaciens* e *Penicillium bilaiae*), observando que a coinoculação de sementes de soja com os microrganismos mencionados aumentou a massa seca da cultura durante o seu ciclo de crescimento (BUSO et al., 2021).

Avaliando cepas de *Trichoderma asperellum* em coinoculação da soja, Bononi et al. (2020) e Chagas et al. (2017) verificaram esse fungo como solubilizador de fosfatado e promotor de crescimento em plantas de soja, possibilitando aumento de produtividade em até 9% em relação a inoculação somente com rizóbios.

Outro fator importante quando se trata de coinoculação é relacionado pelo risco de interação negativa entre o microrganismo coinoculado com rizóbio, uma vez que a simbiose soja-rizóbio é complexa e pode ser afetada por diversos fatores, como a mudança no microbioma rizosférico (HAN et al., 2020). Alguns microrganismos podem exercer um efeito inibitório na nodulação ou induzir a ativação de genes relacionados com a defesa das plantas (HASIBUAN et al., 2021). Assim é primordial avaliar se os microrganismos utilizados em coinoculação podem prejudicar a simbiose soja-*Bradyrhizobium*.

Pesquisadores realizaram estudos em busca de avaliar se a coinoculação de soja com *Bacillus pumilus* afetaria a interação soja-*Bradyrhizobium* e o momento da coinoculação (HASIBUAN et al., 2021). Como resultado, verificaram menor número de nódulos quando a coinoculação foi realizada no momento da semeadura, porém, quando realizada uma semana após a inoculação não houve prejuízo ao número de nódulos.

### **1.3 Coinoculação de plantas sob solo contaminado com metais pesados**

A coinoculação de plantas tem sido reconhecida pela capacidade de promover o crescimento de plantas em condições de crescimento adequadas, via propriedades como bioestimulantes, biofertilizantes e agentes de biocontrole (SHARMA et al. 2021). Porém, estudos também têm sido conduzidos com a coinoculação objetivando a biorremediação, para conferir às plantas maior tolerância a fatores abióticos. Por exemplo, com uso da coinoculação de microrganismos benéficos para melhoria da qualidade de plantas cultivadas em solos contaminados com metais potencialmente



tóxicos (JU et al., 2019; JU et al., 2020; NEVHULAUDZI; KANU; NTUSHELO, 2020; WANG et al., 2021).

A aplicação de microrganismos em solos contaminados pode possibilitar a conversão de metais pesados tóxicos para outras formas não tóxicas ou menos biodisponíveis, reduzindo a fitotoxicidade (SINGH; CAMEOTRA, 2004; BANDARA et al., 2017). Segundo Ju et al. (2020), a aplicação de rizobactérias e rizóbios podem aliviar substancialmente a toxidade por elementos tóxico nas plantas e melhorar a atividade biológica do solo. Além disso, a coinoculação com microrganismos promotores de crescimento pode atuar no crescimento das plantas sob estresse por metais pesados, pela promoção do sistema radicular, produção de agentes quelantes de metais pesados e estimulando o desenvolvimento microbiano do solo e disponibilidade de nutrientes (JU et al., 2019).

Estudos de Wang et al. (2021) indicaram que a coinoculação de rizóbios com fungos micorrízicos em alfafa (*Medicago sativa*) promoveu melhor capacidade das plantas em crescer no solo contaminado com cádmio (Cd) e elevou o número de táxons bacterianos na rizosfera. Os autores mencionam que os benefícios da coinoculação em plantas cultivadas em solo contaminado por metais pesados se dão em função da FBN, produção de fitormônios, produção de ACC-deaminase, solubilização de fosfatos e produção de sideróforos.

Em outro estudo avaliando a coinoculação de *Bacillus* sp. em plantas de ervilha (*Pium sativum*), houve indicação de que essa bactéria promoveu melhor crescimento, quantidade de clorofilas e proteínas das plantas sob solo contaminado com cromo (Cr), em comparação a plantas não coinoculadas (WANI; ZAINAB, 2016). Nevhulaudzi, Kanu e Ntushelo (2020) concluíram que a espécie bacteriana *Bacillus subtilis* tem a capacidade de aumentar o crescimento, nodulação e rendimento de feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*) cultivado em solo poluído com água de mineração.

Mais recentemente, estudos têm buscado avaliar o uso de microrganismos benéficos para melhorar a qualidade do solo e o crescimento de plantas em áreas sob deposição de lama vermelha, que é reconhecidamente um resíduo altamente salino-alcálico, pobre em nutrientes e que contém vários metais pesados e elementos terras raras (XUE et al., 2016; DI CARLO; BOULLEMANT; COURTNEY, 2020; PHILLIPS; COURTNEY, 2022). Por exemplo, Chen et al. (2022) isolaram bactérias benéficas de resíduo de bauxita para avaliação da aplicação em áreas de revegetação. Como resultado, as cepas inoculadas melhoraram as propriedades físico-químicas da lama

vermelha e promoveram maior crescimento das plantas. Já Liao et al. (2018) avaliaram a capacidade de um fungo (*Penicillium oxalicum*) isolado de resíduo de bauxita em produzir ácidos orgânicos e melhorar as características do solo para crescimento de plantas.

Em pesquisas com *Trichoderma asperellum* (RM-28) isolado da rizosfera de grama bermuda (*Cynodon dactylon*) em solo inundado com lama vermelha, Anam, Reddy, Ahn (2019) observaram redução do pH e condutividade elétrica da lama vermelha pela inoculação. Além disso, a inoculação do *Trichoderma* promoveu maior crescimento, teor de clorofila e reduziu o estresse oxidativo das mudas de grama bermuda cultivada em lixiviado de lama vermelha.

#### **1.4 Cepas de microrganismos isolados da Amazônia em associação com plantas**

A região amazônica é reconhecida por possuir a maior floresta tropical do mundo (SONTER et al., 2017). Estudos recentes vêm mostrando que essa região, além de ser um local com imensa diversidade de espécies de plantas, insetos e animais, também atua como fonte potencial de prospecção de microrganismos benéficos às plantas de interesse agrícola (ROSA, 2021; FERRAREZI et al., 2022). Concomitantemente, o uso de cepas de microrganismos prospectados dessa região pode promover maiores benefícios quando utilizadas em ambiente agrícola regional, uma vez que o uso de microrganismos nativos possui maior capacidade de se adaptarem ao solo e condições climáticas locais (CHEN et al., 2021).

O uso de microrganismos isolados da região amazônica já foi avaliado em culturas como açaí (*Euterpe oleracea*, CASTRO et al., 2020), palma de óleo (*Elaeis guineensis*, Lima et al., 2020), capim piatã (*Urochloa brizantha*, LOPES et al., 2017), arroz (FRANÇA et al., 2015), banana (*Musa* sp., MAUÉS et al., 2022), soja (BONONI et al., 2020; SILVA et al., 2020a) e milho (*Zea mays*, FERRAREZI et al., 2022).

Especificamente para a soja, a inoculação com cepas amazônicas de *T. asperellum* promoveu benefícios como maior biomassa vegetal, altura de plantas e eficiência de absorção de fósforo (BONONI et al., 2020; SILVA et al., 2020a). No entanto, os estudos se limitaram a avaliar os benefícios potenciais em condições controladas de casa de vegetação, sendo necessários estudos do potencial da tecnologia em campo.

## Referências Bibliográficas

AFZAL, A.; BANO, A.; FATIMA, M. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. **Agronomy Sustainability Development**. v. 30, p. 487–495, 2010. <https://doi.org/10.1051/agro/2009041>

ANAM, G.B.; REDDY, M.S.; AHN, Y. Characterization of *Trichoderma asperellum* RM-28 for its sodic/saline-alkali tolerance and plant growth promoting activities to alleviate toxicity of red mud. **Science of the Total Environment**. v. 662, p. 462–469, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.279>

ARAÚJO, F.F. et al. *Bacillus subtilis* changes the root architecture of soybean grown on nutrient-poor substrate. **Rhizosphere**. v. 18, e100348, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100348>

ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.34, n.9, p.1633-1643, 1999.

ATIENO, M. et al. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 2541–2550, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1062-x>

BANDARA, T. et al. Role of woody biochar and fungal-bacterial co-inoculation on enzyme activity and metal immobilization in serpentine soil. **Journal of Soils Sediments**. v. 17, p. 665–673, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1243-y>

BARBOSA, J.Z. et al. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**. v. 163, e103913, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>

BARRETT, J.R. The Science of Soy: What Do We Really Know? **Environmental Health Perspectives**. v. 114, n. 6, p. 353-358, 2006. <https://doi.org/10.1289/ehp.114-a352>

BASAK, B.B.; BISWAS, D.R. Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop. **Biology and Fertility of Soils**. v. 46, p. 641–648, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0456-x>

BASAK, B.B. et al. Potassium supply in agriculture through biological potassium fertilizer: A promising and sustainable option for developing countries. **Archives of Agronomy and Soil Science**. v. 68, p. 101-114, 2020. <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1821191>

BONONI, L. et al. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**. v. 10, e2858, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8>

BRANDÃO, A.S.P.; REZENDE, G.C.; MARQUES, R.W.C. Crescimento agrícola no período 1999/2004: a explosão da soja e da pecuária bovina e seu impacto sobre o meio ambiente. **Economia Aplicada**. v. 10, n. 2, p. 249-266, 2006.

BUSO, P.H.M. et al. 2021. Plant growth analysis describing the soybean plants response on dryland field to seed co-inoculation. **Ciência Rural**, v.51, n. 9, e20190642, 2021. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190642>

CASSÁN, F. et al. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**. v. 56, p. 461–479, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>

CASTRO, G.L.S. et al. Açaí palm seedling growth promotion by rhizobacteria inoculation. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 51, p. 205–216, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00159-2>

CHAGAS, L.F.B. et al. *Trichoderma asperellum* efficiency in soybean yield components. **Comunicata Scientiae**. v. 8, n. 1, p. 165-169, 2017. <http://dx.doi.org/10.14295/CS.v8i1.1754>

CHATTERJEE, S. et al. Effect of co-inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of amaranth plants. **Archives of Agronomy and Soil Science**. v. 58, n. 12, p. 1387-1397, 2012. <https://doi.org/10.1080/03650340.2011.595002>

CHEN, L. et al. Novel plant growth-promoting bacteria isolated from bauxite residue: the application for revegetation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03433-y>

CHEN, Q-L. Potential of indigenous crop microbiomes for sustainable agriculture **Nature Foods**. v. 2, p. 233-240, 2021. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00253-5>

CIAMPITTI, I.A.; SALVAGIOTTI, F. New insights into soybean biological nitrogen fixation. **Agronomy Journal**. v. 110 n. 4, p. 1185-1196, 2018. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.06.0348>

COELHO, A. et al. Rural landscapes and agrarian spaces under soybean expansion dynamics: a case study of the Santarem region, Brazilian Amazonia. **Regional Environmental Change**. v. 21, n.100, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10113-021-01821-y>

COFRÉ, N. et al. Soybean growth and foliar phosphorus concentration mediated by arbuscular mycorrhizal fungi from soils under different no-till cropping systems. **Rhizosphere**. v. 16, e100254, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100254>

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2020/2021 – 12º Levantamento. v. 8, n. 2, 97p. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/> Acesso em Janeiro de 2022.

DALL'AGNOL, A. et al. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Circular Técnica 43. Embrapa: Londrina-PR. 2007. 12p.

DAVIES, P.J. **The plant hormones: their nature, occurrence, and functions.** In: DAVIES, P.J. (ed) *Plant Hormones*. Springer, Dordrecht. 2010. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1)

DI CARLO, E.; BOULLEMANT, A.; COURTNEY, R. Ecotoxicological risk assessment of revegetated bauxite residue: Implications for future rehabilitation programmers. **Science of the Total Environment**. v. 698, e134344, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134344>

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews: Microbiology**. v. 2, p. 621, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil, Biology and Biochemistry**. v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00226-X)

DOBEREINER, J.; MARRIELA, I.E.; NERY, N.D.M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 22, 1976.

DOMINGUES, M.S.; BERMANN, C. O arco de desflorestamento na Amazônia: da pecuária à soja. **Ambiente & Sociedade**. v. 15, n. 2, p.1 -22 , 2012.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil**. Embrapa soja: Londrina-PR. 2004.

FERRAREZI, J.A. et al. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria from the Brazilian Amazon on the bacterial community associated with maize in field. **Applied Soil Ecology**. v. 170, e104297, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104297>

FILGUEIRAS, G.C.; FERREIRA, M.N.C; SANTANA, A.C. de. **Análise do mercado e da concentração da cadeia produtiva da soja na Amazônia**. Belém: Banco da Amazônia, 2007. 60 p.

FILIPINI, L.D. et al. Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of Microbiology**. V. 203, p. 1033–1038 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>

FRANÇA, S.K.S. et al. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. **Agronomy for Sustainability Development**. v. 35, p. 317–324, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0244-3>

FUKAMI, J.; CERZIN, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**. v. 8, p. 73, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

GAVIOLI, E.A. **Explanations for the rise of soybean in Brazil**. In: BOARD, J.E. A comprehensive survey of international soybean research. IntechOpen, 2013. <https://doi.org/10.5772/51678>

GIBBS, H.K. et al. Brazil's soy moratorium: Supply-chain governance is needed to avoid deforestation. **Science**. v. 347, n. 6220, p. 377-378, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0181>

GHOSH, S.K.; BERA, T.; CHAKRABARTY, A.M. Microbial siderophore – A boon to agricultural sciences. **Biological Control**. v. 144, e104214, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104214>

GUO, M. **Soy food products and their health benefits**. In: GUO, M. Functional foods: principles and technology. Woodhead publishing. 2009. 237p. <https://doi.org/10.1533/9781845696078.237>

HAMID, S.S. et al. **Crescimento e nível de especialização da produção de soja no estado do Pará**. In: SILVA, P.A.; OLIVEIRA, J.T (Orgs). Estudos aplicados em plantas cultivadas na Amazônia Paraense. Belém: RFB, 2021. 64p. <https://doi.org/10.46898/rfb.9786558891086.4>

HAN, Q. et al. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. **The ISME Journal**. v. 14, p. 1915–1928, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0648-9>

HASIBUAN, R.F.M. Application of biofertilizer containing *Bacillus pumillus* TUAT1 on soybean without inhibiting infection by *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110. **Soil Science and Plant Nutrition**. v. 67, n. 5, 2021. <https://doi.org/10.1080/00380768.2021.1959837>

HUNGRIA, M. et al. **The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America**. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (eds). Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, v. 4. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6\\_3](https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6_3)

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F.J. (Ed) **Biological nitrogen fixation**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p. 1009–1024. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**. v. 49, p. 791–801, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

HYMOWITZ, T. On the Domestication of the soybean. **Economic Botany**. v. 24, n. 4, p. 408-421, 1970. <https://www.jstor.org/stable/4253176>

IBGE. Agricultura, pecuária e outros. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/> Acesso em Março de 2022.

IGIEHON, N.O.; BABALOLA, O.O. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 101, p. 4871–4881, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8344-z>

IRUTHAYATHAS, E.E.; GUNASEKARAN, S.; VLASSAK, K. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N<sub>2</sub>-fixation of winged bean and soybean. **Scientia Horticulturae**, v. 20, p. 231-240, 1983.

JU, W. et al. Co-inoculation effect of plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on EDDS assisted phytoremediation of Cu contaminated soils. **Chemosphere**. v. 254, e126724, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126724>

JU, W. et al. Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 167, p. 218–226, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.016>

KHAN, A. et al. Siderophore-assisted cadmium hyperaccumulation in *Bacillus subtilis*. **International Microbiology**. v. 23, p. 277-286, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00101-4>

LEITE, R.C. et al. Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. **Crop and Pasture Science**. v. 70, n. 1, p. 61-67, 2019. <https://doi.org/10.1071/CP18105>

LEITE, R.C. et al. Phosphate fertilization in soybean during three consecutive harvests in the new Brazilian agricultural frontier. **Scientia Agraria**. v. 18, n. 4, p. 28-35, 2017. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i4.50310>

LIAO, J. et al. A novel acid-producing fungus isolated from bauxite residue: the potential to reduce the alkalinity. **Geomicrobiology Journal**. v. 35, n. 10, p. 840-847, 2018. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1479807>

LI, D-M.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**. v. 108, p. 211-219, 1988.

LIMA, J.V. et al. Hormonal imbalance triggered by rhizobacteria enhance nutrient use efficiency and biomass in oil palm. **Scientia Horticulturae**. v. 264, e109161, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109161>

LI, K.; CHEN, W.H.; BRUNER, S.D. Microbial siderophore-based iron assimilation and therapeutic applications. **Biometals**. v. 29, p. 377–388, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-016-9935-3>

LODI, L.A. et al. Unveiling the solubilization of potassium mineral rocks in organic acids for application as K-fertilizer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 194, p. 2431–2447, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03826-7>

LOPES, M.J.S. et al. Light and plant growth-promoting rhizobacteria effects on *Brachiaria brizantha* growth and phenotypic plasticity to shade. **Grass and Forage Science**. p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.1111/gfs.12336>

MAHANTA, D. et al. Influence of phosphorus and biofertilizers on soybean and wheat root growth and properties. **Field Crops Research**. v. 166, p. 1-9, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2014.06.016>

MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. **Microbiological Research**. v. 169, p. 609–615, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.001>

MATSUO, E.; FERREIRA, S.C.; SEDIYAMA, T. **Botânica e fenologia**. In: SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BOREM, A (Ed.). Soja: do plantio a colheita. Editora Viçosa. Viçosa-MG. 2015. 27p.

MAUES, T.M.S. Agroeconomic performance of banana tree under nutritional management with *Trichoderma asperellum*, in a family production system. **AIMS Agriculture and Food**. v. 7, n. 2, p. 297–311, 2022. <http://dx.doi.org/10.3934/agrfood.2022019>

MOLLA, A.H. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 457-463, 2001.

MORETTI, L.G. et al. Beneficial microbial species and metabolites alleviate soybean oxidative damage and increase grain yield during short dry spells. **European Journal of Agronomy**. v. 127, e126293, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2021.126293>

MORETTI, L.G. et al. Bacterial consortium and microbial metabolites increase grain quality and soybean yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v. 20, p. 1923-1934, 2020a. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00263-5>

MORETTI, L.G. et al. Effects of growth-promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield. **Agronomy Journal**. v. 112, p. 418-428, 2020b. <https://doi.org/10.1002/agj2.20010>

NEVHULAUDZI, T.; KANU, S.A.; NTUSHELO, K. Interaction effect of *Bacillus subtilis* co-inoculation and mine water irrigation on cowpea's growth, physiology and nutritional quality. **Scientific African**, v. 9, e00541, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00541>

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with *Actinomyces* and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**. v. 37, p. 432-446, 2014. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.864308>

OLIVEIRA, C.M. et al. Anatomical changes induced by isolates of *Trichoderma* spp. in soybean plants. **PLoS ONE**. v. 15, n. 11, e0242480, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242480>

OLIVEIRA-PAIVA, C.A. et al. **Microrganismos solubilizadores de fósforo e potássio na cultura da soja**. In: MEYER, M.C. et al. (ed.) Bioinsumos na cultura da soja. Embrapa Brasília, DF. 2022. 550p.



PHILLIPS, I.R.; COURTNEY, R. Long term field trials demonstrate sustainable nutrient supply and uptake in rehabilitated bauxite residue. **Science of the Total Environment**. v. 804, e150134, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150134>

PRAKAMHAN, J. Proposed some interactions at molecular level of PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. **Applied Soil Ecology**. v. 85, p. 38–49, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.009>

PRATAP, A. et al. **Soybean**. In: GUPTA, S.K. (Ed.). Technological innovations in major world oil crops. 1<sup>a</sup> Edition. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 2011. 293p. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0356-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0356-2_12)

RIVERO, S. et al. Pecuária e desmatamento: uma análise das principais causas diretas do desmatamento na Amazônia. **Nova Economia**. v. 19, n. 1, p. 41-66, 2009.

RONDINA, A.B.L. et al. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**. v. 56, p. 537-549, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

ROSA, L.H. **Neotropical endophytic fungi. diversity, ecology, and biotechnological applications**. Springer, Cham. 2021. 395p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-53506-3>

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**. v. 9, p. 205, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

SAUER, S.; PIETRAFESA, J.P. Novas fronteiras agrícolas na Amazônia: expansão da soja como expressão das agroestratégias no Pará. **Acta Geográfica**. p.245-264, 2013. <https://doi.org/10.5654/actageo2013.0003.0013>

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio a colheita**. Editora Viçosa. Viçosa-MG. 2015. 333p.

SHARMA, L. et al. Importance of PGPRs in the rhizosphere. In: NATH, M. et al. **Microbial metatranscriptomics belowground**. Springer Nature Singapore. 2021. 141p. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-9758-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-15-9758-9_7)

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

SILVA, M.A. et al. Screening of beneficial microorganisms to improve soybean growth and yield. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 63, e20190463, 2020a. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190463>

- SILVA, M.A. et al. Individual and combined growth-promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. **Caatinga**. v. 33, n. 3, p. 619-632, 2020b. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252020v33n305rc>
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 319, n. 2, p. 291–297, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.155>
- SINGH, C.S.; SUBBA-RAO, N.S. Associative effect of *Azospirillum brasilense* with rhizobium japonicum on nodulation and yield of soybean (*Glycine max*). **Plant and Soil**. v. 53, p. 387-392, 1979.
- SINGH, G. **The Soybean: botany, production and uses**. CAB International. 2010. 506p.
- SONG, X.P. et al. Massive soybean expansion in South America since 2000 and implications for conservation. **Nature Sustainability**. v. 4, p. 784–792, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00729-z>
- SONTER, L.J. et al. Mining drives extensive deforestation in the Brazilian Amazon. **Nature Communications**. v. 8, n. 1013, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00557-w>
- SOUZA, M.O.; BACHI, M.R.P.; ALVES, L.R.A. Análise de fatores que influenciam o processamento de soja no Brasil. **Revista de Economia e Agronegócio**. v.17, n. 3, p. 407-506, 2019.
- SUBRAMANIAN, P. et al. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Plant Growth Regulation**. v. 76, p. 327–332, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9993-x>
- TAIZ, L. et al. **Plant physiology and development**. 6<sup>a</sup> ed. Oxford University Press. 2017.
- GROPPA, M.D.; ZAWOZNIK, M.S.; TOMARO, M.L. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. **European Journal of Soil Biology**. v. 34, n. 2, p. 75-80, 1998.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2021. **Oilseeds: world markets and trade**. Foreign Agricultural Service. Available in: [www.usda.com](http://www.usda.com) Accessed: nov. 2021.
- VIEIRA, B.; NADALETI, W.C.; SARTO, E. The effect of the addition of castor oil to residual soybean oil to obtain biodiesel in Brazil: Energy matrix diversification. **Renewable Energy**. v. 165, p. 657-667, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.056>
- VIEIRA, R.F. **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 163p.
- WAADT, R. et al. Plant hormone regulation of abiotic stress responses. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6>

WANG, T. et al. Light-induced mobile factors from shoots regulate rhizobium-triggered soybean root nodulation. **Science**. v. 374, n. 6563, p. 65-71, 2021. <https://doi.org/10.1126/science.abh2890>

WANG, X. et al. Improvement of alfalfa resistance against Cd stress through rhizobia and arbuscular mycorrhiza fungi co-inoculation in Cd-contaminated soil. **Environmental Pollution**. v. 277, e116758, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116758>

WANI, P.A.; ZAINAB, I.O. Effect of Chromium (Vi) reducing *Bacillus* species PZ3 on the growth of pea plants in Chromium amended soil. **Research Journal of Environmental Toxicology**. v. 10, n. 3, p. 144-151, 2016. <https://doi.org/10.3923/rjet.2016.144.151>

XUE, S. et al. A review of the characterization and revegetation of bauxite residues (Red mud). **Environmental Science and Pollution Research**. v. 23, p. 1120–1132, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4558-8>

YADAV, R. et al. Bacteria from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi augment wheat yield and biofortification. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 150, p. 222–233, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.039>

YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p.1059–1065, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9575-4>

ZHANG, Q.; QIN, W. Tofu and Soy Products: The Effect of Structure on Their Physicochemical Properties. **Encyclopedia of Food Chemistry**. p. 96-104, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21700-9>

ZHANG, Z. et al. Effect of soybean oil/PODE/ethanol blends on combustion and emissions on a heavy-duty diesel engine. **Fuel**. v. 288, e119625, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119625>

## Increase in yield, leaf nutrient, and profitability of soybean co-inoculated with *Bacillus* strains and Arbuscular mycorrhizal fungi

Rubson da Costa Leite<sup>(1)</sup>, Ynglety Cascaes Pereira<sup>(1)</sup>, Christiane Abreu de Oliveira Paiva<sup>(2)</sup>, Alessandra Jackeline Guedes de Moraes<sup>(1)</sup> and Gisele Barata da Silva<sup>(1)\*</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Ciências Agrárias, Belém, Pará, Brasil.

<sup>(2)</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

How to cite: Leite, R.C.; Pereira, Y.C.; Paiva, C.A.O.; Moraes, A.J.G.; Silva, G.B. Increase in yield, leaf nutrient, and profitability of soybean co-inoculated with *Bacillus* strains and Arbuscular mycorrhizal fungi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 46, e0220007, 2022. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20220007>



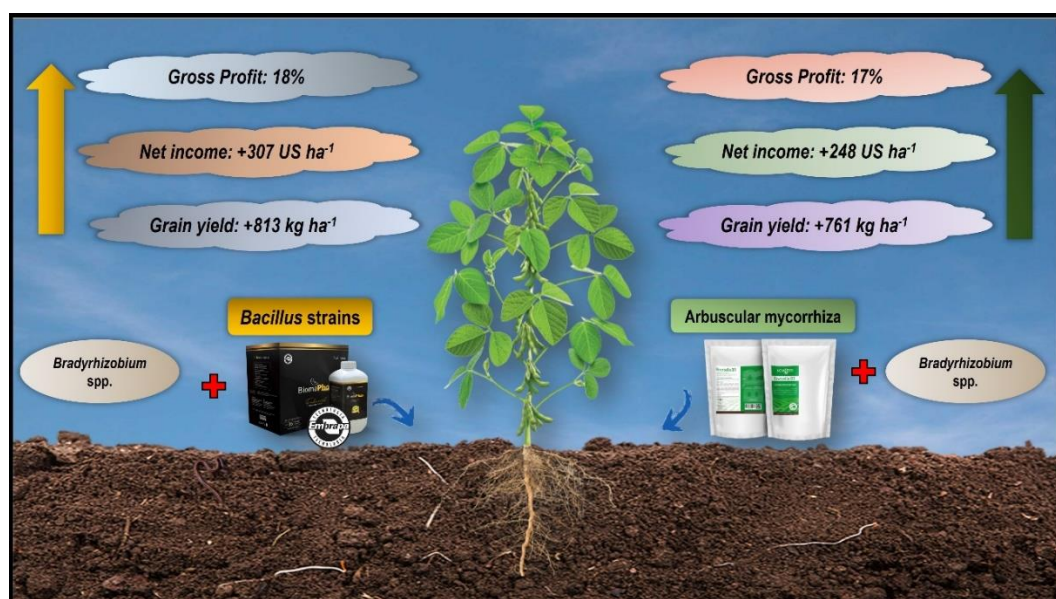
### Highlights

Co-inoculation increased soybean yield and profitability.

Co-inoculation is most successful in association with phosphate fertilization.

Co-inoculation can be extended to *Bacillus* and arbuscular mycorrhizal fungi.

### Graphical abstract



## 2 AUMENTO DE RENDIMENTO, TEOR DE NUTRIENTE FOLIAR E RENTABILIDADE DA SOJA COINOCULADA COM CEPAS DE *Bacillus* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

### Resumo

Microrganismos do solo e rizosfera podem liberar parte do fósforo total no solo através da solubilização, mineralização e um aumento da superfície de absorção da raiz. Foi investigada a capacidade das bactérias solubilizadoras de fósforo e dos fungos micorrízicos para promover um maior rendimento e rentabilidade na soja coinoculada. Para este fim, foram realizados experimentos de campo e casa de vegetação nos anos de 2020 e 2021 no Brasil. Em campo, o primeiro fator foi composto pela aplicação de microrganismos na soja (inoculação simples com *Bradyrhizobium*; coinoculação com cepas de *Bacillus*; coinoculação com micorriza arbuscular), o segundo fator consistiu na aplicação ou não de fertilizante fosfatado (0 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Em casa de vegetação, os tratamentos do primeiro fator do campo foram mantidos com 50% da fertilização com fonte fosfatada e um tratamento adicionado (inoculação padrão com 100% da fertilização). Foram avaliados: crescimento das plantas, raízes, nódulos, nutrição foliar, rendimento e rentabilidade. Em 2020, a coinoculação aumentou a altura das plantas, o número de vagens, grãos e o índice de rentabilidade. A coinoculação com cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular promoveu aumento de rendimento apenas associado à fertilização fosfatada, em 813 e 761 kg ha<sup>-1</sup> em comparação com a inoculação padrão, respectivamente. Em 2021, houve aumento para as vagens, grãos, rendimento, renda bruta, lucro líquido e índice de rentabilidade. A coinoculação com cepas *Bacillus* e micorriza arbuscular promoveu o aumento de rendimento e rentabilidade da soja, confirmando-se como uma tecnologia sustentável para os campos de soja brasileiros.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Rhizophagus intraradices*.

## **Increase in yield, leaf nutrient, and profitability of soybean co-inoculated with *Bacillus* strains and Arbuscular mycorrhizal fungi**

### **Abstract**

Microorganisms in the soil and rhizosphere can release part of the total phosphorus in the soil through solubilization, mineralization, and an increase of the root absorption surface. The ability of phosphate solubilizing bacteria and mycorrhizal fungi to promote higher yield and profitability in co-inoculated soybean was investigated. For this purpose, field and greenhouse experiments were conducted in the years 2020 and 2021 in Brazil. In the field, the first factor was composed of microorganism application on soybean (simple inoculation with *Bradyrhizobium*; co-inoculation with *Bacillus* strains; co-inoculation with arbuscular mycorrhiza), and the second factor consisted of the application or not of phosphate fertilizer (0 and 100 kg ha<sup>-1</sup> of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). In the greenhouse, treatments of the first factor were maintained with 50% of the phosphate fertilization and one treatment added (standard inoculation with 100% of the fertilization). Plant growth, roots, nodules, leaf nutrition, yield, and profitability were evaluated. In 2020, co-inoculation increased plant height, the number of pods, grains, and profitability index. The co-inoculation with *Bacillus* strains and arbuscular mycorrhiza promoted yield increase only associated with phosphate fertilization, by 813 and 761 kg ha<sup>-1</sup> compared to standard inoculation, respectively. In 2021, there were increases for pods, grains, yield, gross profit, net income, and profitability index. Co-inoculation with *Bacillus* strains and arbuscular mycorrhiza promoted increased soybean yield and profitability, confirming itself as a sustainable technology for Brazilian soybean fields.

**Keywords:** *Glycine max*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Rhizophagus intraradices*.

## 2.1 Introdução

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é uma cultura de importância global e uma das mais amplamente cultivadas em todo o mundo, com dupla aptidão como fonte de proteína e óleo, usada para consumo humano e animal e fins industriais (SINGH, 2010). A safra mundial 2019/2020 ocupou uma área plantada de 122,6 milhões de hectares, com produção global de 337,3 megatoneladas (USDA, 2020).

O Brasil é o maior produtor mundial desta oleaginosa, com uma área plantada de 39,1 milhões de hectares em 2021 e 138,1 megatoneladas colhidas no mesmo ano (CONAB, 2022). Parte do sucesso da soja brasileira deve-se à economia pelo não uso de fertilizantes nitrogenados (DÖBEREINER, 1997; HUNGRIA *et al.*, 2006). As necessidades de nitrogênio da cultura são atendidas pela simbiose com cepas elite de *Bradyrhizobium*, aplicadas através da inoculação de sementes no momento da semeadura (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Apesar da redução de custos pela associação soja-*Bradyrhizobium*, os sistemas de produção de soja de alto nível tecnológico são altamente dependentes de insumos químicos, como inseticidas, fungicidas, herbicidas e fertilizantes minerais que aumentam os custos de produção e causam maior impacto ecológico quando utilizados em excesso (SOUSA *et al.*, 2020). Entre os fertilizantes minerais, a necessidade por fontes de fósforo é uma das mais comuns nos solos tropicais brasileiros (WITHERS *et al.*, 2018). Como a maioria destes solos são altamente fixadores de fósforo (P), são necessárias altas aplicações de fertilizantes fosfatados no solo, além do necessário para o suprimento da cultura, para superar a rápida imobilização do P-inorgânico que ocorre em solos altamente intemperizados (ROY *et al.*, 2016; WITHERS *et al.*, 2018). O P presente nestes solos só está parcialmente disponível para às plantas devido à alta adsorção deste elemento e à formação de fosfatos de ferro/alumínio em solos ácidos (LEITE *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Além da fertilização, a única forma possível de aumentar o P-disponível para uma planta é a solubilização microbiana e mineralização de P (ALORI *et al.*, 2017). Na natureza, uma grande diversidade de microrganismos no solo e rizosfera, chamados Microrganismos Solubilizadores de Fosfatos (MSF), podem liberar parte do P-total do solo através da solubilização e mineralização (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; ALORI *et al.*, 2017). Fungos micorrízicos arbusculares coletam e transferem água e minerais como o fósforo em profundidade para seu hospedeiro (MARQUER *et al.*, 2019).

Os principais mecanismos de solubilização de MSF são a liberação de compostos minerais quelantes ou dissolventes (ânions ácidos orgânicos, sideróforos, prótons, íons hidroxila e CO<sub>2</sub>); liberação de enzimas extracelulares (fosfatases ácidas não específicas, fitases, fosfonatases e C-P liases) e liberação de P durante a degradação do substrato (exopolissacarídeos) (YI *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2013). Além disso, os microrganismos na presença de carbono lábeis, imobilizam rapidamente o P e, mais tarde, após a sua morte, colocam-no à disposição das plantas (SHARMA *et al.*, 2013).

Estudos têm demonstrado a capacidade dos microrganismos benéficos para promover o desenvolvimento vegetal, especificamente *Pseudomonas* no trigo e na soja (AFZAL *et al.*, 2010; KARIMZADEH *et al.*, 2020; SHIRMOHAMMADI *et al.*, 2020), Cepas de *Bacillus* em milho, milho e óleo de palma (RIBEIRO *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2020, SOUSA *et al.*, 2020), *Trichoderma* em soja (BONONI *et al.*, 2020) e micorriza arbuscular em arroz, milho e tomate (ZHANG *et al.*, 2016; SAIA *et al.*, 2020), entre outros. Além disso, estes microrganismos, na maioria dos casos, são do tipo “multifuncionais” e podem trazer benefícios às plantas através de múltiplos mecanismos de estimulação direta e indireta (SOBRAL *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020), com capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER, 1997), solubilização de potássio (BASAK *et al.*, 2022), produção de sideróforos (YADAV *et al.*, 2020) e mitigação de estresses bióticos e abióticos (LEITE *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Nesta perspectiva, vários estudos têm procurado associar a inoculação da soja com outros microrganismos benéficos através da coinoculação (HUNGRIA *et al.*, 2013; BONONI *et al.*, 2020; RONDINA *et al.*, 2020). A coinoculação envolve a adição de mais do que um microrganismo benéfico, atuando em diferentes processos para maximizar o desenvolvimento das plantas (FILIPINI *et al.*, 2020). Por isso, estabelecemos a hipótese de que a adoção da coinoculação da soja com microrganismos benéficos pode melhorar o rendimento das culturas e aumentar a rentabilidade. Assim, o objetivo foi avaliar a coinoculação de soja com cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular em dois níveis de fertilização fosfatada.



## 2.2 Material e Métodos

Para a investigação deste estudo, foram realizadas experiências de campo e casa de vegetação durante os anos agrícolas de 2020 e 2021 nos municípios de Paragominas e Belém, ambos no estado do Pará.

### 2.2.1 Experimento de campo

#### 2.2.1.1 Local de estudo e desenho experimental

Experimentos foram desenvolvidos em condições de campo durante 2020 e 2021, em uma fazenda no município de Paragominas, Estado do Pará, Brasil. (Figura 1). A região é classificada como um bioma amazônico, com clima "Aw" com transição para "Am", de acordo com a Classificação Internacional de Köppen (ALVARES *et al.*, 2013). O solo da área experimental tem uma textura muito argilosa (Tabela 1), sendo classificado como um Latossolo Vermelho (SANTOS *et al.*, 2018), que corresponde a um Oxisol (SOIL SURVEY STAFF, 2014).

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo (camada 0-20 cm) usado nos experimentos de campos.

Atributo	2020	2021	Atributo	2020	2021
Campo					
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,80	5,60	Manganês (mg/kg)	5,20	7,10
Matéria orgânica (dag/kg)	3,26	3,96	Zinco (mg/kg)	1,20	0,70
Fósforo (mg/kg)	21,40	10,00	Alumínio trocável (cmol <sub>d</sub> /kg)	0,00	0,00
Potássio (mg/kg)	98,30	236,50	H+Al (cmol <sub>d</sub> /kg)	2,10	2,90
Calcio (cmol <sub>d</sub> /kg)	4,42	4,85	Soma de bases (cmol <sub>d</sub> /kg)	6,30	7,60
Magnésio (cmol <sub>d</sub> /kg)	1,63	2,10	CTC (cmol <sub>d</sub> /kg)	8,40	10,50
Enxofre (mg/kg)	7,39	13,00	V%	75,00	72,00
Boro (mg/kg)	0,45	0,43	Areia (%)	10,50	12,30
Cobre (mg/kg)	0,70	0,20	Silte (%)	05,00	23,20
Ferro (mg/kg)	36,00	41,00	Argila (%)	84,50	64,50
Casa de vegetação					
pH (CaCl <sub>2</sub> )		5,60	Manganês (mg/kg)		19,50
Matéria orgânica (dag/kg)		3,07	Zinco (mg/kg)		0,80
Fósforo (mg/kg)		10,30	Alumínio trocável (cmol <sub>d</sub> /kg)		0,00
Potássio (mg/kg)		118,01	H+Al (cmol <sub>d</sub> /kg)		3,30
Calcio (cmol <sub>d</sub> /kg)		4,58	Soma de bases (cmol <sub>d</sub> /kg)		6,30
Magnésio (cmol <sub>d</sub> /kg)		1,45	CTC (cmol <sub>d</sub> /kg)		9,60
Enxofre (mg/kg)		25,00	V%		65,90
Boro (mg/kg)		0,27	Areia (%)		11,00
Cobre (mg/kg)		0,20	Silte (%)		20,80
Ferro (mg/kg)		73,00	Argila (%)		68,20

K, Cu, Fe, Mn e Zn: extração com Mehlich-1; P disponível em resina; Ca, Mg e Al trocáveis: extração com KCl; H + Al: extração com acetato de cálcio; S: extrator Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,01M; B: extrator BaCl<sub>2</sub> 0,125% água quente.

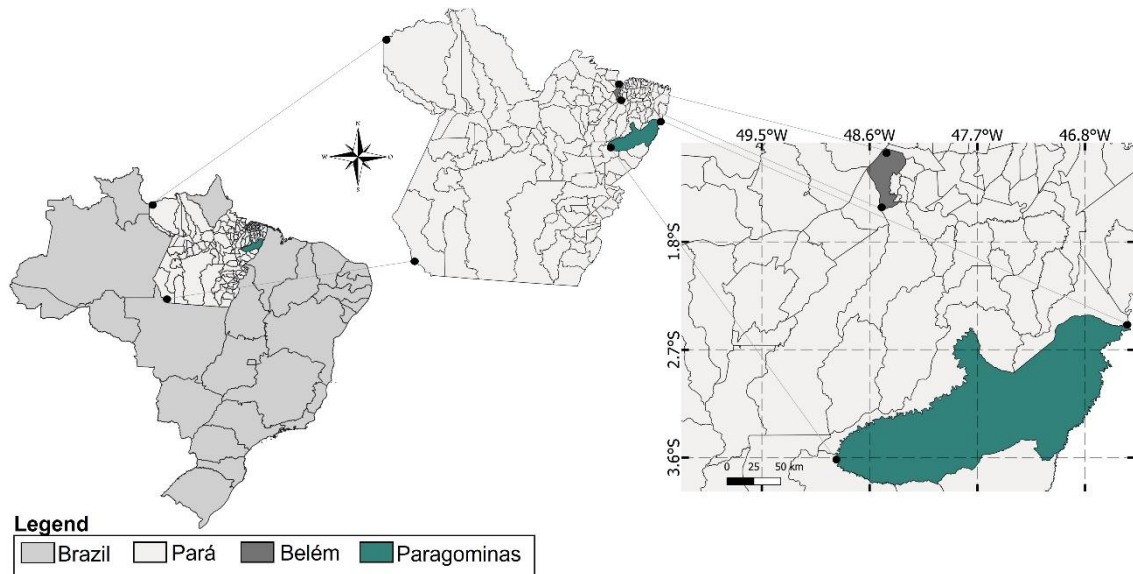


Figura 1. Localização geográfica dos campos experimentais (Paragominas-PA) e casa de vegetação (Belém-PA).

O desenho experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial  $3 \times 2$ , com quatro repetições. O primeiro fator foi composto pela aplicação de microrganismos: inoculação simples com *Bradyrhizobium* (inoculação padrão); coinoculação com estirpes de *Bacillus* (*B. subtilis* e *B. megaterium*); coinoculação com micorriza arbuscular (*Rhizophagus intraradices*). O segundo fator foi composto pela aplicação ou não de fertilizante fosfatado (0 e  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , com MAP), aplicado no momento do plantio. Todos os tratamentos receberam inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* [estirpes SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*) e SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*)] a uma concentração de  $5 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC)  $\text{mL}^{-1}$ , aplicadas a uma dose de  $300 \text{ mL}$  diluídas em  $70 \text{ L ha}^{-1}$  de água.

Cepas de *Bacillus* foram isoladas da rizosfera e endosfera foliar de genótipos tropicais do milho, compostas por cepas elite da Embrapa Milho e Sorgo, CNPMS B2084 de *Bacillus subtilis* e CNPMS B119 de *Bacillus megaterium* (identificação molecular descrita em Sousa *et al.* 2020) aplicadas na concentração de  $4 \times 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  em dose de  $100 \text{ mL ha}^{-1}$  [registro comercial n.º. BR 000497-9.000045 no Ministério da Agricultura brasileiro (MAPA)]. O inoculante com micorriza arbuscular (produto comercial com o número de registro 2290210000-0 no MAPA), composto de propágulos de *Rhizophagus intraradices* aplicado numa concentração de  $20.800$  propágulos  $\text{g}^{-1}$  e uma dose de  $120 \text{ g ha}^{-1}$ . Todos os tratamentos foram aplicados no

sulco de semeadura em volume de calda de 70 L ha<sup>-1</sup> juntamente com as cepas de rizóbios.

A semeadura ocorreu em 20 de janeiro de 2020, em primeiro ano, e 30 de janeiro de 2021, no segundo ano. A área experimental consistiu em 12 linhas de semeadura (espaçadas a 0,5 m) com um comprimento de 25 m. O experimento foi realizado com a cv. de soja M8644IPRO a uma taxa de semeadura de 11 sementes m<sup>-1</sup>, realizada com uma máquina semeadora modelo Stara (Victoria 4050) com seis linhas, velocidade de 6 km h<sup>-1</sup>, com inoculação, coinoculação e fertilização fosfatada via sulco. A fertilização com potássio (150 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O) foi realizada antes do plantio através do adubo Cloreto de Potássio (KCl). As práticas culturais foram realizadas de acordo com as recomendações para o cultivo da soja, e aplicações de inseticidas, herbicidas e fungicidas registrados para o controle de pragas e doenças foram feitas quando necessário (SEIXAS *et al.*, 2020). A colheita foi realizada em 11 de maio de 2020 e 24 de maio de 2021, respectivamente, para o primeiro e segundo anos, através da colheita das fileiras centrais em cada parcela. Durante o período experimental, os dados de temperatura e precipitação foram determinados com uma estação móvel (Figura 2).

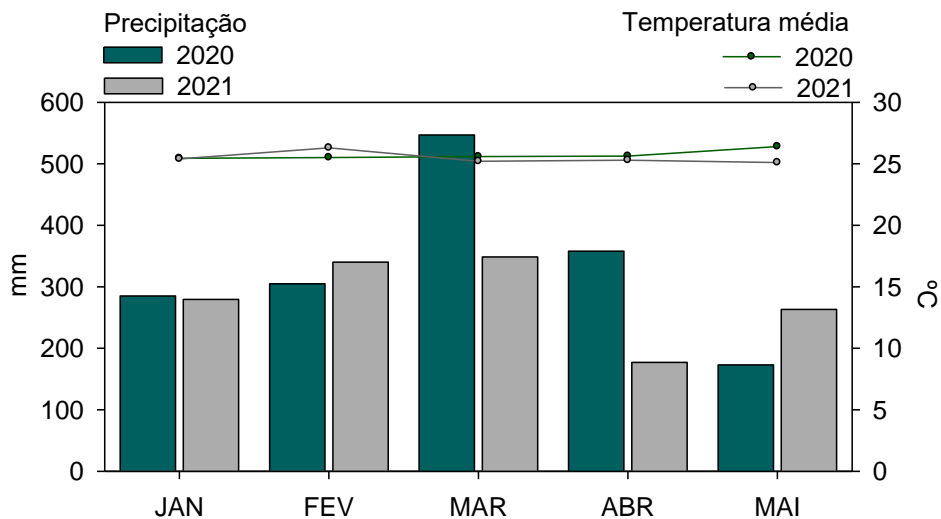


Figura 2. Dados médios de precipitação e temperatura da área experimental durante 2020 e 2021.

#### 2.2.1.2 Produção e crescimento

A altura da planta foi medida com uma régua graduada do solo até o topo da planta. A altura de inserção da primeira vagem foi medida desde o solo até à inserção da primeira vagem. O número de vagens, grãos e ramos reprodutivos feito

manualmente, contados em todas as plantas em um metro linear. Para o peso de 1000 grãos, 100 grãos foram contados manualmente e pesados em uma balança analítica (umidade fixada em 13%), e depois extrapolados para 1000 grãos. O rendimento de grãos consistiu na colheita manual e debulha mecânica de todas as plantas em 5 m<sup>2</sup> no centro da parcela, seguida de pesagem em balança (umidade fixada em 13%) e os valores convertidos em kg ha<sup>-1</sup>.

#### 2.2.1.3 Nutrientes foliares

A 3<sup>a</sup> folha com pecíolo foi colhida de 25 plantas em cada parcela durante a floração completa [estádio fenológico R2 (FEHR; CAVINESS, 1977)]. As amostras foram identificadas, limpas, colocadas em sacos de papel e levadas para secagem em estufa de circulação fechada (55 °C) até peso constante. As amostras secas foram moídas em um moinho de facas de aço inoxidável (tipo Willey, peneira de 20 mesh) e armazenadas. O conteúdo de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn e Mo) foram avaliados de acordo com o Manual de Análise Química de Plantas (SILVA, 2009). O conteúdo de N pelo método de digestão sulfúrica e determinação em um destilador Kjeldahl. Fósforo, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Mo, e Zn por digestão nitroperclórica e determinação em ICP-AES (Espectroscopia de Emissão Atômica de Plasma Acoplado Indutivamente). O teor de boro foi determinado pela digestão a seco e determinação em ICP-AES.

#### 2.2.2 Casa de vegetação

Um experimento foi realizado sob condições de casa de vegetação na Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA, Brasil (Figura 1), para avaliar biomassa, nodulação e raízes de soja coinoculada. Plantas de soja (cv. M8644IPRO) foram cultivados em vasos (6 dm<sup>-3</sup>) preenchidos com um Latossolo muito argiloso recolhido de uma área adjacente onde os experimentos de campo foram conduzidos (Tabela 1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: inoculação simples com *Bradyrhizobium* (inoculação padrão) + 100% da adubação fosfatada (I100); inoculação padrão + 50% da adubação (I50); coinoculação com estirpes de *Bacillus* + 50% da adubação (BS); coinoculação com micorriza arbuscular + 50% da adubação

(AM). As concentrações de microrganismos foram semelhantes às descritas no experimento de campo.

A semeadura ocorreu em 27 de maio de 2021, com três sementes por vaso, com posterior desbaste para uma planta por vaso após a emergência. Antes da semeadura, o solo dos vasos foi fertilizado com dose equivalente a 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (100% da adubação); 30 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e 30 kg ha<sup>-1</sup> de fonte de micronutrientes (Molibdênio - 0,1%; Boro - 1,8%; Cobre - 0,8%; Manganês - 2%; Zinco - 7%). Os valores expressos em kg ha<sup>-1</sup> foram calculados para o volume de solo nos vasos, considerando uma densidade de solo de 1 g cm<sup>-3</sup>. Durante o período experimental, o solo foi mantido em 45% da capacidade do campo.

A avaliação das plantas ocorreu 25 dias após a semeadura, durante o estágio fenológico V4 (FEHR; CAVINESS, 1977). Na terceira folha completamente expandida, contado a partir do ápice, foram feitas três medições para determinar o índice de clorofila, com o medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica Minolta, Japan). No final do experimento, as plantas foram cuidadosamente recolhidas dos vasos e separadas em parte aérea e raízes. As raízes foram lavadas e separadas dos nódulos radiculares. O volume radicular foi determinado através do deslocamento da água em um cilindro graduado após a imersão (RONDINA *et al.*, 2020). Os nódulos radiculares foram contados manualmente. Parte aérea, raízes e nódulos foram colocados em sacos de papel e enviados para secagem em estufa de circulação fechada (55 °C) até atingirem peso constante.

### 2.2.3 Análise econômica

Para a análise econômica do uso da tecnologia de coinoculação da soja, foi utilizada a metodologia de custos de produção proposta pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2010). Dados referentes aos custos variáveis foram obtidos na propriedade onde os experimentos de campo foram realizados, enquanto os valores de depreciação (máquinas, implementos e edificações rurais), outros custos fixos (manutenção, encargos sociais e seguro do capital fixo) e renda de fatores (retorno esperado do capital fixo e uso do solo) foram usados de acordo com as estimativas da Conab para nível tecnológico elevado nos anos 2020 e 2021.

Para determinar os custos variáveis, foram utilizados valores de custeio (operação com maquinaria, mão-de-obra, administrador, sementes, fertilizantes de plantio, fertilizantes foliares, inoculantes, adjuvantes), defensivos (herbicidas,

inseticidas e fungicidas), despesas financeiras e outras (transporte externo, custos administrativos, armazenamento e contribuição especial para a seguridade social rural). Para custos fixos, foram calculadas depreciações (maquinaria e edifícios rurais) e outros custos fixos. O custo operacional foi composto pela soma dos custos fixos e variáveis. O custo total é composto pelo custo operacional, mais a renda dos fatores.

Os indicadores financeiros lucro bruto (RB) (rendimento em sacos de 60 kg multiplicado pelo preço médio de venda), lucro operacional (equação 1), lucro líquido (equação 2) e índice de rentabilidade (equação 3), foram determinados de acordo com Martin *et al.* (1998).

$$LO = RB - COT \quad \text{Eq. 1}$$

$$LQ = RB - CT \quad \text{Eq. 2}$$

$$IL = \left( \frac{LO}{RB} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

onde: LO = lucro operacional; COT = custo operacional total; LQ = lucro líquido; CT = custo total; IL = índice de lucratividade.

O preço médio do saco de soja (60 kg) foi estabelecido de acordo com Cepea (2020, 2021) na data da colheita dos experimentos. Os valores foram convertidos de reais (moeda brasileira) para dólares de acordo com a taxa de câmbio na data da colheita.

#### 2.2.4 Análise estatística

Inicialmente, os dados foram analisados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Bartlett). Posteriormente, foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando significativos, ao teste Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para experimentos de campo e ao teste Duncan ( $p \leq 0.05$ ) para experimento em casa de vegetação. Os testes estatísticos foram realizados utilizando a linguagem RStudio® (R CORE TEAM, 2019). Os gráficos foram confeccionados usando o programa SigmaPlot® versão 10 e o mapa de localização geográfica foi feito usando o programa QGIS Desktop®.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Crescimento e rendimento da soja no campo

Em 2020, houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os fatores (coinoculação x fertilização fosfatada) para a altura da planta, inserção da primeira vagem, peso de

1000 grãos e rendimento de grãos (Figura 3). O número de vagens e grãos diferiu ( $p < 0,05$ ) entre plantas sob diferentes tratamentos, mas sem interação entre os fatores.

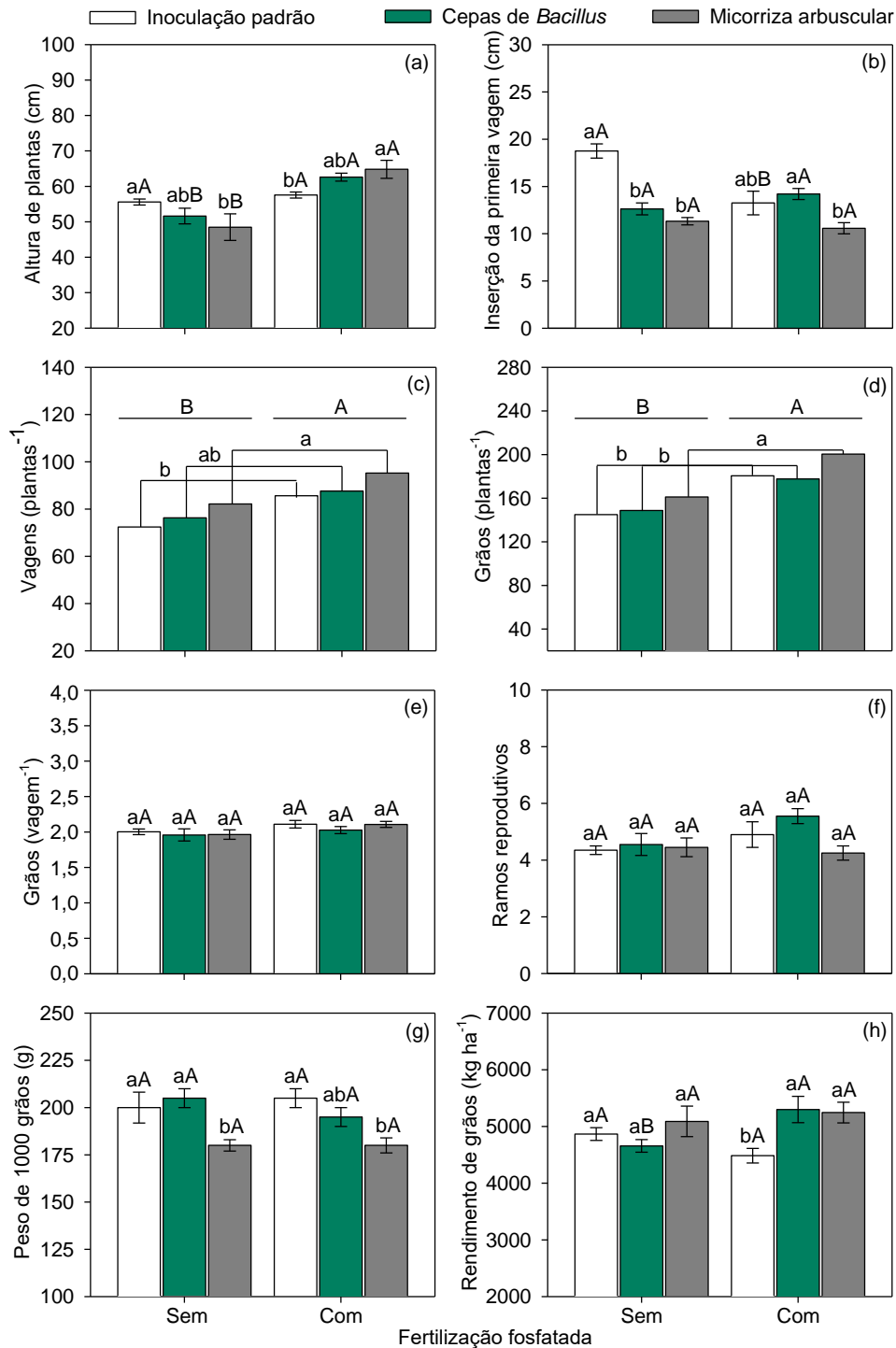


Figura 3. Altura de plantas (a), inserção de primeira vagem (b), vagens (c), grãos (d), grãos por vagem (e), ramos reprodutivos (f), peso de 1000 grãos (g) e rendimento (h) de soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de *Bacillus* e coinoculação com micorriza arbuscular em 2020; valores são médias de 4 repetições; Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para coinoculação e minúsculas para adubação, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As plantas inoculadas apenas com *Bradyrhizobium* (inoculação padrão) e sem aplicação de fertilizante fosfatado mostraram maior altura (55 cm) em comparação com a coinoculação com micorriza arbuscular, mas significativamente semelhante às plantas coinoculadas com cepas de *Bacillus* (51 cm) (Figura 3a). A altura de inserção da primeira da primeira vagem foi maior para a inoculação padrão em comparação com as plantas sob demais tratamentos. (Figura 3b).

A coinoculação com micorriza arbuscular mostrou um maior número de vagens (88 vagens) em comparação com a inoculação padrão (79 vagens), mas significativamente semelhante à coinoculação com estirpes de *Bacillus* (82 vagens) (Figura 3c). A coinoculação com micorriza arbuscular proporcionou um aumento de 11% e 10% no número de grãos por planta, em comparação com a inoculação padrão e a coinoculação com cepas de *Bacillus*, respectivamente, independentemente da fertilização fosfatada (Figura 3d).

Com o fornecimento de fertilizante fosfatado, a coinoculação promoveu maior rendimento de grãos, com aumentos de 813 e 761 kg ha<sup>-1</sup> em comparação com a inoculação padrão, respectivamente para coinoculação com cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular (Figura 3h).

Em 2021, houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os fatores para as variáveis altura de plantas e ramos reprodutivos (Figura 4). A altura de inserção de primeira vagem, número de vagens, grãos, grãos por vagem, peso de 1000 grãos e rendimento de grãos diferiram entre os tratamentos, mas sem interação entre os fatores.

As plantas coinoculadas com micorriza arbuscular tinham um número maior de vagens (74 vagens por planta) em comparação com a inoculação padrão (62 vagens por planta), mas semelhante a coinoculação com cepas de *Bacillus* (73 vagens por planta) (Figura 4c). Para o número de grãos, a coinoculação com cepas *Bacillus* foi significativamente maior do que a inoculação padrão (14%). A coinoculação com micorriza arbuscular mostrou um valor intermediário, não diferindo dos outros tratamentos (Figura 4d).

O maior rendimento de grãos foi observado em plantas que receberam coinoculação com cepas *Bacillus* (4787 kg ha<sup>-1</sup>) e com micorriza arbuscular (5013 kg ha<sup>-1</sup>) em comparação com a inoculação padrão (4379 kg ha<sup>-1</sup>), independentemente de ter ou não sido fornecida fertilização fosfatada (Figura 4h).



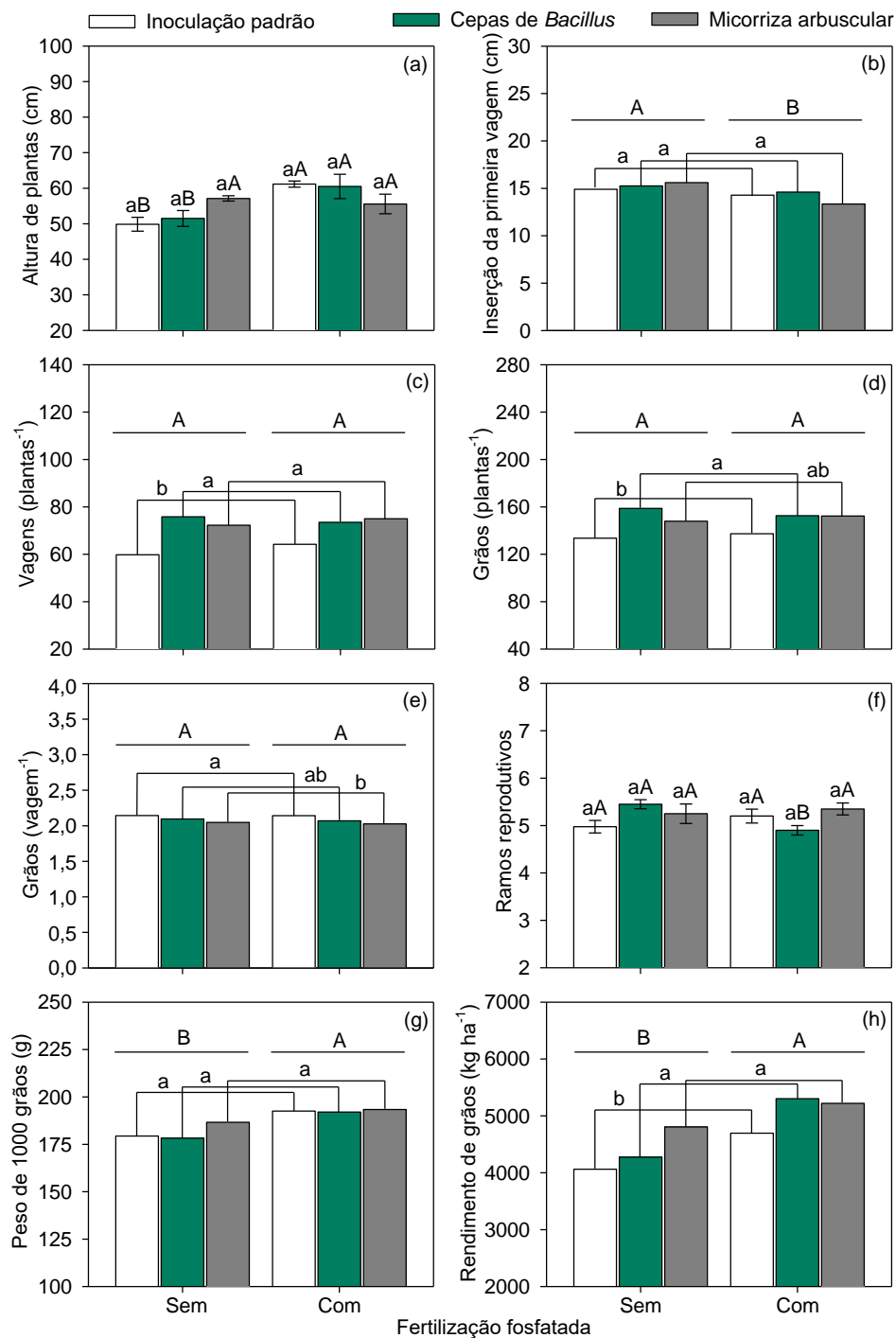


Figura 4. altura de plantas (a), inserção da primeira vagem (b), vagens (c), grãos (d), grãos por vagem (e), ramos reprodutivos (f), peso de 1000 grãos (g) e rendimento de grãos (h) de plantas de soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de *Bacillus* e coinoculação com micorriza arbuscular em 2021; valores são médias de 4 repetições; Valores seguidos da mesma letra, maiúsculas para microrganismos e minúsculas para fertilização, não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 2.3.2 Conteúdo foliar de macro e micronutrientes no campo

Em 2020, o teor de nutrientes foliares diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) para os macronutrientes P, K, e Mg e micronutrientes B, Cu, Fe, Mn e Mo (Figura 5).

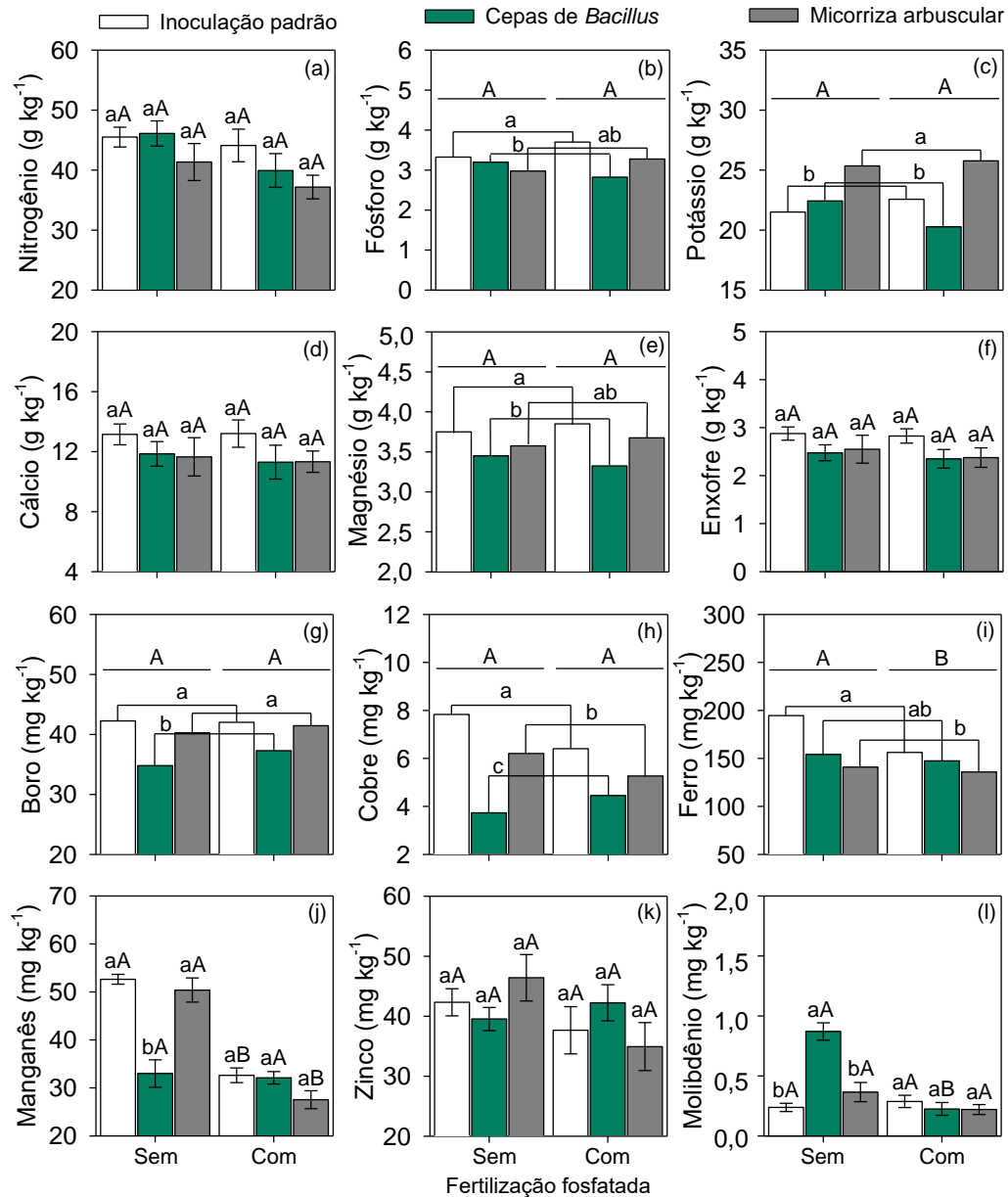


Figura 5. Teor foliar de macronutrientes e micronutrientes em soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de *Bacillus* e coinoculação com micorriza arbuscular em 2020; valores são médias de 4 repetições; Letras iguais, maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O conteúdo de K-foliar foi maior para plantas coinoculadas com micorriza arbuscular (25 g kg<sup>-1</sup>) em comparação com a inoculação padrão (22,0 g kg<sup>-1</sup>) e cepas de *Bacillus* (21,3 g kg<sup>-1</sup>) independentemente da aplicação ou não de fertilizante

fosfatado (Figura 5c). O Fe-foliar de plantas com inoculação padrão foi significativamente maior do que a coinoculação com micorriza arbuscular (Figura 5i). As plantas coinoculadas com cepas de *Bacillus* tinham um teor de Mo-foliar superior as plantas sob outros tratamentos, apenas na ausência de fertilizante fosfatado.

Em 2021, o teor de nutrientes foliares diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) para os macronutrientes P e Mg e os micronutrientes Fe, Mn e Mo (Figura 6). As plantas diferiram no conteúdo de P foliar apenas de acordo com o fornecimento ou não de uma fonte fosfatada (Figura 6b).

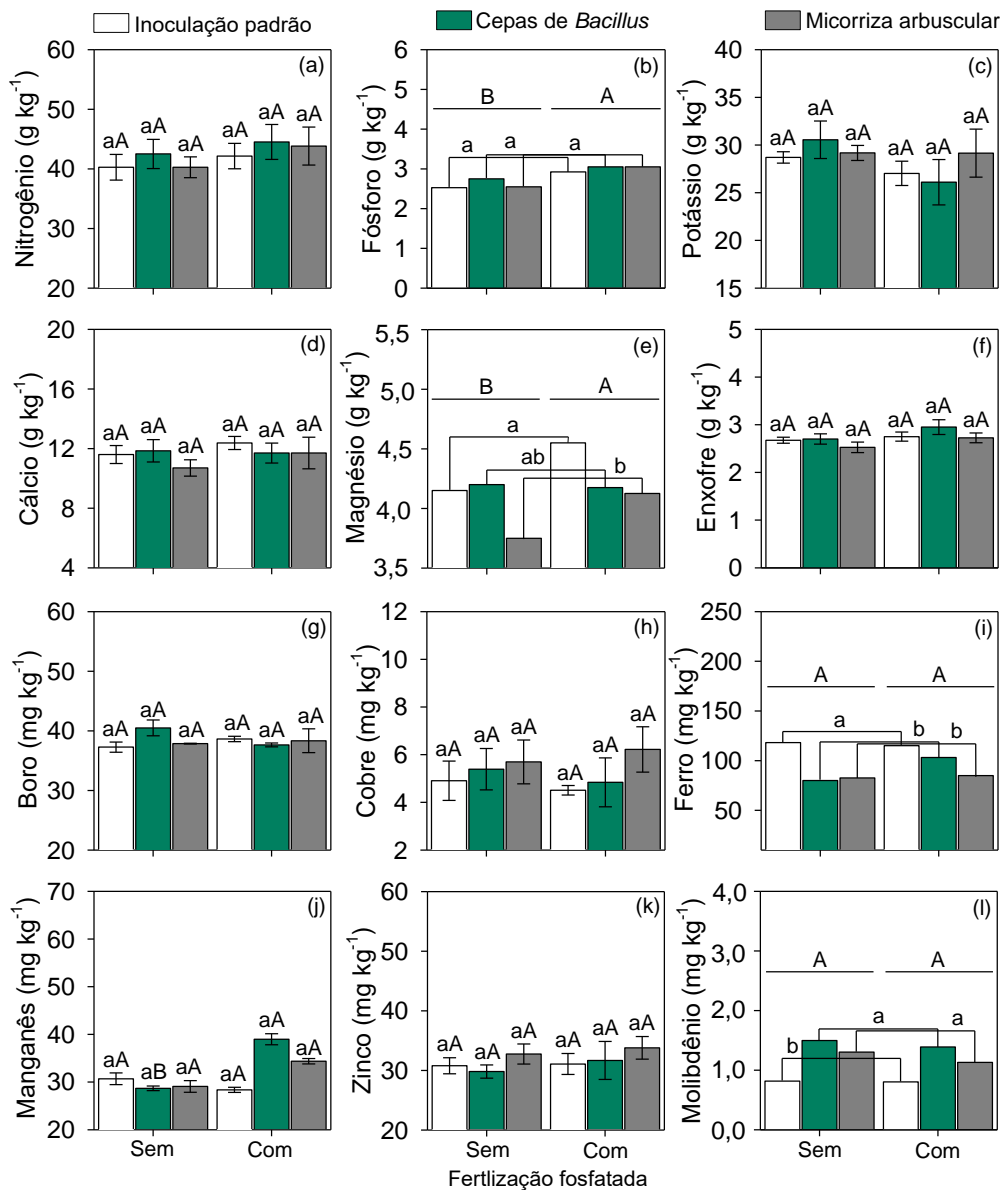


Figura 6. Teor foliar de macronutrientes e micronutrientes em soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de *Bacillus* e coinoculação com micorriza arbuscular em 2021; valores são médias de 4 repetições; Letras iguais, maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O conteúdo de Fe-foliar das plantas com inoculação padrão foi significativamente mais alto do que a coinoculação com cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular. Para Mo-foliar, cepas de *Bacillus* (1,4 mg kg<sup>-1</sup>) e micorriza arbuscular (1,2 mg kg<sup>-1</sup>) apresentaram teores foliares mais elevados em comparação com a inoculação padrão (0,8 mg kg<sup>-1</sup>).

### 2.3.3 Rentabilidade da coinoculação no campo

Houve uma interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os fatores avaliados para os indicadores de lucratividade renda bruta, lucro líquido e índice de lucratividade em 2020. Em 2021, as variáveis mostraram uma resposta independente entre os fatores (Tabela 2).

Tabela 2. Rentabilidade da cultura da soja em função da inoculação padrão, coinoculação com cepas *Bacillus* e coinoculação com micorriza arbuscular durante os anos de 2020 e 2021.

	Padrão fazenda	Cepas de <i>Bacillus</i>	Micorriza arbuscular	
<b>2020</b>				
Renda bruta (\$ ha <sup>-1</sup> )				
				Média
Sem	1529±35 Aa	1463±35 Ba	1599±84 Aa	1530
Com	1409±40 Ab	1664±73 Aa	1648±57 Aa	1574
Média	1469	1564	1623	CV (%) = 7,05
Lucro líquido (\$ ha <sup>-1</sup> )				
				Média
Sem	1018±35 Aa	933±35 Aa	1057±84 Aa	1003
Com	836±40 Ba	1073±73 Aa	1045±57 Aa	985
Média	927	1003	1051	CV (%) = 11,01
Índice de lucratividade (%)				
				Média
Sem	69±0,69 Aa	66±0,83 Aa	68±1,52 Aa	68
Com	62±1,09 Bb	68±1,45 Aa	66±1,17Aab	65
Média	65	66	67	CV (%) = 3,37
<b>2021</b>				
Renda bruta (\$ ha <sup>-1</sup> )				
				Média
Sem	2208±10	2391±54	2612±73	2404 B
Com	2552±56	2881±135	2837±112	2757 A
Média	2380 b	2636 a	2725 a	CV (%) = 5,53
Lucro líquido (\$ ha <sup>-1</sup> )				
				Média
Sem	1379±10	1539±54	1745±73	1554 B
Com	1647±56	1954±135	1895±112	1832 A
Média	1513 b	1747 a	1820 a	CV (%) = 8,43
Índice de lucratividade (%)				
Média				

Sem	63±0,17	65±0,79	67±0,87	65 B
Com	65±0,76	68±1,49	67±1,27	67 A
Média	64 b	67 a	67 a	CV (%) = 2,49

Sem = fertilizante fosfatado não aplicado; com = fertilizante fosfatado aplicado; CV (%) = coeficiente de variação; Preço do saco de soja: 18,85 U\$ (CEPEA em 11/05/2020); 32,61 U\$ (CEPEA em 21/06/2021).; Os valores são médias de 4 repetições; Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em 2020, com o fornecimento de fertilizante fosfatado, a renda bruta de plantas coinoculadas (cepas *Bacillus* e micorriza arbuscular) foi superior à inoculação padrão, e o índice de lucratividade das plantas com cepas *Bacillus* foi superior à inoculação padrão. Em 2021, a renda bruta, o lucro líquido e o índice de lucratividade das plantas coinoculadas com cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular foram superiores à inoculação padrão, independentemente do fornecimento de fertilizante fosfatado. (Tabela 2). Quanto ao fator de fertilização, todos os indicadores de rentabilidade foram superiores ( $p < 0,05$ ) nas plantas que receberam fertilizante fosfatado.

#### 2.3.4 Casa de vegetação

O volume radicular das plantas com inoculação padrão + 100% de fertilização foi maior ( $p < 0,05$ ) que o das plantas com inoculação padrão + 50% de fertilização e das plantas coinoculadas com cepas de *Bacillus* + 50% de fertilização, mas semelhante às plantas coinoculadas com micorriza arbuscular + 50% de fertilização (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo de clorofilas, massa seca da parte aérea, número de nódulos, peso seco dos nódulos, volume e peso seco das raízes das plantas de soja sob inoculação padrão, coinoculação com cepas de *Bacillus* e coinoculação com micorriza arbuscular em casa de vegetação.

	Índice de clorofilas	Massa da parte aérea (g)	Volume radicular (cm <sup>3</sup> )
Inoculação + 100%	35,82±0,15	3,23±0,45	6,87±0,42 a
Inoculação + 50%	35,27±0,53	3,07±0,49	5,37±0,23 bc
<i>Bacillus</i> + 50%	33,82±0,84	1,84±0,16	4,85±0,42 c
Micorriza + 50%	35,20±0,59	2,51±0,19	5,92±0,14 ab
CV (%)	3,11	27,18	11,56
p-valor	≥ 0,1140	≥ 0,0724	≤ 0,0063
	Massa de raízes (mg)	Nódulos	Massa de nódulos (mg)
Inoculação + 100%	416,10±30,73	23,00±3,34	4,98±0,62
Inoculação + 50%	380,35±12,75	24,15±2,83	5,17±0,76
<i>Bacillus</i> + 50%	325,00±33,38	22,25±3,70	3,44±0,81
Micorriza + 50%	342,80±23,54	21,25±1,79	4,37±0,29

CV (%)	14,39	26,52	29,24
p-valor	≥0,1219	≥0,9100	≥0,3058

100% = aplicação total do fertilizante fosfatado recomendado; 50% = aplicação equivalente a 50% do recomendado.; valores são médias de 4 repetições; Letras distintas na coluna indicam diferença significativa pelo teste Duncan com 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para as variáveis SPAD (média = 35), massa seca da parte aérea (média = 2,66 g), número de nódulos (média = 23 nódulos por planta), massa seca de nódulo (média = 4,5 mg) e massa seca da raiz (média = 366 mg).

## 2.4 Discussão

A agricultura tem adoptado práticas cada vez mais sustentáveis, como o uso de microrganismos capazes de disponibilizar parcialmente o P retido no solo (WITHERS *et al.*, 2018; FATIMA *et al.*, 2021). Nosso estudo apresenta resultados de experimentos de campo e casa de vegetação com soja coinoculada com bactérias solubilizadoras de fosfato e micorrizas arbusculares como uma forma de aumentar a eficiência ou suplementar a fertilização fosfatada.

A coinoculação promoveu um maior número de vagens por planta, com aumentos de 4% e 12% em 2020 e 20 e 19% em 2021, respectivamente para cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular, em comparação com a inoculação padrão (Fig. 3c e 4c). Este aumento na produção de vagens possivelmente está relacionado com a capacidade destes microrganismos de produzir fitohormônios e estimular a sua síntese pelas plantas. A citocinina é considerada um dos principais fitormônios relacionados com o aumento da produção de vagens (CARLSON *et al.*, 1987).

Com um nível adequado de P-disponível já presente no solo (Tabela 1), as plantas sob inoculação padrão, em 2020, não responderam à fertilização fosfatada (Fig. 3h). Mariussi *et al.* (2019), ao avaliarem a aplicação de fertilizante fosfatado na soja, relataram que plantas cultivadas em áreas com alto nível de P-disponível no solo não têm resposta em produtividade por fertilizante fosfatado. Estes autores recomendam que em áreas com níveis adequados de P-disponível no solo, só deve ser feita a fertilização de reposição do P exportado através dos grãos. Considerando que 10 kg de  $P_2O_5$  são exportados para cada 1000 kg de grãos produzidos (CÂMARA, 2015), no ano de 2020, 48 kg  $ha^{-1}$  de  $P_2O_5$  foram exportados nesse experimento. Nesta perspectiva, com o fornecimento de fertilizante fosfatado, a prática da coinoculação de plantas promoveu um aumento de 18 e 17% no rendimento em 2020,

respectivamente, para as cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular, em comparação com a inoculação padrão.

Avaliando o desempenho do milho inoculado com cepas de *Bacillus*, entre elas as que avaliamos em nosso estudo, Sousa *et al.* (2020) relataram a capacidade destas bactérias de produzir ácido indol-3-acético (IAA), além de outros mecanismos de solubilização e promoção do crescimento, já relatados em outros estudos (OLIVEIRA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Em experimentos de campo com microrganismos solubilizadores de fosfatos e fertilização fosfatada na produção de trigo, Shirmohammadi *et al.* (2020) afirmaram que os melhores resultados ocorrem quando a fertilização fosfatada está associada a microrganismos. Em milho inoculado com cepas de *Bacillus*, Sousa *et al.* (2020) afirmam que os resultados são melhores com a associação da fertilização fosfatada, uma vez que as bactérias aumentam o efeito do fertilizante. Nossos resultados indicaram maior produtividade quando a coinoculação foi associada à fertilização fosfatada, especialmente para as cepas de *Bacillus*.

O benefício das bactérias promotoras do crescimento das plantas não é apenas a disponibilização de P para a planta, mas também através da produção de substâncias promotoras do crescimento das plantas, tais como IAA, giberelinas e citocininas, que podem aumentar a produtividade (MAHANTA *et al.*, 2014). Além disso, a capacidade das bactérias solubilizadoras de fosfato de fornecer P às plantas é limitada à complexidade do sistema solo-planta, onde os compostos libertados por estas bactérias para solubilizar o fosfato são rapidamente degradados ou o fosfato solubilizado é fixado novamente antes da absorção pela raiz.

Semelhante aos nossos resultados, Braga Junior *et al.* (2017) não observaram um aumento no número e peso seco de nódulos de soja associados a cepas de *Bacillus*. Por outro lado, como observado pelo teor de clorofila, conteúdo de N foliar, número de nódulos e peso seco dos nódulos, os microrganismos coinoculados não parecem ter afetado negativamente a simbiose do rizóbio com a soja.

O conteúdo foliar de molibdênio também foi alterado em função da prática de coinoculação. Em 2020, apenas a coinoculação com cepas de *Bacillus* promoveu níveis adequados desse micronutriente para as plantas (Fig. 6). Em 2021, as cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular tinham teores de Mo-foliar mais elevados do que a inoculação padrão. Possivelmente, existe uma relação entre uma melhor nutrição de Mo com um teor reduzido de Fe, uma vez que os íons Mo podem ser adsorvidos aos

óxidos de Fe no solo (MARCONDES; CAIRES, 2005) e a coinoculação parece ter interferido de alguma forma com a absorção de Fe pela planta.

Embora 70-90% das espécies de plantas terrestres possuam a capacidade de formar interações simbióticas com micorrizas, as práticas agrícolas comuns, tais como a intensa perturbação do solo e o uso de defensivos, reduzem ou eliminam a população destes fungos no solo (PARNISKE, 2008; TAIZ *et al.*, 2017). A coinoculação da soja com micorriza arbuscular pode aumentar a população destes fungos no solo e promover benefícios para as plantas, como maior produtividade encontrada neste estudo. O sucesso da simbiose destes parceiros (plantas-micorrizas) ocorre através da troca de sinais moleculares, como a estrigolactona, um fitohormônio produzido por plantas que pode estimular o crescimento e a arquitetura da planta, a tolerância às condições ambientais e a promoção da simbiose com micorrizas (MISHRA *et al.*, 2017; MARQUER *et al.*, 2019). Além disso, os fungos micorrízicos produzem sinais difusíveis, incluindo oligômeros de quitina e lipocitooligosacarídeos, juntamente com compostos semelhantes a fitormônios que estimulam a ramificação das raízes das plantas, aumentando a sua superfície e alcance, facilitando a absorção de P, que é pouco móvel no solo (MAILLET *et al.*, 2011; GENRE *et al.*, 2013; MARQUER *et al.*, 2019).

Em 2020 e 2021 não foi encontrado nenhum aumento no teor de P em folhas de soja coinoculada com micorriza arbuscular (MA) (Fig. 5). De acordo com Nagahashi *et al.* (1996), o número de ramos e o comprimento hifal de esporos germinativos de MA foram inibidos por altas concentrações de P. Luthfiana *et al.* (2021) declaram que a quantidade e tipo de metabólitos exsudados pela micorriza arbuscular (entre eles aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos) são modificados em função do P. De fato, isso pode ter ocorrido em nosso estudo uma vez que o campo experimental do ano de 2020 tinha um alto nível de P-disponível (Tabela 1). Outra hipótese para a não adição do P-foliar nas plantas coinoculadas é a diluição do conteúdo foliar devido à maior produtividade das plantas coinoculadas, uma hipótese mais plausível, uma vez que os níveis de P-disponível no solo do campo experimental avaliado em 2021 não eram tão altos e, mesmo assim, não houve resposta no P-foliar.

O aumento do K-foliar em plantas coinoculadas com micorriza arbuscular pode ser devido ao aumento da expressão e atividade dos sistemas de transporte de plantas  $K^+$  e à presença de transportadores eficientes no micélio extraradicular que se estende através do solo (CASIERI *et al.*, 2013). Estudos sobre a detecção de genes



envolvidos no transporte de nutrientes durante a simbiose micorrízica arbuscular em *Lotus japonicus* revelaram um transportador de K<sup>+</sup> (TM0445.37) pertencente à família "K<sup>+</sup> uptake permease" (KUP) confirmada como sendo quarenta e quatro vezes mais regulada nas raízes micorrízicas (GUETHER *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2019) verificaram que o transportador de potássio SIHAK10 está envolvido na absorção micorrízica de K<sup>+</sup>.

Numa extensa revisão sobre associações micorrízicas na nutrição de K em plantas, Garcia e Zimmermann (2014) listaram algumas culturas que tinham aumentado o conteúdo de K-foliar nos seus tecidos por associação com MA, nomeadamente milho (*Zea mays*), alface (*Lactuca sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*). Outros estudos encontraram acúmulo de K em tecidos vegetais de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (LIU *et al.*, 2019), coentro (*Coriandrum sativum*) (Oliveira *et al.*, 2016), e *Pelargonium* (PERNER *et al.*, 2007) em associação com micorrizas. Garcia e Zimmermann (2014) revelam estudos que identificaram uma forte acumulação de K em esporos e hifas de MA. Nossos resultados corroboram esses autores e acrescentam a associação soja-*Rhizophagus intraradices* à lista de culturas com aumento de K-foliar.

Em dois anos estudados, as plantas coinoculadas apresentaram menor teor de Fe-foliar em relação à inoculação padrão, sendo -7 e -15% em 2020 e -21 e -28 % em 2021, respectivamente para as cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular. Os microrganismos benéficos são reconhecidos como uma estratégia para melhorar a nutrição de Fe nas plantas, produzindo sideróforos e complexando o nutriente (HIDER; KONG, 2010; LURTHY *et al.*, 2020). Enfatizamos que os níveis foliares de Fe foram adequados em todos os tratamentos e o conteúdo presente no solo foi superior ao adequado para a soja (CÂMARA, 2015). Portanto, estes microrganismos podem agir não só na absorção, mas também na regulação de níveis adequados de Fe para as plantas. Esta afirmação é plausível, uma vez que já foi relatado microrganismos aliviando estresse de Fe no trigo, pela regulação positiva de genes codificados pela ferritina nas raízes, o que é importante para manter a homeostase do Fe (SUN *et al.*, 2017).

Embora as plantas não diferissem significativamente no peso seco da raiz, o volume da raiz diferiu entre os tratamentos (Tabela 3). Plantas com inoculação padrão + 100% de fertilização fosfatada apresentaram volume de raiz semelhante à coinoculação com micorrizas arbusculares + 50% de fertilização. Esse

comportamento pode estar relacionado à maior produção de raízes finas por plantas coinoculadas com micorriza arbuscular, uma vez que essas raízes não seriam tão representativas ao avaliar o peso seco das raízes. Além disso, o peso da raiz não é uma indicação de aumento da capacidade de absorção pelo sistema radicular, e uma mudança drástica na arquitetura da raiz pode ocorrer sem uma diferença no peso da raiz (MAHANTA *et al.*, 2014).

As plantas coinoculadas tiveram um aumento na renda bruta de 18 e 17 % em 2020 (associado à fertilização fosfatada) e 11 e 14% em 2021 (independentemente da fertilização fosfatada), respectivamente, para cepas de *Bacillus* e micorriza arbuscular, em comparação com a inoculação padrão (Tabela 2). Esse resultado ocorreu devido à maior produtividade alcançada pela coinoculação de plantas (Fig. 3h), pois isso é essencial para garantir uma boa lucratividade para o produtor (DUETE *et al.*, 2009). Galindo *et al.* (2018) enfatizam que os investimentos em práticas que promovem maior produtividade na soja, como a coinoculação, podem promover uma maior renda bruta para o produtor.

Avaliando a viabilidade econômica de cultivares de soja coinoculadas com *A. brasilense*, Galindo *et al.* (2018) observaram maior lucratividade da colheita quando as plantas foram coinoculadas. Esses autores também enfatizam que o potencial de coinoculação na nutrição e rendimento da soja é alto, juntamente com o fato de ser uma técnica com baixo custo e investimento, fácil aplicação e ambientalmente correta.

## 2.5 Conclusões

A coinoculação de plantas de soja com cepas de *Bacillus* ou micorriza arbuscular promove aumento de rendimento. No entanto, a coinoculação é mais bem-sucedida quando associada a fertilizantes fosfatados. Portanto, em estudos posteriores, indicamos a pesquisa de coinoculação associada a doses de fonte de fósforo, para redução e não substituição do fertilizante.

Houve um aumento nos teores foliares de K e Mo pela prática de coinoculação. A coinoculação da soja proporcionou maior lucratividade econômica para a atividade.

## Referências bibliográficas

AFZAL, A.; BANO, A.; FATIMA, M. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, p. 487–495. <http://dx.doi.org/10.1051/agro/2009041>

ALORI, E.T.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 971, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>

ALVARES, C.A. *et al.* Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

BASAK, B.B. *et al.* Potassium supply in agriculture through biological potassium fertilizer: A promising and sustainable option for developing countries. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 67, n. 1, 2020. <http://dx.doi.org/10.1080/03650340.2020.1821191>

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

BONONI, L. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, v. 10, e2858, 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8>

BRAGA JUNIOR, G.M. *et al.* Soybean growth promotion and phosphate solubilization by *Bacillus subtilis* strains in greenhouse. **International Journal of Current Research**, v. 9, n. 5, p. 50914-50918, 2017.

CÂMARA, G.M.S. **Adubação**. In: SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. Soja: do plantio a colheita. Editora Viçosa. Viçosa-MG; 2015. 333p.

CARLSON, D.R. *et al.* The Physiological Basis for Cytokinin Induced Increases in Pod Set in IX93-100 Soybeans. **Plant Physiology**, v. 84, p. 233-239, 1987. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.84.2.233>

CASIERI, L. *et al.* Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions. **Mycorrhiza**, v. 23, p. 597–625, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-013-0496-9>

CEPEA. Advanced Study Center in Applied Economics. **Soybean indicator**. 2020. (In portuguese). Available in: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/soja.aspx> Access in November 2020.

CEPEA. Advanced Study Center in Applied Economics. **Soybean indicator**. 2021. (In portuguese). Available in: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/soja.aspx> Access in July 2021.

CONAB. National Supply Company. **Monitoring of the Brazilian grain Harvest**. Brasília: Conab, 2022; 9: 6. Available at: <http://www.conab.gov.br> Accessed at: April 2022.

CONAB. National Supply Company. **Agricultural Production Costs: Conab methodology**. Brasília, DF; 2010. 60p. Available at: <http://www.conab.gov.br> Accessed at: November 2020.

CUI-JUAN, W. *et al.* Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YTB1407 elicits resistance against two fungal pathogens in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Journal of Plant Physiology**, v. 253, e153260, 2020.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153260>

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29 n. 5-6, p. 771-774, 1997.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00226-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00226-X)

DUETE, R.R.C. *et al.* Economic viability of doses and split-applications of nitrogen fertilization in corn crop in a eutrophic Red Latosol. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 1, p. 175-181, 2009. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagr.v31i1.6646>

EMBRAPA. **Soybean Production Technology, Production Systems 17**. Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil; 2020.

FATIMA, F. *et al.* Relevance of phosphate solubilizing microbes in sustainable crop production: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03425-9>

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Iowa State University. Agricultural and Home Economics Experiment Station. Special Reports, v. 80, 1977. <https://lib.dr.iastate.edu/specialreports/87>

FILIPINI, L.D. *et al.* Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1033–1038, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>

GALINDO, F.S. *et al.* Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 1, p. 51-56, 2018.

<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p51-56>

GARCIA, K.; ZIMMERMANN, S.D. The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 337, 2014.

<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00337>

GENRE, A. *et al.* Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear  $Ca^{2+}$  spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by Strigolactone. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 190–202, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1111/nph.12146>

GUETHER, M. Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. **New Phytologist**, v.182, p. 200–212, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02725.x>

HIDER, R.C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 5, p. 637, 2010. <http://dx.doi.org/10.1039/b906679a>

HUNGRIA, M. *et al.* Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006. <http://dx.doi.org/10.4141/P05-098>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791–801, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

KARIMZADEH, J. *et al.* Improved phosphorus uptake by wheat plant (*Triticum aestivum* L.) with rhizosphere fluorescent pseudomonads strains under water-deficit stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 162-178, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10087-3>

LEITE, R.C. *et al.* Phosphate fertilization in soybean during three consecutive harvests in the new Brazilian agricultural frontier. **Scientia Agraria**, v. 18, n. 4, p. 28-35, 2017. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i4.50310>

LEITE, R.C. Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n.1, p. 61-67, 2019. <http://dx.doi.org/10.1071/CP18105>

LIMA, J.V. *et al.* Hormonal imbalance triggered by rhizobacteria enhance nutrient use efficiency and biomass in oil palm. **Scientia Horticulturae**, v. 264, e109161, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109161>

LIU, J. *et al.* The potassium transporter SLHAK10 is involved in mycorrhizal potassium uptake. **Plant Physiology**, v. 180, p. 465–479, 2019. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01533>

LUTHFIANA, N. Metabolite profiling of the hyphal exudates of *Rhizophagus clarus* and *Rhizophagus irregularis* under phosphorus deficiency. **Mycorrhiza**, v. 31, p. 403-412, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-020-01016-z>

LURTHY, T. *et al.* Impact of bacterial siderophores on iron status and ionome in pea. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 730, 2020. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00730>

MAHANTA, D. *et al.* Influence of phosphorus and biofertilizers on soybean and wheat root growth and properties. **Field Crops Research**, v. 166, p. 1-9, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2014.06.016>

MAILLET, F. *et al.* Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. **Nature**, v. 469, p. 58–63, 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09622>

MARCONDES, J.A.P.; CAIRES, E.F. Application of molybdenum and cobalt in soybean seeds. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 687-694, 2005.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052005000400019>

MARIUSSI, L.M. *et al.* Phosphate fertilization on soils with improved fertility in the Brazilian Cerrado. **Agronomia Colombiana**, v. 37, n. 1, p. 39-46, 2019.

<http://dx.doi.org/10.15446/agron.colomb.v37n1.72123>

MARQUER, M.L.; BÉCARD, G.; FREY, N.F. Arbuscular mycorrhizal fungi possess a CLAVATA3/embryo surrounding region-related gene that positively regulates symbiosis. **New Phytologist**, v. 222, p. 1030–1042, 2019.

<http://dx.doi.org/10.1111/nph.15643>

MARTIN, N.B. *et al.* Integrated system of agricultural costs - “CUSTAGRI”. **Informações Econômicas**, v. 28, n.1, p. 7-28, 1997.

MISHRA, S.; UPADHYAY, S.; SHUKLA, R.K. The role of strigolactones and their potential cross-talk under hostile ecological conditions in plants. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 691, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2016.00691>

NAGAHASHI, G.; DOUDS, J.D.; ABNEY, G. Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. **Mycorrhiza**, v. 6, p. 403–408, 1996.

<http://dx.doi.org/10.1007/s005720050139>

OLIVEIRA, C.A. *et al.* Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n.9, p. 1782-1787, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>

OLIVEIRA, C.M. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean. **Biological Control**, v.152, e104425, 2021.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104425>

OLIVEIRA, R.S. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi are an alternative to the application of chemical fertilizer in the production of the medicinal and aromatic plant *Coriandrum sativum* L. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 79, p. 320–328, 2016. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1153447>

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiosis. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 6, p. 763-776, 2008.

<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1987>

PENG, L.; HUANG, J.; YUAN, L. Biological mobilization of potassium from soil by thirteen *Suillus* species and ectomycorrhizal *Pinus massoniana* Lamb. seedlings. **European Journal of Soil Science**, v. 71, n. 4, p. 740-751, 2019.

<http://dx.doi.org/10.1111/ejss.12898>

PERNER, H. Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants. **Mycorrhiza**, v.17, p. 469–474, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-007-0116-7>

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Found Stat Comput Vienna, Austria, 2019.

RIBEIRO, V.P. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 40–46, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>

RODRIGUES, T.F. *et al.* Impact of pesticides in properties of Bradyrhizobium spp. and in the symbiotic performance with soybean. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 172, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-020-02949-5>

RONDINA, A.B.L. *et al.* Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense or treated with A. brasilense exudates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 537-549, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

ROY, E.D. *et al.* The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. **Nature Plants**, v. 2 e16043, 2016. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.43>

SAIA, S. *et al.* Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn depending upon the supplied form of phosphorus. **Mycorrhiza**, v. 30, p. 133-147, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-019-00927-w>

SHARMA, S.B. *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springerplus**, v. 2, p. 587–600, 2013. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

SHIRMOHAMMADI, E. Improved phosphorus (P) uptake and yield of rainfed wheat fed with p fertilizer by drought-tolerant phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonads strains: a field study in drylands. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, 2195–2211, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s42729-020-00287-x>

SiBCS. **Brazilian Soil Classification System**. 5<sup>a</sup> ed. Embrapa, Brasília, DF; 2018.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2<sup>a</sup> ed. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2009; 627p.

SILVA, M.A. Screening of beneficial microorganisms to improve soybean growth and yield. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, e20190463, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190463>

SINGH, G. **The soybean: botany, production and uses**. CAB International. Ludhiana, India; 2010, 506p.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis** (3<sup>rd</sup> ed.). New York, NY: Academic Press; 2008.

SOBRAL, L.F.; OLIVEIRA, C.A.; SANTOS, F.C. **Organomineral fertilization in corn associated with phosphorus solubilizing microorganisms**. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Research and Development Bulletin, 2018. 137p.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy**. Washington, DC: US Gov. Print. Office; 2014.

SOUSA, S.M. *et al.* Tropical Bacillus strain inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 867-877, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>

SUN, Z. *et al.* IAA producing Bacillus altitudinis alleviates iron stress in Triticum aestivum L. seedling by both bioleaching of iron and up-regulation of genes encoding ferritins. **Plant Soil**, v. 419, p. 1–11, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-017-3218-9>

TAIZ, L. *et al.* **Plant physiology and development**. 6<sup>a</sup> ed. Oxford University Press. 2017; 600p.

USDA (United States Department of Agriculture). **Oilseeds: World markets and trade**. Foreign Agricultural Service. 2020. Available in: [www.usda.com](http://www.usda.com) Accessed: Nov 2020.

WITHERS, P.A.J. *et al.* Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, e2537, 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20887-z>

YADAV, R. *et al.* Bacteria from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi augment wheat yield and biofortification. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 150, n. 222–233, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.039>

YI, Y.;HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1059-1065, 2008. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9575-4>

ZHANG, S. *et al.* Arbuscular mycorrhiza improved phosphorus efficiency in paddy fields. **Ecological Engineering**, v. 95, p. 64-72, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.029>



## Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. and Amazonian strains of *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens* increases the productivity and profitability of the crop

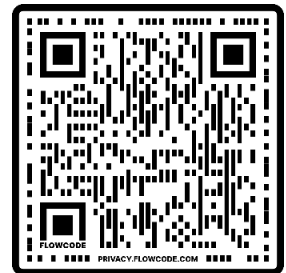
Rubson da Costa Leite<sup>a,c</sup>; Mariangela Hungria<sup>b</sup>; Williams Souza de Ávila<sup>c</sup>; Robson da Costa Leite<sup>a</sup>; Gisele Barata da Silva<sup>a\*</sup>.

a Federal Rural University of the Amazon, Plant Protection Laboratory, Belém, Brazil.

b Brazilian Agricultural Research Company - Embrapa soja, Londrina, Paraná, Brazil.

c Company Juparanã Commercial Agricultural, Paragominas, Pará, Brazil.

How to cite: Leite RC, Hungria M, Avila WS, Leite RC, Silva GB. Co-inoculation of soybean with Amazonian strains of *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens* increases the productivity and profitability of the crop. *Applied Soil Ecology*. 2022.



### Highlights

It is possible to co-inoculated soybean with other microorganisms besides *Bradyrhizobium*.

Regionalized strains can benefit soybean productivity and profitability.

Management with microorganisms does not dispense phosphate fertilization.

Amazonian strains in soybean co-inoculation promote increased root volume.

### Graphical abstract



### **3 A COINOCULAÇÃO DA SOJA COM *Bradyrhizobium* spp. E CEPAS AMAZÔNICAS DE *Trichoderma asperellum* E *Bacillus amyloliquefaciens* AUMENTA A PRODUTIVIDADE E A RENTABILIDADE DA CULTURA**

#### **Resumo**

A coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* spp. e outros microrganismos promotores de crescimento tem potencial para aumentar a produção de plantas e a Amazônia é um bioma rico nestes microrganismos benéficos. O objetivo deste estudo foi avaliar a coinoculação de plantas de soja com *Bradyrhizobium* spp. e cepas de *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens* isoladas dos solos da Amazônia brasileira. Experimentos em casa de vegetação e campo foram conduzidos durante as safras de 2020 e 2021 no Brasil. O desenho experimental foi inteiramente casualizado em casa de vegetação e em blocos casualizados a campo, ambos com esquema fatorial 3x2. A inoculação padrão com *Bradyrhizobium* e a coinoculação com *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* foram considerados como o primeiro fator e o segundo fator foi representado pela fertilização com fonte fosfatada (0 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). O volume de raízes das plantas foi 25% e 17% superior à inoculação padrão, para *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente. Em 2020, a coinoculação com *T. asperellum* aumentou o rendimento em 15%, a altura da planta em 27% e o lucro líquido em até US\$121, em comparação com a inoculação padrão. Em 2021, houve aumento de 7% e 13% no rendimento, 18% e 7% no número de vagens, 11% e 2% nos ramos reprodutivos, 8% e 4% na altura das plantas, e US\$159 e US\$309 no lucro líquido em relação à inoculação padrão, para o *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente. Os resultados indicam a possibilidade de expandir a coinoculação da soja com cepas regionalizadas de *Bacillus* e *Trichoderma*, com benefícios em produtividade e rentabilidade.

**Palavras-chave:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, *Trichoderma asperellum*.

## CO-INOCULATION OF SOYBEAN WITH *Bradyrhizobium* spp. AND AMAZONIAN STRAINS OF *Trichoderma asperellum* AND *Bacillus amyloliquefaciens* INCREASES THE PRODUCTIVITY AND PROFITABILITY OF THE CROP

### Abstract

Co-inoculation of soybean with plant-growth-promoting microorganisms has the potential to increase plant yield, and the Amazon is a biome rich in these beneficial microorganisms. The objective of this study was to evaluate the co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. and strains of *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Brazilian Amazon soils. Greenhouse and field experiments were conducted during the 2020 and 2021 crop seasons in Brazil. The experimental design was completely randomized in the greenhouse and in randomized blocks in field experiments, both with 3 × 2 factorial schemes. Standard inoculation with *Bradyrhizobium* and co-inoculation with *T. asperellum* and *B. amyloliquefaciens* was considered as the first factor and the second factor was represented by phosphate fertilization (0 and 100 kg ha<sup>-1</sup> of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Root volumes of plants were 25% and 17% higher than those of the standard inoculation with *T. asperellum* and *B. amyloliquefaciens*, respectively. In 2020, co-inoculation with *T. asperellum* increased yield by 15%, plant height by 27%, and net profit by up to US\$ 121 compared with standard inoculation. In 2021, there were increases of 7% and 13% in yield, 18% and 7% in the number of pods, 11% and 2% in reproductive branches, 8% and 4% in plant height, and US\$ 159 and US\$ 309 in net profit compared to standard inoculation, for *T. asperellum* and *B. amyloliquefaciens*, respectively. Our results indicate the possibility of expanding soybean co-inoculation with local strains of *Bacillus* and *Trichoderma*, with benefits in productivity and profitability.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, PGPMs, *Trichoderma asperellum*.

### 3.1 Introdução

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é a leguminosa mais importante do mundo, com finalidade alimentar, industrial e produção de biocombustível (SCHMUTZ et al., 2010; ZOU et al., 2021). Brasil, Estados Unidos e Argentina são os principais produtores mundiais dessa leguminosa, respectivamente (USDA, 2021). Em 2020, 36,949 milhões de hectares foram cultivados no Brasil, com uma produção de 124,844 megatoneladas (CONAB, 2021). No mesmo ano, 45% das importações chinesas de soja, o maior consumidor mundial de alimentos, vieram do Brasil (YAO et al., 2020).

A soja brasileira é altamente competitiva, em grande parte devido à contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN), que pode substituir completamente os fertilizantes nitrogenados, com grandes benefícios ambientais (DÖBEREINER, 1997; HUNGRIA et al., 2006; HUNGRIA; MENDES, 2015). Este sucesso resulta de décadas de pesquisa sobre a seleção de genótipos com maior capacidade de FBN e o uso de estirpes elite de *Bradyrhizobium* usadas como inoculante no momento da semeadura (DÖBEREINER, 1997; HUNGRIA; MENDES, 2015). Estima-se que se poupam anualmente cerca de 20 bilhões de dólares ao substituir os fertilizantes nitrogenados pela FBN (SANTOS et al., 2019).

O sucesso da associação soja-*Bradyrhizobium* destaca a importância dos estudos de plantas com microrganismos benéficos (LEITE et al., 2019). Recentemente, diversas pesquisas têm procurado aumentar os benefícios desta associação através da coinoculação da soja com outros microrganismos promotores de crescimento de plantas (MPCP). (HUNGRIA et al., 2013; BONONI et al., 2020; RONDINA et al., 2020). A coinoculação envolve a adição de mais de um microrganismo benéfico, cada um atuando em diferentes processos microbianos, para maximizar o desenvolvimento das plantas (FILIPINI et al., 2020; SILVA et al., 2020a, b).

Estudos constataram que a coinoculação de soja com *A. brasilense* aumentou o crescimento das plantas, a biomassa vegetal, a produção de grãos, as características morfológicas das raízes e a rentabilidade dos agricultores (HUNGRIA et al., 2013; CERZINI et al., 2016; GALINDO et al., 2018; SILVA et al., 2019; RONDINA et al., 2020). A coinoculação com esta bactéria é amplamente adotada nos países da América Latina (BARBOSA et al., 2021).

Avaliando a coinoculação da soja com *Bacillus amyloliquefaciens*, Sharma et al. (2013) sugeriram que esta associação pode promover o crescimento das plantas,

a assimilação de nutrientes e o rendimento da soja. Oliveira et al. (2019) definiram esta espécie como promissora para a coinoculação da soja, sendo capaz de aumentar a produção de grãos em comparação com a inoculação apenas com *Bradyrhizobium*. Além disso, Bononi et al. (2020) e Silva et al. (2020b), em experimentos em casa de vegetação, encontraram maior biomassa vegetal, altura da planta e eficiência na absorção de fósforo na soja coinoculada com *T. asperellum*, recomendando mais estudos com este fungo em associação com a cultura.

Microrganismos dos gêneros *Pseudomonas* (AFZAL et al., 2010; SILVA et al., 2020b), *Burkholderia* (SILVA et al., 2020a), *Actinomyces* (NIMNOI et al., 2014), *Azospirillum* (CEREZINI et al., 2016; SILVA et al., 2019), *Bacillus* (ATIENO et al., 2012; SUBRAMANIAN et al., 2014), e *Trichoderma* (BONONI et al., 2020; BUSO et al., 2021), bem como os fungos micorrízicos (IGIEHON; BABALOLA, 2017; COFRÉ et al., 2020) são reconhecidos como promotores de crescimento que beneficiam as plantas de soja. Esses microrganismos proporcionam benefícios adicionais através de processos como a FBN (DÖBEREINER, 1997), solubilização de fósforo e potássio (MAHANTA et al., 2014; BASAK et al., 2020), síntese de sideróforos (YADAV et al., 2020), e atividade de fitormônios (FUKAMI et al., 2018). Além disso, podem conferir às plantas tolerância a estresses bióticos e abióticos através de uma ampla gama de mecanismos (RUBIN et al., 2017; FUKAMI et al., 2018; LEITE et al., 2019; CUI-JUAN et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021).

Nesta perspectiva, a Amazônia é reconhecida como um bioma rico em microrganismos com benefícios potenciais para as plantas (ROSA, 2021; FERRAREZI et al., 2022). Estudos com cepas da região amazônica já indicaram benefícios para as plantas de arroz (*Oryza sativa*) e soja com *Trichoderma asperellum* (FRANÇA et al., 2015; BONONI et al., 2020; SILVA et al., 2020a), palma de óleo (*Elaeis guineensis*) com *Bacillus amyloliquefaciens* (LIMA et al., 2020), milho (*Zea mays*) com *Bacillus thuringiensis* e *Burkholderia ambifaria* (FERRAREZI et al., 2022), açaí (*Euterpe oleracea*) com *Burkholderia pyrrocinia* (CASTRO et al., 2020), entre outros. Estes resultados indicam a possibilidade de prospectar diferentes microrganismos isolados da região amazônica para coinoculação da soja, em busca de maior produtividade e aumento da rentabilidade para agricultores.

A hipótese deste estudo é de que a adoção da tecnologia de coinoculação da soja com microrganismos benéficos isolados dos solos amazônicos pode melhorar o rendimento das culturas, aumentar a rentabilidade e contribuir para a promoção de

uma agricultura mais sustentável. O objetivo foi avaliar a coinoculação de plantas de soja com *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, com dois níveis de fertilização fosfatada.

### 3.2 Material e Métodos

#### 3.2.1 Casa de vegetação

Foi realizado um experimento em condições de casa de vegetação na Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil. (Fig. 1). Plantas de soja (cv. M8644IPRO) foram cultivados em vasos (6 dm<sup>3</sup>) preenchidos com um Latossolo argiloso de campos comerciais de soja em Paragominas, Pará, Brasil (3°22'26.3" S, 47°25'36.3" W). A textura do solo (DONAGEMA et al., 2017) e as propriedades químicas (VAN RAIJ et al., 2001) foram determinadas antes da implementação do experimento e são apresentadas na tabela 1.

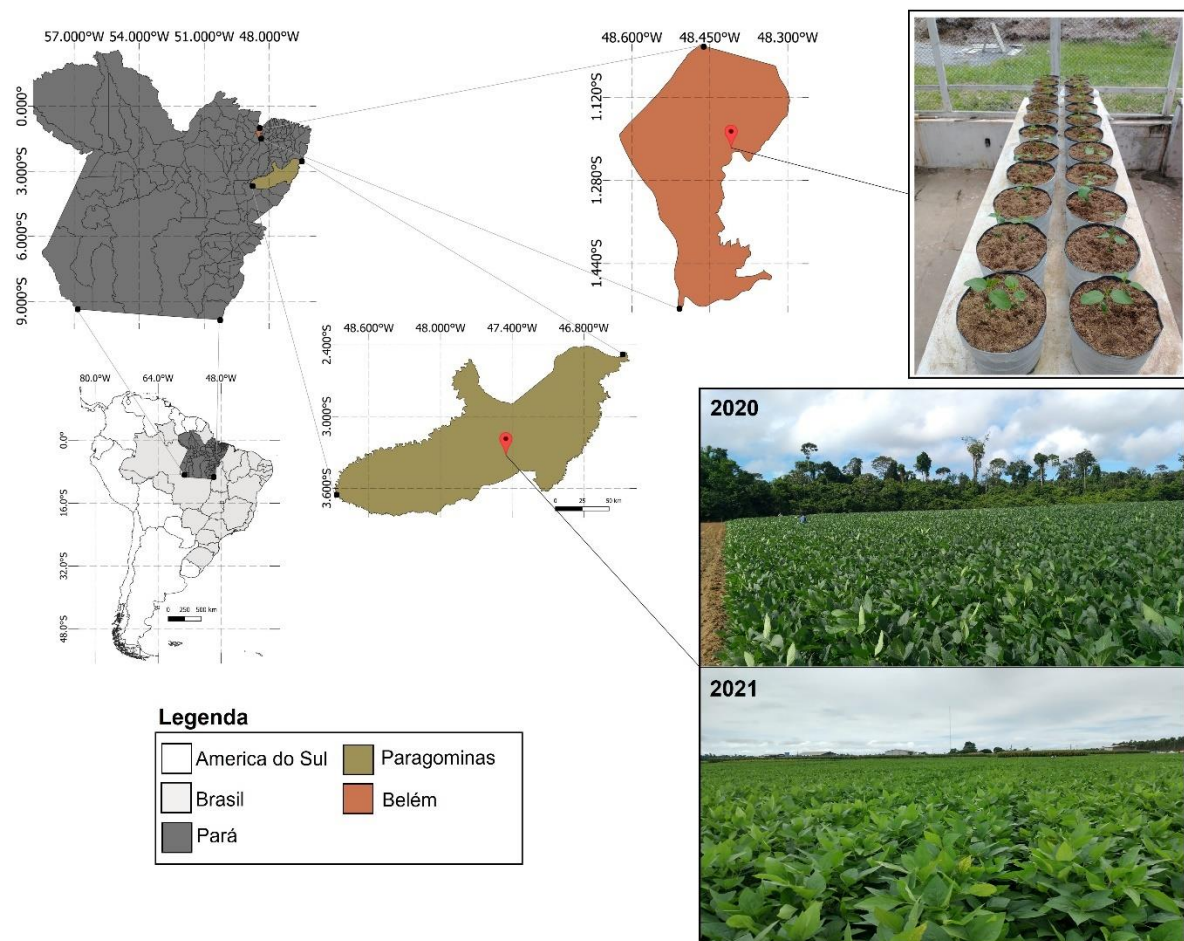


Figura 1. Localização geográfica do campo experimental no município de Paragominas e casa de vegetação no município de Belém.

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo (camada 0-20 cm) usado nos experimentos de casa de vegetação e campo.

Casa de vegetação				
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,60	Manganês (mg/kg)	19,50	
Matéria orgânica (dag/kg)	3,07	Zinco (mg/kg)	0,80	
Fósforo (mg/kg)	10,30	Alumínio trocável (cmol <sub>c</sub> /kg)	0,00	
Potássio (mg/kg)	118,01	H+Al (cmol <sub>c</sub> /kg)	3,30	
Calcio (cmol <sub>c</sub> /kg)	4,58	Soma de bases (cmol <sub>c</sub> /kg)	6,30	
Magnésio (cmol <sub>c</sub> /kg)	1,45	CTC (cmol <sub>c</sub> /kg)	9,60	
Enxofre (mg/kg)	25,00	V%	65,90	
Boro (mg/kg)	0,27	Areia (%)	11,00	
Cobre (mg/kg)	0,20	Silte (%)	20,80	
Ferro (mg/kg)	73,00	Argila (%)	68,20	
Campo				
	2020	2021	2020	2021
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,80	5,60	Manganês (mg/kg)	5,20 7,10
Matéria orgânica (dag/kg)	3,26	3,96	Zinco (mg/kg)	1,20 0,70
Fósforo (mg/kg)	21,40	10,00	Alumínio trocável (cmol <sub>c</sub> /kg)	0,00 0,00
Potássio (mg/kg)	98,30	236,50	H+Al (cmol <sub>c</sub> /kg)	2,10 2,90
Calcio (cmol <sub>c</sub> /kg)	4,42	4,85	Soma de bases (cmol <sub>c</sub> /kg)	6,30 7,60
Magnésio (cmol <sub>c</sub> /kg)	1,63	2,10	CTC (cmol <sub>c</sub> /kg)	8,40 10,50
Enxofre (mg/kg)	7,39	13,00	V%	75,00 72,00
Boro (mg/kg)	0,45	0,43	Areia (%)	10,50 12,30
Cobre (mg/kg)	0,70	0,20	Silte (%)	05,00 23,20
Ferro (mg/kg)	36,00	41,00	Argila (%)	84,50 64,50

K, Cu, Fe, Mn e Zn: extração com Mehlich-1; P disponível em resina; Ca, Mg e Al trocáveis: extração com KCl; H + Al: extração com acetato de cálcio; S: extrator Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,01M; B: extrator BaCl<sub>2</sub> 0,125% água quente.

O desenho experimental foi completamente casualizado, com esquema fatorial 3x2, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto pela inoculação simples com *Bradyrhizobium* spp. e pela coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e cepas de microrganismos isolados da região Amazônica (*T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, sob vegetação natural e palma de óleo, respectivamente). O segundo fator foi composto pela aplicação de fertilizante fosfatado (0 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) no momento da semeadura.

Todos os tratamentos foram inoculados com cepas comerciais de *Bradyrhizobium* [cepa SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkani*) e SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*)], numa concentração de 5 × 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> e aplicado na dose de 300 mL ha<sup>-1</sup>, fornecendo aproximadamente 7.5 × 10<sup>6</sup> células por semente<sup>-1</sup>. A inoculação apenas com *Bradyrhizobium* (inoculação padrão) é considerada como um tratamento controle na soja, já que a prática é adotada anualmente pelos agricultores, mesmo em áreas que foram inoculadas por vários anos (MORETTI et al., 2021).

Foram aplicadas as seguintes dosagens de microrganismos para a coinoculação: (i) uma mistura de cepas de *T. asperellum* isoladas de solos sob a vegetação natural de floresta amazônica, anteriormente descritas como Ufra T06, T09, T12, e T52 (SILVA et al., 2012), a uma concentração de  $10^9$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ; e (ii) *B. amyloliquefaciens* UFRAB01, isolado de um solo amazônico sob plantas de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), conforme descrito por Lima et al. (2020), em uma concentração de  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

As cepas de microrganismos isolados da Amazônia brasileira, representadas por *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, estão depositadas no Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém.

*B. amyloliquefaciens* foi cultivado em meio sólido 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 48 h a 28 °C. A suspensão bacteriana foi preparada com água destilada e esterilizada, e a concentração foi ajustada num espectrofotômetro a 540 nm de absorvância (densidade óptica de 0,5 =  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ).

Os componentes fúngicos do mix de *T. asperellum* (T06, T09, T12 e T52) foram cultivados individualmente em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) durante cinco dias a 25 °C com um fornecimento contínuo de luz (para estimular a esporulação). Uma única suspensão foi preparada a partir de cada um dos quatro isolados, utilizando água destilada e estéril. A concentração fúngica foi determinada pela contagem de esporos em uma câmara Neubauer e ajuste para  $10^9$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ .

As doses aplicadas dos microrganismos foram proporcionais às utilizadas no campo: 300 mL para rizóbios e 150 mL para cada microrganismo em coinoculação, todos diluídos em um volume final de 70 L  $\text{ha}^{-1}$  de água.

A semeadura ocorreu em 20 de julho de 2021, com uma densidade de quatro sementes por vaso, com posterior desbaste para duas plantas por vaso. Antes da semeadura, o solo dos vasos recebeu 100 kg  $\text{ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (para tratamentos de fertilização fosfatada), 30 kg  $\text{ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$  e 30 kg  $\text{ha}^{-1}$  de fonte de micronutrientes (Mo, 0,1%; B, 1,8%; Cu, 0,8%; Mn, 2%; Zn, 7%). Durante o período experimental, o solo foi irrigado diariamente (água não esterilizada) para manutenção da capacidade do campo do solo.

As plantas foram avaliadas 30 dias após a semeadura (DAS) durante o estágio fenológico V5 (FEHR; CAVINESS, 1977). A altura da planta foi determinada usando uma régua graduada, considerando a distância do solo até a parte superior da planta,



o índice de clorofila foi avaliado usando três medidas na terceira folha totalmente expandida, contada a partir do ápice, com um medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica Minolta, Japan), e a área foliar foi medida pela leitura de imagens digitais de todas as folhas da planta com um programa para avaliar a área foliar a partir de uma distância conhecida e uma área de referência (Petiole<sup>®</sup> measure leaf area).

No final do experimento, as plantas foram cuidadosamente recolhidas e separadas em parte aérea e raízes. As raízes foram lavadas e separadas dos nódulos radiculares. A seguir, o volume da raiz foi avaliado após a imersão em água através do deslocamento em um cilindro graduado (RONDINA et al., 2020). Os nódulos radiculares foram contados manualmente. Parte aérea, raízes e nódulos foram identificados, acondicionados em sacos de papel e armazenados em estufa de circulação de ar forçado a 55 °C até se obter um peso constante.

Posteriormente, as amostras secas (parte aérea e raízes) foram moídas num moinho de facas de aço inoxidável (tipo Willey, peneira de 20 mesh) e armazenadas para análise nutricional. Os conteúdos de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) foram determinados de acordo com os protocolos descritos por Silva (2009). O conteúdo de N foi avaliado por digestão sulfúrica e determinação em um destilador de Kjeldahl. Os conteúdos de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, e Zn foram analisados por digestão nitroperclórica e espectroscopia de emissão atômica plasmática acoplada indutivamente (ICP-AES). O B foi determinado pela digestão a seco e ICP-AES. A partir dos conteúdos nutricionais, os valores foram multiplicados pelos respectivos pesos secos para determinar o conteúdo total de macro e micronutrientes na parte aérea e raízes.

### *3.2.2 Experimentos de campo*

Experimentos de campo foram realizados nas safras de 2020 e 2021, no município de Paragominas, estado do Pará, norte do Brasil (3°22'26.3" S, 47°25'36.3" W) (Fig. 1). A região tem clima "Aw" com transição para "Am," de acordo com o sistema de classificação internacional Köppen (ALVARES et al., 2013). O solo das áreas experimentais apresenta uma textura argilosa (Tabela S1) e é classificado como um Oxisol de acordo com a Soil Survey Staff (2014) (Latosolo, de acordo com SiBCS, 2018; Ferralsols, de acordo com WRB/FAO, 2015). O desenho experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 3x2, com quatro repetições. Os tratamentos

e concentrações de microrganismos foram semelhantes aos descritos em casa de vegetação.

A fertilização com potássio ( $150 \text{ kg ha}^{-1}$  de KCl) foi aplicada no campo antes da semeadura. A unidade experimental consistiu em 12 linhas de semeadura (espaçadas a 0,5 m) com um comprimento de 25 m, totalizando uma área de  $3.600 \text{ m}^2$ . A cultivar de soja M8644IPRO (Agro Bayer) foi utilizada a uma taxa de  $11 \text{ sementes m}^{-1}$ . A semeadura ocorreu em sistema convencional em 20 de janeiro de 2020 no primeiro ano e no sistema de plantio direto [sob palha de milho (*Pennisetum glaucum*)] em 30 de janeiro de 2021, no segundo ano, realizada com uma semeadora modelo Stara (Vitória 4050) com seis linhas, uma velocidade de semeadura de  $6 \text{ km h}^{-1}$ , com inoculação, coinoculação e fertilização fosfatada no sulco de semeadura. As práticas culturais foram conduzidas de acordo com as recomendações para o cultivo da soja, com aplicações de inseticidas, herbicidas e fungicidas registrados para o controle de pragas e doenças, sempre que necessário (EMBRAPA, 2020). Os dados de temperatura e precipitação foram coletados durante o período experimental (Fig. 2).

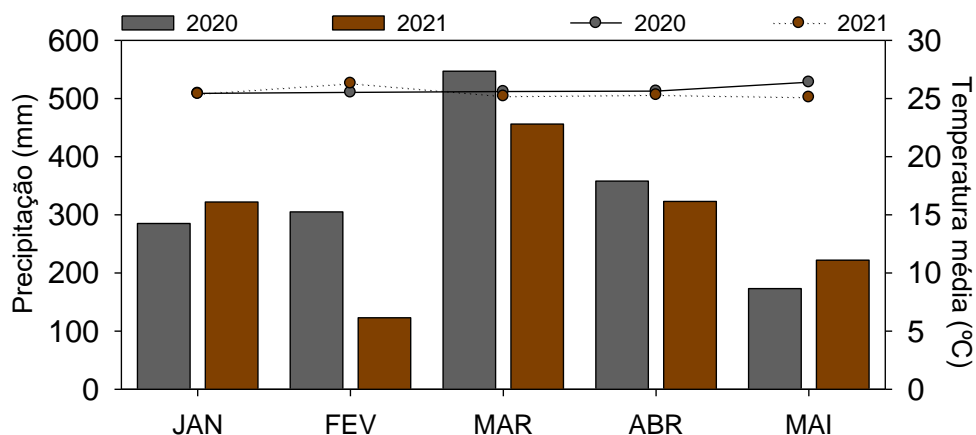


Figura 2. Dados de precipitação e temperatura da área experimental durante os anos de 2020 e 2021.

A diagnose foliar de soja ocorreu através da coleta da 3ª folha com pecíolo de 20 plantas em cada parcela durante a fase de florescimento pleno R2 (FEHR; CAVINESS, 1977). Os teores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn e Mo) foram determinados utilizando protocolos de preparo e análise de amostras semelhantes aos utilizados em casa de vegetação.

A colheita ocorreu em 11 de maio de 2020 e 23 de maio de 2021 para o primeiro e segundo ano, respectivamente, com colheita manual de  $5 \text{ m}^2$  nas fileiras centrais de

cada parcela, seguida de debulha mecânica. Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta, altura de inserção da primeira vagem, número de vagens, número de grãos, grãos por vagem, ramos reprodutivos, peso de 1.000 grãos e produção de grãos. No final do experimento, foi realizada uma análise econômica do uso da tecnologia de coinoculação da soja.

A altura da planta foi medida com uma régua graduada desde o solo até à parte superior da planta. A altura de inserção da primeira vagem foi medida diretamente do chão até a inserção da primeira vagem. O número de vagens, grãos e ramos reprodutivos foram avaliados por contagem manual. O número de grãos por vagem foi calculado dividindo o número de grãos por planta pelo número de vagens por planta. Para o peso de 1.000 grãos, 100 grãos foram contados manualmente, pesados em uma balança, e depois extrapolados para 1.000 grãos. Para determinar o rendimento de grãos, as sementes foram ajustadas a um teor de umidade de 13%, e os valores foram convertidos para  $\text{kg ha}^{-1}$ .

#### *3.2.2.1 Análise econômica*

A metodologia de custos de produção proposta pela Companhia Nacional de Abastecimento foi utilizada para a análise econômica do uso da tecnologia de coinoculação da soja (CONAB, 2010). Os custos variáveis foram obtidos da propriedade onde o experimento de campo foi conduzido. Depreciação (máquinas, implementos e edificações rurais), outros custos fixos (manutenção, encargos sociais e seguros), e renda de fatores (retorno esperado do capital fixo e do uso do solo) foram determinados de acordo com as estimativas da Conab para a cultura a um alto nível tecnológico nos anos 2020 e 2021. Para determinar os custos variáveis, foram utilizadas as despesas de custeio (operação de máquinas, mão-de-obra, administrador, sementes, fertilizantes de plantio, fertilizantes foliares, inoculantes e adjuvantes), defensivos (herbicidas, inseticidas e fungicidas) e outras despesas financeiras e outras (transporte externo, custos administrativos, armazenamento e contribuição especial para a segurança social rural). Para custos fixos, depreciação (maquinário e edificações rurais) e outros custos fixos foram determinados. O custo operacional foi composto pela soma dos custos fixos e variáveis. O custo total foi composto pelo custo operacional e pela renda de fatores.

Para determinar a rentabilidade do uso da tecnologia, os indicadores financeiros renda bruta (RB) (rendimento em sacas de 60 kg multiplicado pelo preço

médio de venda), lucro operacional (Equação 1), lucro líquido (Equação 2) e índice de lucratividade (Equação 3) foram utilizados de acordo com Martin et al. (1997). Além disso, um indicador denominado acréscimo da coinoculação (Equação 4) foi criado para medir a rentabilidade da prática da coinoculação em comparação com a inoculação padrão com *Bradyrhizobium* spp.

$$LO = RB - COT \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = RB - CT \quad \text{Equação 2}$$

$$IL = \left( \frac{LO}{RB} \right) * 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$AC = LO_C - LO_I \quad \text{Equação 4}$$

onde LO = lucro operacional, COT = custo operacional total, LQ = lucro líquido, CT = custo total, IL = índice de lucratividade, AC = acréscimo da coinoculação, LO<sub>C</sub> = lucro operacional em tratamento com coinoculação, e LO<sub>I</sub> = lucro operacional em tratamento com inoculação padrão.

A produtividade utilizada nas análises de custo e rentabilidade foi relativa a cada tratamento (inoculação padrão com *Bradyrhizobium* spp., coinoculação com *T. asperellum* e coinoculação com *B. amyloliquefaciens*) com e sem aplicação de fertilizante fosfatado, e o preço médio de acordo com o estabelecido pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA, 2020, 2021) na data da colheita dos experimentos. O preço dos microrganismos utilizados na coinoculação foi estimado com base em produtos comerciais contendo as mesmas espécies. Todos os valores foram convertidos de reais (moeda brasileira) para dólares americanos (taxa de câmbio na data da colheita).

### 3.2.3 Análise estatística

Inicialmente, os dados foram analisados para normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965) e homocedasticidade (LEVENE, 1960). Devido ao baixo conteúdo em micronutrientes (parte aérea e raízes), os dados foram transformados ( $\sqrt{x + 0.5}$ ). Posteriormente, todos os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, o teste Tukey ( $p < 0.05$ ) foi aplicado.

O conteúdo nutricional na parte aérea e raízes são apresentados separadamente nos gráficos, mas foram somados para realizar a análise estatística do conteúdo total de nutrientes. Os gráficos foram confeccionados usando SigmaPlot 10<sup>®</sup>. Foi criado um mapa de calor através do cálculo da correlação de Pearson para

avaliar a relação entre os parâmetros medidos nos experimentos de campo, com a ajuda do pacote "corrplot". usando a linguagem R (R CORE TEAM, 2019).

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Casa de vegetação

Os resultados da análise de variância indicaram que, exceto pelo conteúdo de Mn, todas as outras variáveis avaliadas sob condições de casa de vegetação foram significativas para a fertilização fosfatada. Os teores de macronutrientes mostraram diferença apenas para o fator de fertilização fosfatada (Fig. 3).

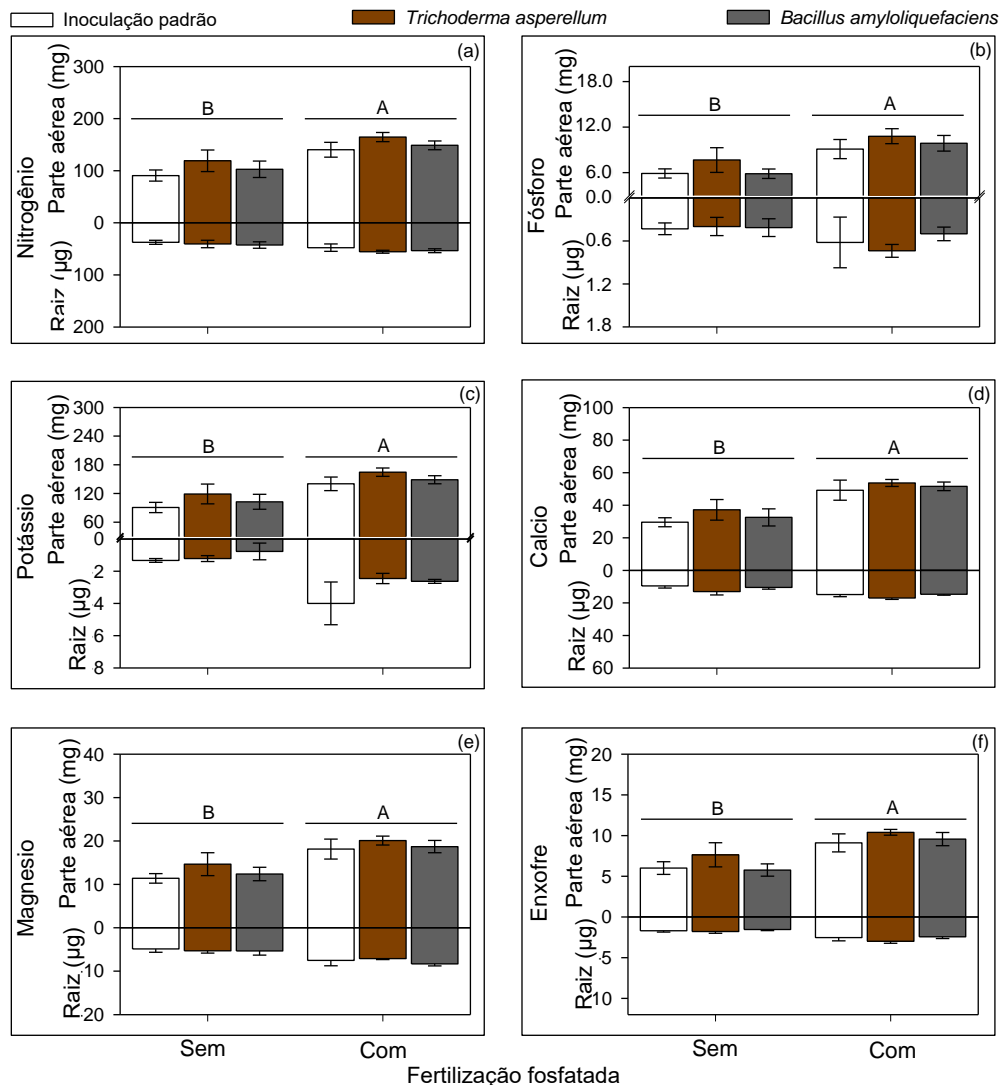


Figura 3. Conteúdo total de macronutrientes em plantas de soja coinoculadas com microrganismos benéficos isolados de solo amazônico, em casa de vegetação. Os dados correspondem aos valores médios de quatro repetições; Letras iguais, maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, não diferem significativamente pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

O volume radicular das plantas coinoculadas foi maior em 25,8% para *T. asperellum* e 17,7% e *B. amyloliquefaciens* em relação à inoculação padrão com *Bradyrhizobium* spp., independentemente da aplicação de fertilizantes fosfatados (Tabela 2). O teor de Fe em plantas coinoculadas foi superior em 17,0% para *T. asperellum* e 26,6% para *B. amyloliquefaciens* em relação à inoculação padrão, independentemente da fertilização fosfatada (Fig. 4c).

Tabela 2. Parâmetros de crescimento, nodulação e raízes de plantas de soja coinoculadas com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, em casa de vegetação.

	Altura de plantas (cm)			Índice de clorofilas (SPAD)		
	Sem	Com	Média	Sem	Com	Média
l.p	40,25±0,75	48,00±2,79	44,12 a	28,77±1,14	32,17±1,40	30,47 a
<i>T.a</i>	39,75±1,93	52,00±1,08	45,87 a	29,90±0,34	31,17±0,67	30,53 a
<i>B.a</i>	38,00±2,12	49,50±2,62	43,75 a	29,22±0,61	32,07±0,79	30,65 a
Média	39,33 B	49,83 A		29,30 B	31,80 A	
CV (%)	9,10			5,89		
	Área foliar (cm <sup>2</sup> )			Massa seca da parte aérea (g)		
	Sem	Com	Média	Sem	Com	Média
l.p	529,07±53	651,70±61	590,3 a	2,05±0,27	2,75±0,21	2,40 a
<i>T.a</i>	581,62±90	661,80±25	621,7 a	2,14±0,32	3,14±0,11	2,64 a
<i>B.a</i>	518,54±39	639,65±38	579,0 a	2,04±0,19	3,09±0,11	2,56 a
Média	543,08 B	651,05 A		2,08 B	2,99 A	
CV (%)	18,61			17,46		
	Volume radicular (cm <sup>3</sup> )			Massa seca das raízes (mg)		
	Sem	Com	Média	Sem	Com	Média
l.p	07,95±0,47	14,87±0,77	11,41 b	416,8±27	692,5±47	554,6 a
<i>T.a</i>	11,65±0,85	17,09±1,35	14,36 a	487,1±59	731,7±46	609,4 a
<i>B.a</i>	10,37±0,55	16,50±0,61	13,43 a	458,5±32	701,1±28	579,8 a
Média	09,98 B	16,15 A		454,16 B	708,45 A	
CV (%)	9,72			14,41		
	Número de nódulos			Massa seca de nódulos (mg)		
	Sem	Com	Média	Sem	Com	Média
l.p	34,87±4,74	44,75±5,08	39,81 a	11,46±2,46	13,73±1,33	12,60 a
<i>T.a</i>	37,12±1,32	46,62±3,57	41,87 a	11,28±1,48	14,52±1,87	12,90 a
<i>B.a</i>	32,62±6,37	43,75±2,61	38,18 a	11,00±1,00	14,48±0,81	12,74 a
Média	34,87 B	45,04 A		11,25 B	14,25 A	
CV (%)	21,47			25,88		

l.p = Inoculação padrão; T.a = coinoculação com *Trichoderma asperellum*; B.a = coinoculação com *Bacillus amyloliquefaciens*; sem = fertilizante fosfatado não aplicado; com = fertilizante fosfatado aplicado; CV (%) = coeficiente de variação. Os dados correspondem aos valores médios de quatro repetições; Letras iguais,

maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, não diferem significativamente pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

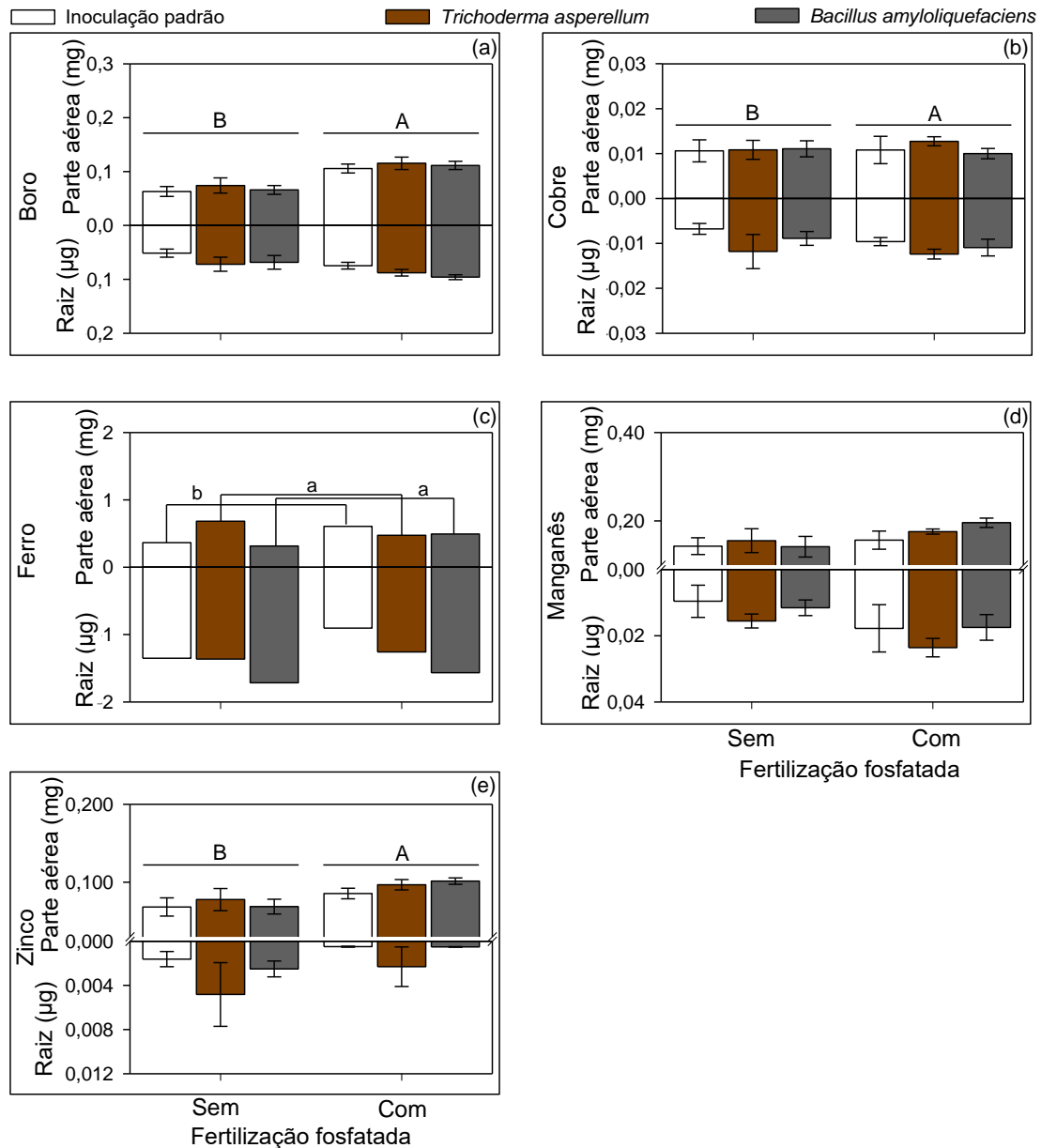


Figura 4. Conteúdo total de micronutrientes em plantas de soja coinoculadas com microrganismos benéficos do solo isolados da Amazônia, em casa de vegetação. Os dados correspondem aos valores médios de quatro repetições. Letras iguais, maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, não diferem significativamente pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

### 3.3.2 Experimentos de campo

#### 3.3.2.1 Teor foliar de macro e micronutrientes

Para o teor foliar de macronutrientes em plantas de soja, apenas o P em 2020 mostrou interação significativa entre os fatores (Fig. 5b).

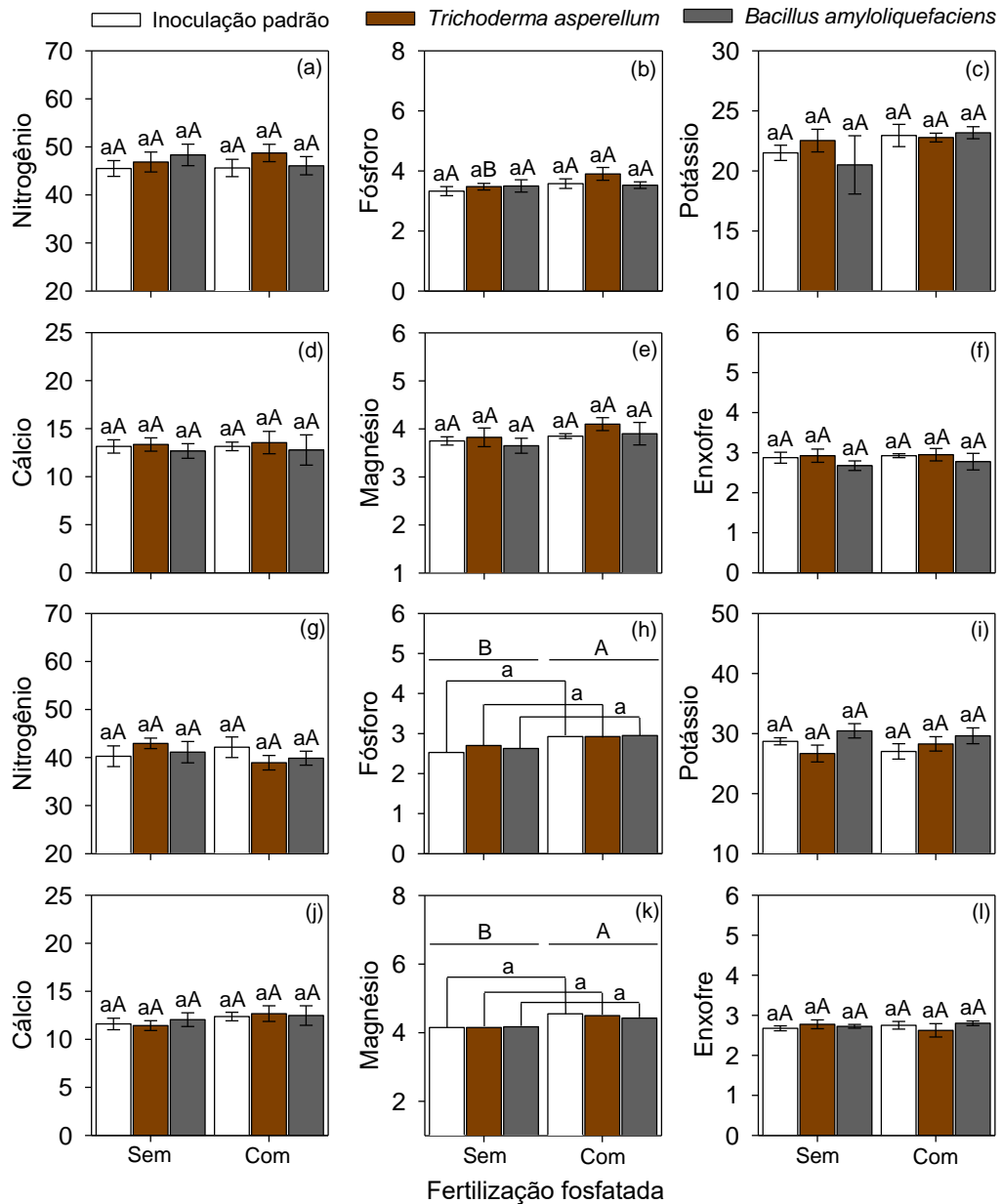


Figura 5. Teor de macronutrientes foliares de plantas de soja coinoculada com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, sob condições de campo nos anos 2020 (a, b, c, d, e e f) e 2021 (g, h, i, j, k e l); valores expressos em g kg<sup>-1</sup>. Os dados correspondem aos valores médios de quatro repetições; Letras iguais, maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, não diferem significativamente pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

Em 2020, com ou sem fertilização fosfatada, o teor foliar permaneceu semelhante entre os tratamentos de coinoculação. No entanto, ao comparar o teor foliar das plantas coinoculadas com o *T. asperellum*, observou-se um maior teor de P nas folhas de plantas que receberam fertilização fosfatada (3,9 g kg<sup>-1</sup>), do que naquelas que não receberam (3,4 g kg<sup>-1</sup>). Em 2021, foi observado maior teor de P



foliar nas plantas que receberam fertilização fosfatada, independentemente da coinoculação ou inoculação padrão.

O teor foliar de Mg em 2021 mostrou diferença significativa para o fator fertilização ( $p < 0,05$ ), com plantas que receberam fertilização apresentando maiores concentrações de Mg foliar (Fig. 5k). O teor foliar do micronutriente Cu das plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens* em 2021 diferiu significativamente nos tratamentos com ( $6,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ou sem ( $3,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) fertilização fosfatada (Fig. 6h).

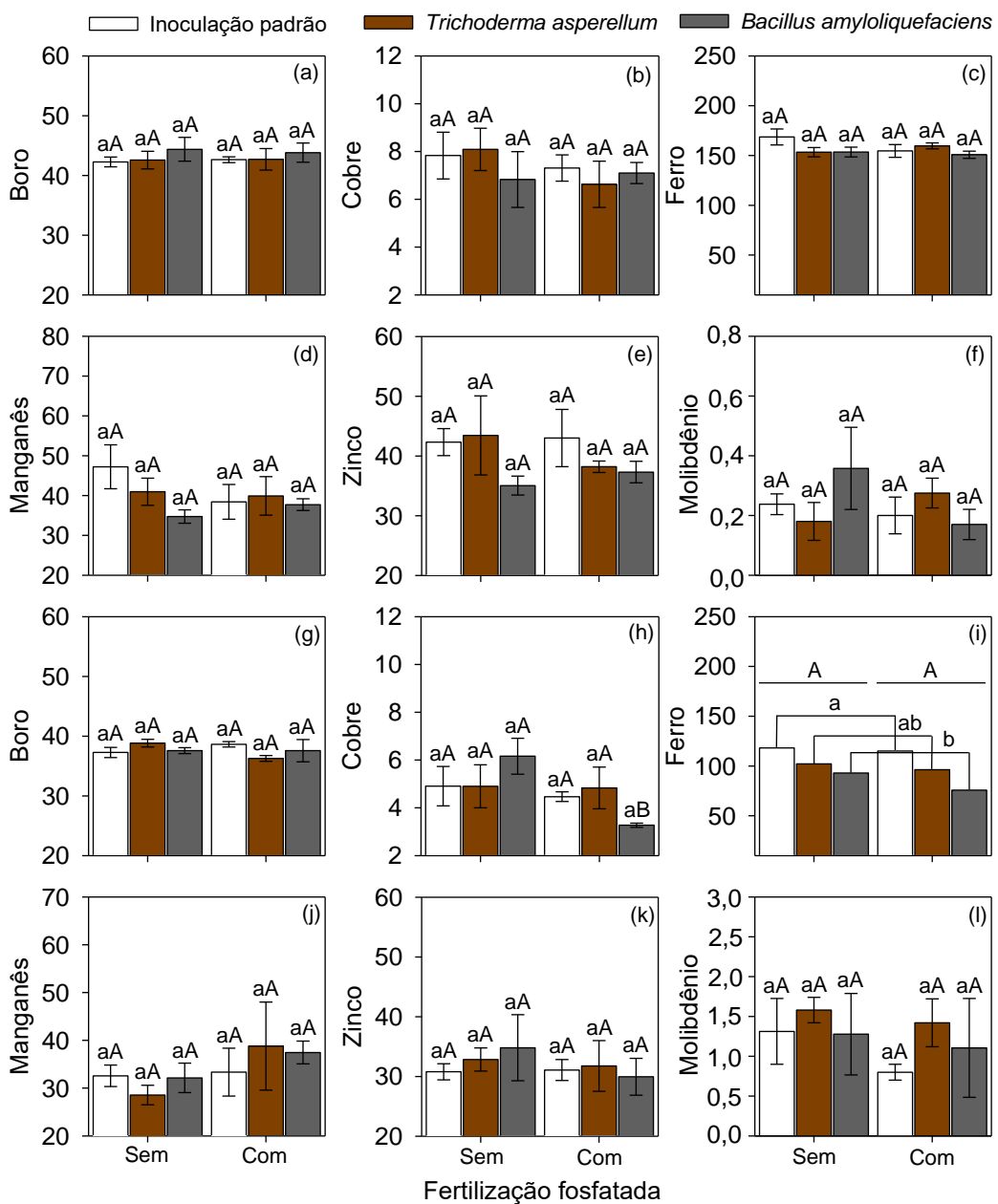


Figura 6. Teor de micronutrientes foliares de plantas de soja coinoculadas com microrganismos benéficos isolados de solo amazônico, sob condições de campo nos anos 2020 (a, b, c, d, e, f) e 2021 (g, h, i, j, k, e l); valores são expressos em  $\text{g kg}^{-1}$ . Os dados correspondem aos valores médios de quatro repetições; Letras iguais,

maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, não diferem significativamente pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

Em 2021, o teor foliar de ferro foi maior para plantas com inoculação padrão com *Bradyrhizobium* spp. (116,6 mg kg<sup>-1</sup>), em comparação com as plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens* (84,4 mg kg<sup>-1</sup>), e semelhantes a plantas coinoculadas com *T. asperellum* (99,3 mg kg<sup>-1</sup>). Para os outros micronutrientes, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à coinoculação ou aplicação de fertilizante fosfatado (Fig. 6).

### 3.3.2.2 Avaliações na maturidade fisiológica

Em 2020, os resultados da análise de variância indicaram uma interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os fatores (coinoculação e fertilizante fosfatado) para altura da planta, altura de inserção da primeira vagem, vagens, grãos e grãos por planta (Fig. 7). Em contraste, a produção de grãos mostrou comportamento independente entre os fatores.

A altura da planta revelou diferença significativa para os microrganismos fornecidos apenas em termos de fornecimento de fertilizante fosfatado, onde as plantas coinoculadas com *T. asperellum* (73 cm) foram superiores aos outros tratamentos (Fig. 7a). Plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens* (65 cm) eram mais altas que as que recebiam a inoculação padrão (57 cm).

A altura de inserção da primeira vagem mostrou diferença significativa entre os microrganismos apenas na ausência de fertilização fosfatada (Fig. 7b), em que plantas com inoculação padrão (18 cm) mostraram maior altura de inserção da primeira vagem, seguida de coinoculação com *T. asperellum* (14 cm).

Na ausência de fertilizante fosfatado, a coinoculação com *B. amyloliquefaciens* promoveu a produção de 99 vagens, o que foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) à coinoculação com *T. asperellum* (79 vagens) e a inoculação padrão com *Bradyrhizobium* spp. (72 vagens) (Fig. 7c). Quando o fertilizante fosfatado foi aplicado, observou-se maior produção de vagens nos tratamentos com inoculação padrão (85 vagens) e coinoculação com *T. asperellum* (94 vagens), em comparação com a coinoculação com *B. amyloliquefaciens* (73 vagens).

Na ausência de fertilização fosfatada, o número de grãos por planta foi maior para plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens*, seguida de coinoculação com *T.*

*asperellum* (Fig. 7d). Com a fertilização fosfatada, o maior número de grãos foi observado em plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* spp. e coinoculado com o *T. asperellum*, em comparação com a coinoculação com *B. amyloliquefaciens*.

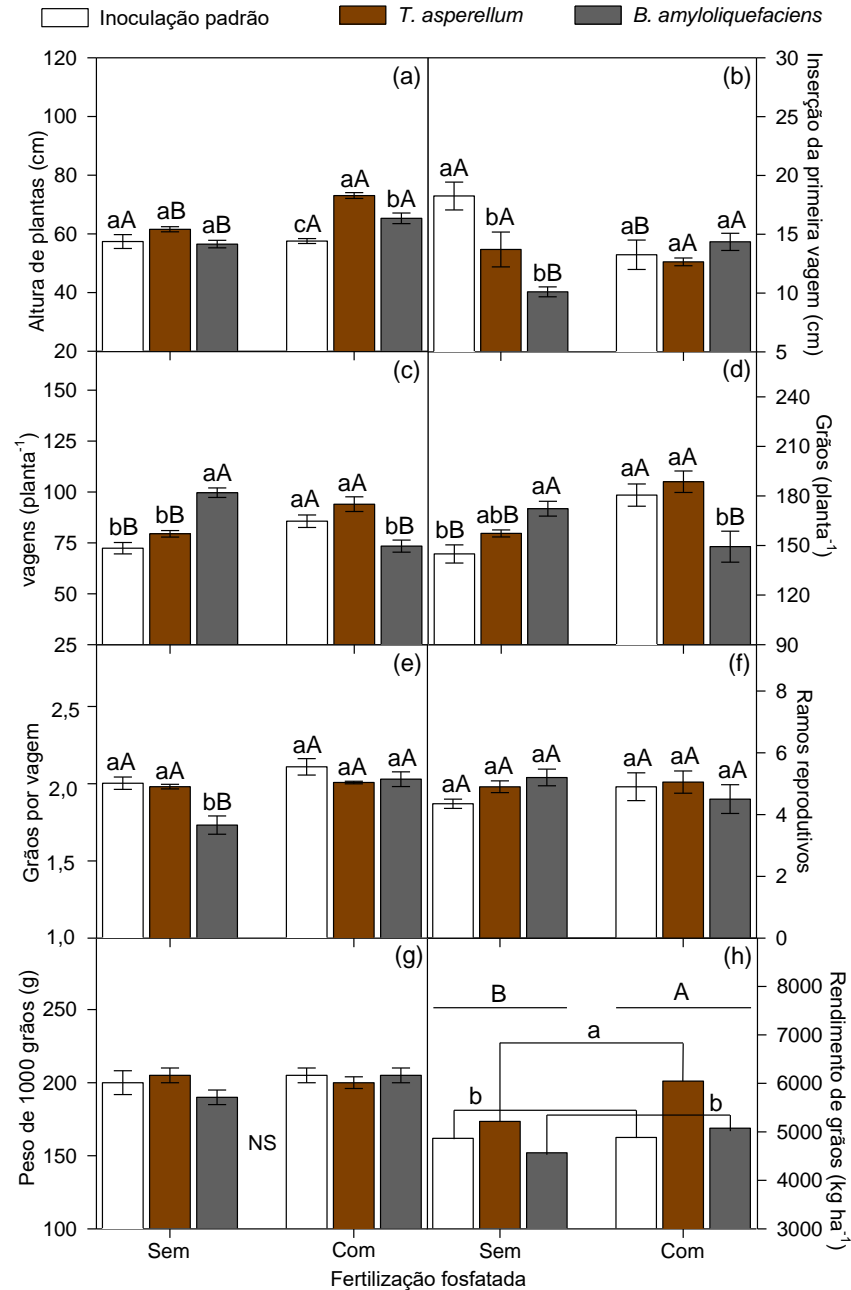


Figura 7. Altura de plantas (a), inserção da primeira vagem (b), vagens (c), grãos (d), grãos por vagem (e), ramos reprodutivos (f), peso de 1000 grãos (g) e rendimento de grãos (h) de plantas de soja com fertilização fosfatada e coinoculadas com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, em condições de campo (2020). Os dados correspondem a valores médios de quatro repetições; Letras distintas, maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, diferem significativamente pelo teste Tukey com 5% de probabilidade. <sup>NS</sup> não significativo.

O rendimento de grãos foi maior ( $p < 0,05$ ) em plantas coinoculadas com *T. asperellum* ( $5.630 \text{ kg ha}^{-1}$ ) do que em plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens*

(4.821 kg ha<sup>-1</sup>) e aquelas que recebem a inoculação padrão com *Bradyrhizobium* spp. (4.875 kg ha<sup>-1</sup>) (Fig. 7h). Em relação à fertilização, o maior rendimento de grãos foi observado em plantas que receberam fertilização fosfatada (5.335 kg ha<sup>-1</sup>) em comparação com aquelas sem fertilização (4.883 kg ha<sup>-1</sup>).

Em 2021, altura da planta, altura de inserção da primeira vagem, número de vagem, número de grãos, número de ramos reprodutivos, peso de 1.000 grãos e rendimento de grãos não apresentaram interação entre os fatores (inoculação versus fertilização fosfatada) (Fig. 8).

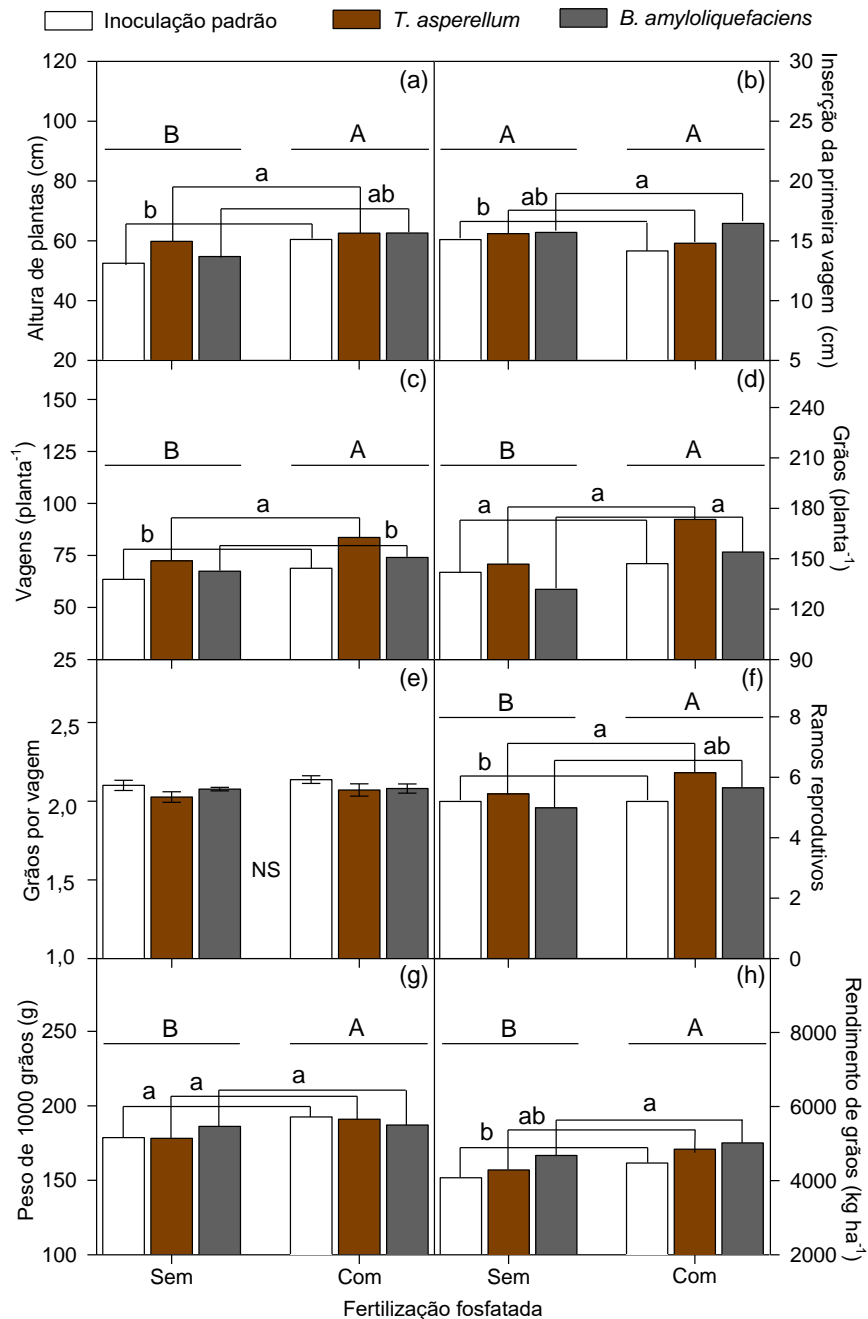


Figura 8. Altura de plantas (a), inserção da primeira vagem (b), vagens (c), grãos (d), grãos por vagem (e), ramos reprodutivos (f), peso de 1000 grãos (g) e rendimento de

grãos (h) de plantas de soja com fertilização fosfatada e coinoculadas com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico, em condições de campo (2021). Os dados correspondem a valores médios de quatro repetições; Letras distintas, maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, diferem significativamente pelo teste Tukey com 5% de probabilidade. <sup>NS</sup> não significativo.

As plantas coinoculadas com *T. asperellum* (61 cm) eram mais altas do que aquelas com inoculação padrão (56 cm), independentemente do fator de fertilização (Fig. 8a). A maior altura de inserção da primeira vagem foi observada em plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens* (16 cm) em comparação com a inoculação padrão (14 cm) (Fig. 8b).

Para o número de vagens, a coinoculação com *T. asperellum* (78 vagens) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que os outros tratamentos, independentemente da fertilização fosfatada (Fig. 8c).

O número de grãos por planta diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) apenas entre as plantas que receberam fertilização fosfatada (158 grãos) e aquelas que não receberam (140 grãos) (Fig. 8d).

O número de ramos reprodutivos mostrou diferença significativa entre os microrganismos fornecidos (Fig. 8f). Plantas coinoculadas com *T. asperellum* (5.8) mostraram maior número de ramos reprodutivos do que a inoculação padrão (5.2). Em relação à fertilização fosfatada, as plantas que receberam fertilizante (5.6) mostraram maior número de ramos reprodutivos do que aquelas não fertilizadas (5.2).

O rendimento de grãos de plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens* ( $4.850 \text{ kg ha}^{-1}$ ) foi significativamente maior que o das plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* spp. ( $4.275 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e semelhante ao das plantas coinoculadas com *T. asperellum* ( $4.568 \text{ kg ha}^{-1}$ ) (Fig. 8h). Em relação à fertilização, o maior rendimento de grãos foi observado em plantas que receberam o fertilizante fosfatado ( $4.781 \text{ kg ha}^{-1}$ ) em comparação com aqueles sem fertilização ( $4.348 \text{ kg ha}^{-1}$ ).

### 3.3.2.3 Análise de custos e rentabilidade da coinoculação

Como esperado, houve um aumento nos custos de produção de soja pela coinoculação nos dois anos em comparação com a inoculação exclusivamente com *Bradyrhizobium* spp. (Fig. 9), e a coinoculação com *B. amyloliquefaciens* foi mais cara quando comparada ao fungo *T. asperellum*.

Na ausência de fertilização fosfatada, o custo de produção total da soja com inoculação padrão era de US\$ 510,8 ha<sup>-1</sup> em 2020 e US\$ 821,9 ha<sup>-1</sup> em 2021. Houve aumento nos custos variáveis de US\$ 10,2 e US\$ 12,3 ha<sup>-1</sup> em 2020 e US\$ 13,5 e US\$ 16,2 ha<sup>-1</sup> em 2021 para coinoculação com *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente.

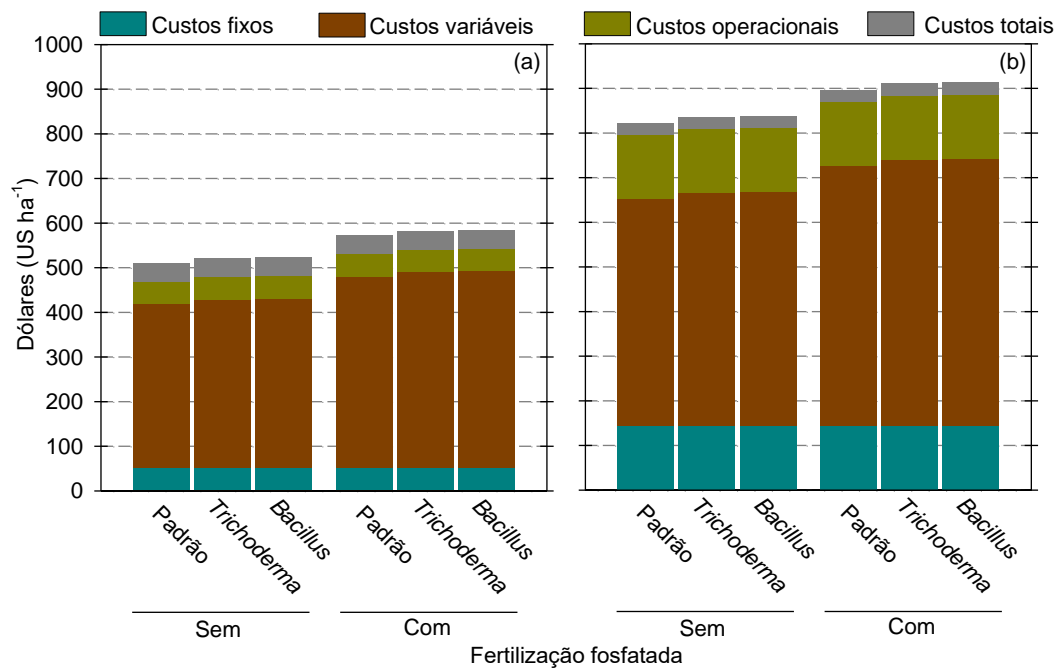


Figura 9. Custos fixos, variáveis, operacionais e totais das plantas de soja submetidas a fertilização fosfatada e coinoculação com microrganismos benéficos isolados dos solos amazônicos, sob condições de campo nos anos de 2020 (a) e 2021 (b).

A fertilização fosfatada aumentou o custo total de todos os tratamentos em US\$ 51,4 ha<sup>-1</sup> em 2020 e US\$ 48,1 D ha<sup>-1</sup> em 2021 (preço do fertilizante na dose aplicada). Não houve aumento nos custos de aplicação da coinoculação com máquinas e combustível, uma vez que a prática ocorreu em mistura com o inoculante aplicado na semeadura, e isso já havia sido incluído nos custos operacionais com maquinário.

Em 2020, a renda bruta aumentou para o tratamento com coinoculação de *T. asperellum* em comparação com a inoculação padrão e a coinoculação com *B. amyloliquefaciens*, independentemente da fertilização fosfatada (Fig. 10a). Em 2021, a maior renda bruta foi obtida no tratamento com coinoculação de *B. amyloliquefaciens*, seguida de coinoculação com *T. asperellum* (Fig. 10e). Para o fator de fertilização, a maior renda bruta foi observada no tratamento com fertilização em comparação com a ausência de fertilização, nos dois anos.

O lucro líquido em 2020 foi maior ( $p < 0,05$ ) no tratamento com *T. asperellum* (US\$ 1.144,5 ha<sup>-1</sup>) comparado à inoculação padrão e coinoculação com *B. amyloliquefaciens* (US\$ 961,0 ha<sup>-1</sup>), independentemente da fertilização fosfatada (Fig. 10b). Em 2021, o maior lucro líquido foi obtido em coinoculação com *B. amyloliquefaciens* (US\$ 1.760,2 ha<sup>-1</sup>), seguido por *T. asperellum* (US\$ 1.610,1 ha<sup>-1</sup>), comparado à inoculação padrão (US\$ 1.451,9 ha<sup>-1</sup>).

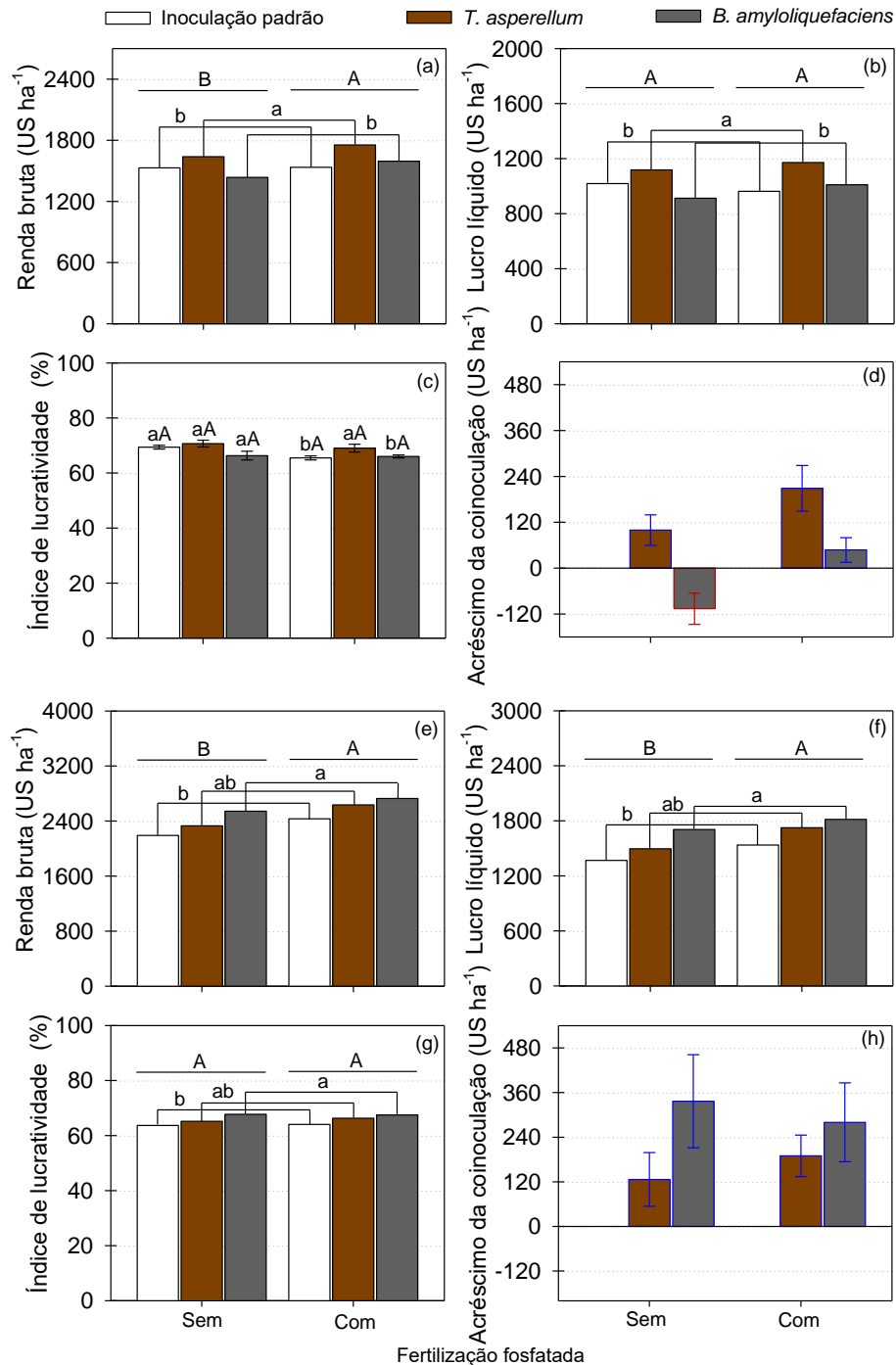


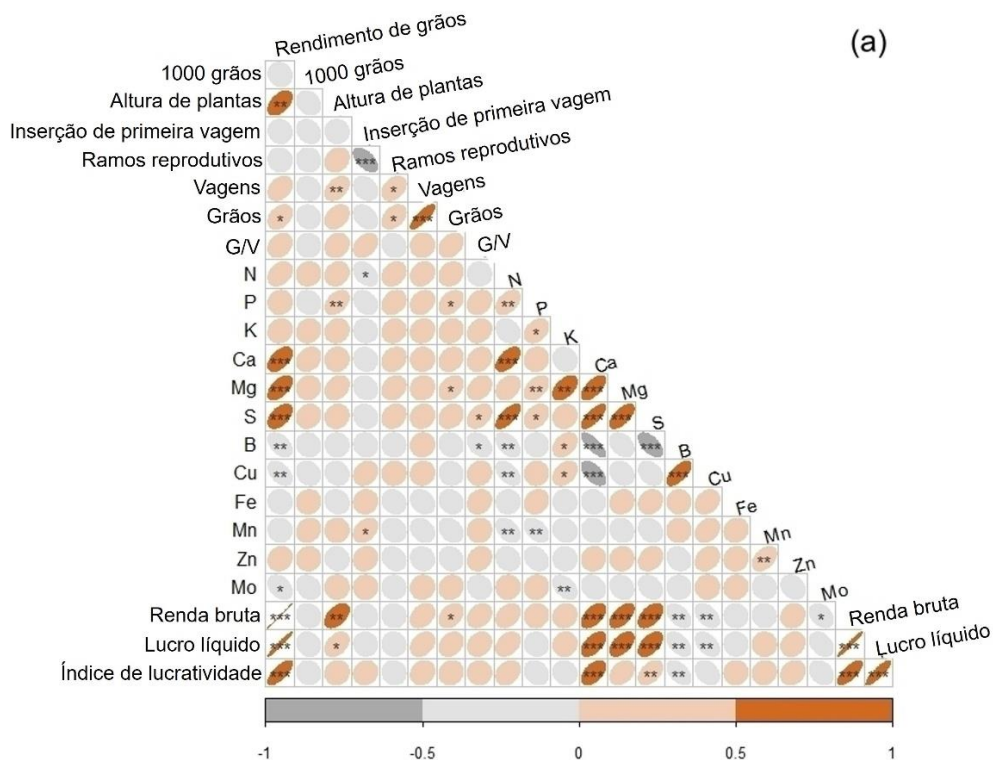
Figura 10. Indicadores de rentabilidade da cultura da soja em função da fertilização fosfatada e coinoculação com microrganismos benéficos isolados do solo amazônico,

em condições de campo durante os anos 2020 (a, b, c, e d) e 2021 (e, f, g, e h). Os dados correspondem a valores médios de quatro repetições; Letras distintas, maiúsculas para fertilização e minúsculas para microrganismos, diferem significativamente pelo teste Tukey com 5% de probabilidade. NS não significativo.

Para o indicador acréscimo da coinoculação (AC) em 2020, sem fertilização fosfatada, o resultado foi de US\$ 99,5 ha<sup>-1</sup> para *T. asperellum*. Com fertilização fosfatada, os valores foram de US\$ 208,8 ha<sup>-1</sup> para *T. asperellum* e US\$ 47,5 ha<sup>-1</sup> para *B. amyloliquefaciens*. Em 2021, sem fertilização fosfatada, o indicador AC foi US\$ 126,4 ha<sup>-1</sup> para *T. asperellum* e 336,6 ha<sup>-1</sup> para *B. amyloliquefaciens*. No mesmo ano, com fertilização fosfatada, o indicador AC foi de US\$ 189,8 ha<sup>-1</sup> para *T. asperellum* e US\$ 279,9 ha<sup>-1</sup> para *B. amyloliquefaciens*.

#### 3.3.2.4 Correlação entre as variáveis medidas em campo

Em 2020, o rendimento de grãos se correlacionou positivamente com a altura de plantas, macronutrientes foliares (Ca, Mg e S) e os indicadores de rentabilidade (Fig. 11a). No entanto, houve uma correlação negativa com os micronutrientes foliares B e Cu. Altura da planta e número de grãos, componentes importantes de rendimento, mostraram correlações positivas com o P-foliar.





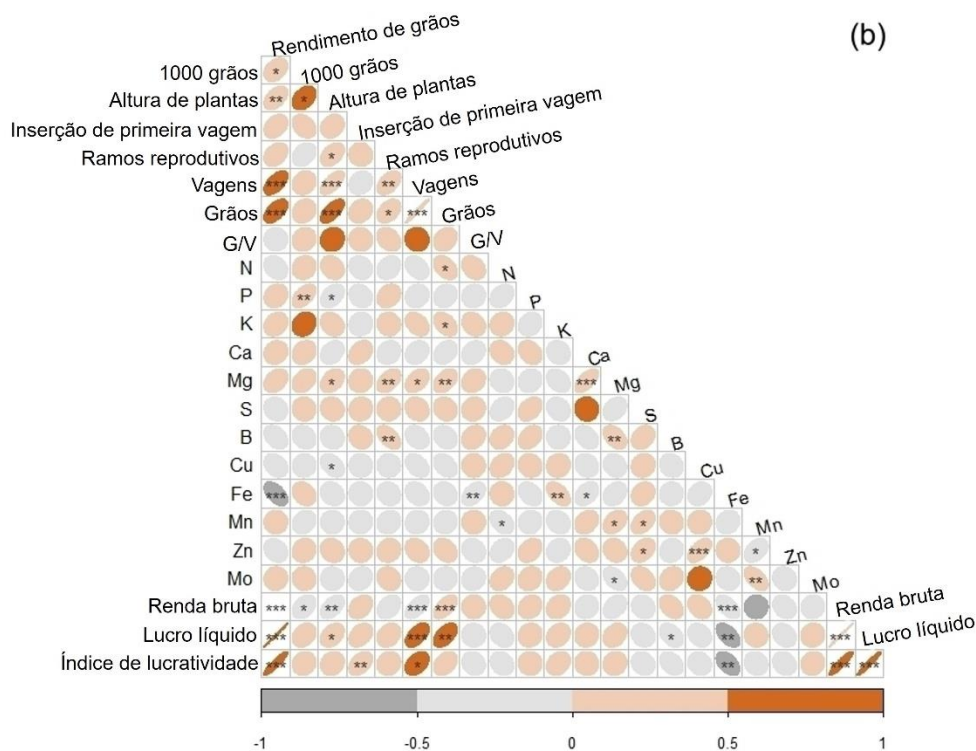


Figura 11. Mapa de calor da correlação da Pearson entre crescimento, produção e parâmetros nutricionais das plantas de soja em condições de campo nos anos de 2020 (a) e 2021 (b). Apenas as variáveis que apresentaram correlações são mostradas.; \*\*\* significativo a 1%, \*\* significativo a 5%, \* significativo a 10%.

Em 2021, o rendimento de grãos foi positivamente correlacionado com a altura da planta, o número de vagens, número de grãos, peso de 1.000 grãos e os indicadores de rentabilidade (Fig. 11b). Foi encontrada uma correlação negativa entre rendimento e teores de Fe nas folhas.

### 3.4 Discussão

O potencial biotecnológico dos microrganismos do bioma amazônico na agricultura permanece em grande parte desconhecido, mas tem mostrado resultados positivos, por exemplo, na soja com *T. asperellum* em condições controladas (BONONI et al., 2020; SILVA et al., 2020b). Nosso estudo fornece resultados pioneiros de ensaios de campo investigando os efeitos das cepas de *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* isolados da região amazônica quando utilizados em coinoculação da soja. Os resultados incluíram a avaliação dos parâmetros radiculares, nodulação, custos de produção e rentabilidade da adoção de micróbios como tecnologia sustentável.

Os teores foliares de macronutrientes e micronutrientes foram considerados adequados para a cultura da soja, tanto em 2020, como em 2021 (SEDIYAMA et al., 2015). O conteúdo de P-foliar das plantas em 2020 mostrou que apenas as plantas coinoculadas com *T. asperellum* foram beneficiados pelo fornecimento de fonte fosfatada. Estes resultados revelaram que a coinoculação com este fungo proporcionou uma maior utilização do nutriente aplicado, o que foi positivamente correlacionado com um maior rendimento. Os fungos têm uma maior capacidade do que as bactérias para buscar P numa área maior do solo, conseqüentemente, podem ser mais importantes para a captação do nutriente (KUCEY, 1983; SHARMA et al., 2013).

A coinoculação teve uma influência direta na altura da soja. Este aumento é uma propriedade desejável do ponto de vista produtivo, devido à sua correlação positiva com a produtividade (LEITE et al., 2017), o que foi confirmado em nosso estudo. Em contraste, a altura de inserção da primeira vagem (AIPV) foi negativamente correlacionada com o rendimento. Apesar dos benefícios de uma AIPV baixa, valores inferiores a 10 cm não são adequados para o cultivo de soja, uma vez que a colheita mecanizada dos grãos em alturas mais baixas pode resultar em perdas substanciais (SEDIYAMA et al., 2005).

Em estudos de coinoculação de soja com *T. asperellum*, Bononi et al. (2020) obtiveram resultados promissores quanto à capacidade deste fungo de solubilizar/mineralizar parcialmente o P-insolúvel e disponibilizá-lo à planta em condições controladas. Essa importante informação levou-nos a avaliar a capacidade deste fungo de contribuir para a nutrição de P na cultura da soja. Outros estudos relataram a melhoria do desempenho do *Trichoderma* com o fornecimento de fertilizante fosfatado (STEWART; HILL, 2014; GARCÍA-LÓPEZ et al., 2015; BONONI et al., 2020).

A quantidade e distribuição dos ramos determina a arquitetura do dossel, influenciando a interceptação da luz, a resistência ao acamamento e a produção de sementes (YANG et al., 2021). No presente estudo, resultados positivos com a coinoculação de *T. asperellum* foram observados, com um aumento de 18% no número de ramos em comparação com a inoculação padrão com *Bradyrhizobium* spp.

Recentemente, estudos com *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* e *Claviceps purpurea* identificaram seis genes ortólogos relacionados com a biossíntese ou sinalização de citocinina (ck) em *Trichoderma*, indicando a possível produção deste

fitormônio pelo fungo (GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2018). Outro estudo identificou que cepas de *Trichoderma* produzem citocininas (BEAN et al., 2021). As citocininas são relacionadas com uma maior produção de ramos reprodutivos na soja e, conseqüentemente, com um maior número de vagens (CARLSON et al., 1987). Portanto, a coinoculação com cepas de microrganismos amazônicos poderia ter resultado em mudanças no equilíbrio hormonal da planta, promovendo uma maior produção de vagens em ambos os anos de cultivo.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos em peso da raiz seca; no entanto, este parâmetro é frequentemente reportado como não sendo um bom indicador da capacidade de absorção do sistema radicular (MAHANTA et al., 2014). Em contraste, o volume das raízes aumentou, especialmente quando coinoculadas com o *T. asperellum* na ausência de fertilização fosfatada. Estudos anteriores relataram que o *T. asperellum* pode aumentar o comprimento, a densidade e o número de pontas das raízes, modificando a arquitetura radicular das plantas (MELO JÚNIOR, 2020). De acordo com Pelagio-Flores et al. (2017), a acidificação induzida por *Trichoderma* é um gatilho precoce para mudanças no crescimento das raízes das plantas, já que a inibição do crescimento das raízes primárias é contornada pelo desenvolvimento das raízes secundárias.

Em estudos com plantas de soja, Silva et al. (2020b) obtiveram aumentos de até 25% na biomassa de parte aérea, raízes e trocas gasosas (taxa fotossintética, taxa de transpiração, condutância estomática e temperatura da folha) com a aplicação de microrganismos benéficos (fungos e bactérias) sete dias após a semeadura, incluindo a mesma mistura de estirpes de *T. asperellum* avaliado neste estudo. Os resultados desse estudo corroboram com o experimento de Silva et al. (2020b), confirmando um aumento na produção de soja quando coinoculado com cepas amazônicas de *T. asperellum*.

Algumas propriedades dos microrganismos utilizados nesse estudo foram previamente determinadas. De acordo com Silva et al. (2012), a mistura de *T. asperellum* (Ufra T06, T09, T12 e T52) foi capaz de solubilizar fosfato e sintetizar auxinas. Outros estudos indicaram aumento das raízes do arroz (*Oryza sativa* L.) (FRANÇA et al., 2015; SOUSA et al., 2020), açaí (*Euterpe oleracea* (Mart.) (MELO JÚNIOR, 2020), e soja (SILVA et al., 2020b). Em um ensaio de campo realizado durante duas safras com inoculação de *T. asperellum* em soja, Chagas et al. (2017) obtiveram aumentos no peso da raiz seca, peso da parte aérea seca, número de

nódulos e produtividade (+9%). Os resultados foram atribuídos a uma maior disponibilidade de nutrientes promovida pela síntese hormonal e crescimento radicular. Os resultados desse estudo indicam a importância desta espécie em coinoculação com o *Bradyrhizobium* spp. na soja.

O composto orgânico volátil 6-pentil- $\alpha$ -pirrona (6PP) é caracterizado por atividade do tipo auxina; sendo biossintetizado por *Trichoderma* spp. e, provavelmente, está envolvido na sinalização entre as plantas e os reinos fúngicos (VINALE et al., 2008b; KOTTB et al., 2015; GARNICA-VERGARA et al., 2016). O 6PP produzido por *Trichoderma* spp. promove o crescimento das plantas, tem atividade contra patógenos e regula a arquitetura radicular, inibindo o crescimento primário da raiz e induzindo a formação de raiz lateral (GARNICA-VERGARA et al., 2016; ISMAIEL; ALI, 2017).

A cepa UFRAB01 de *B. amyloliquefaciens* usada nesse estudo foi avaliada em plantas de dendê, com benefícios na produção de ácido-indol-acético (AIA), ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), ácido abscísico (ABA), aumento da altura da planta, área foliar e massa de raízes (LIMA et al., 2020). Além disso, Asari et al. (2017) afirmaram que *B. amyloliquefaciens* promoveu mudanças radiculares em *A. thaliana*, aumentando a produção de citocininas e AIA.

Estudos sobre outras estirpes têm demonstrado a capacidade de *B. amyloliquefaciens* em produção de AIA (IDRIS et al., 2007; SHAO et al., 2015). O AIA secretado por bactérias e fungos rizosféricos age com o fornecimento endógeno nas plantas, promovendo o alongamento primário das raízes e a formação de raízes laterais, mas pode inibir o seu crescimento em altas concentrações (DUCA et al., 2014; TAIZ et al., 2017). Portanto, os microrganismos poderiam contribuir tanto promovendo o crescimento, como degradando o AIA nas plantas, evitando assim níveis prejudiciais ao crescimento.

Com a coinoculação da soja com *B. amyloliquefaciens*, Oliveira et al. (2019) não observaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à inoculação com *B. japonicum*; no entanto, os valores foram superiores aos da coinoculação com outras espécies do gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilis* e *B. licheniformis*). Os autores atribuíram a baixa resposta da coinoculação à fertilidade adequada do solo, um histórico de 13 anos de plantio direto na área, e irrigação suplementar. No presente estudo, o fato de que a estirpe de *B. amyloliquefaciens* foi isolada da região onde os

ensaios foram conduzidos pode ter contribuído para a boa resposta da coinoculação de plantas de soja, mesmo em solo de boa fertilidade.

A rizosfera da soja tem uma comunidade microbiana específica, e uma mudança nessa comunidade pode afetar a simbiose soja-*Bradyrhizobium* (HAN et al., 2020). De acordo com Hasibuan et al. (2021), a coinoculação com outras bactérias nas leguminosas, especialmente a soja, pode inibir a eficiência do rizóbio. Além disso, algumas bactérias do solo exercem um efeito inibitório na nodulação, induzindo a ativação de genes relacionados com a defesa das plantas (HASHAMI et al., 2019). No entanto, existem resultados importantes que demonstram a compatibilidade e os benefícios da coinoculação com outros microrganismos, como é *A. brasilense* em soja (BARBOSA et al., 2021). Da mesma forma, a coinoculação com os microrganismos amazônicos investigados nesse estudo foi compatível com a simbiose, já que variáveis como índice de clorofila, teor de N-foliar, conteúdo de N foliar, número e peso seco de nódulos não foram negativamente afetados.

A coinoculação de plantas de soja tem sido amplamente estudada e adotada pelos produtores brasileiros nos últimos anos, especificamente com *A. brasilense*, mas poucos estudos foram conduzidos com outros microrganismos (HUNGRIA et al., 2013; CERZINI et al., 2016; RONDINA et al., 2020; BARBOSA et al., 2021). A coinoculação de plantas com isolados da Amazônia brasileira proporcionou aumentos de até 15% com o *T. Asperillum* e 13% com *B. amyloliquefaciens* sobre a produção de soja em comparação com a inoculação padrão com *Bradyrhizobium* spp. (Fig. 4h e 5h).

Semelhante ao presente estudo, Buso et al. (2021) avaliaram a coinoculação da soja com vários microrganismos, incluindo espécies de *T. asperillum* e *B. amyloliquefaciens*. Entretanto, esses autores não encontraram aumento na produção de soja em comparação com a inoculação padrão. Possivelmente, o fato de estirpes locais adaptadas terem sido utilizadas no presente estudo pode explicar o melhor desempenho dos microrganismos coinoculados.

O uso de práticas de manejo sustentável, como a combinação de diferentes funcionalidades de microrganismos promissores por meio da coinoculação, pode resultar em altos rendimentos e lucratividade da atividade agrícola (STEINER et al., 2021). Os resultados do presente estudo mostram que, apesar da elevação dos custos de produção, a coinoculação de soja proporcionou aumento ao lucro do produtor de até 15,6% no sistema convencional (2020) e 21,2% em plantio direto (2021). Isso

ocorreu porque o aumento do rendimento de grãos, fornecido pelo uso de coinoculação, foi maior que os custos de investimento para a tecnologia. Galindo et al. (2018) avaliaram a lucratividade econômica da coinoculação de plantas de soja com a bactéria *A. brasilense* e descobriram que, embora houvesse custos operacionais mais altos, a maior produtividade alcançada com a coinoculação permitiu um aumento no lucro do agricultor, de R\$ 615.00 ha<sup>-1</sup>.

No Brasil, a inoculação de plantas de soja com *Bradyrhizobium* spp. revolucionou o agronegócio brasileiro como uma tecnologia que é economicamente viável e também atende à demanda global por sustentabilidade (DÖBEREINER, 1997; HUNGRIA et al., 2006; REIS JUNIOR et al., 2011). Além disso, a coinoculação da soja com *A. brasilense* agora é estabelecida como uma tecnologia que resulta em maiores rendimentos e é amplamente adotada pelos agricultores (SANTOS et al., 2021). A viabilidade de usar outros microrganismos que promovem o crescimento de plantas e suas moléculas na soja também foi destacada por Moretti et al. (2020, 2021). Os resultados desse estudo indicam a possibilidade de expandir a coinoculação da soja com *Bacillus* e *Trichoderma*.

A visão desse estudo é para o uso de microrganismos destinados à regionalização, buscando cepas adaptadas a cada agroecossistema, como com microrganismos selecionados para a região da Amazônia. Particularmente interessante neste caso é que os microrganismos amazônicos trouxeram benefícios a uma cultura exótica, a soja, e potencializaram a ação do *Bradyrhizobium* spp., que também são exóticos, expandindo a visão da prospecção da biodiversidade. No entanto, o gerenciamento com microrganismos deve ser combinado com outras tecnologias, como foi o caso da fertilização fosfatada, essencial para obter altos rendimentos e retornos econômicos.

### **3.5 Conclusões**

A coinoculação de plantas de soja com *Bradyrhizobium* spp. e cepas regionalizadas de microrganismos benéficos promoveu maior rendimento de grãos e lucratividade da atividade agrícola. No entanto, a prática não possibilitou a substituição por fertilizantes minerais fosfatados.

## Referências Bibliográficas

AFZAL, A.; BANO, A.; FATIMA, M. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. **Agronomy for Sustainability Development**. v. 30, p. 487–495, 2010. <https://doi.org/10.1051/agro/2009041>

ALVARES, C.A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorology Zeitschrift**. v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

ASARI, S. et al. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. **Planta**. v. 245, p. 15–30, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>

ATIENO, M. et al. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 2541–2550, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1062-x>

BARBOSA, J.Z. et al. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**. v. 163, e103913, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>

BASAK, B.B. et al. Potassium supply in agriculture through biological potassium fertilizer: A promising and sustainable option for developing countries. **Archives of Agronomy and Soil Science**. v. 67, 2020.

<https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1821191>

BEAN, K.M. et al. *Trichoderma* synthesizes cytokinins and alters cytokinin dynamics of inoculated *Arabidopsis* seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10466-4>

BONONI, L. et al. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**. v. 10, e2858, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8>

BUSO, P.H.M. et al. Plant growth analysis describing the soybean plants response on dryland field to seed co-inoculation. **Ciência Rural**. v. 51, n.9, e20190642, 2021. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190642>

CARLSON, D.R. et al. The physiological basis for cytokinin induced increases in pod set in IX93-100 soybeans. **Plant Physiology**. v. 84, p. 233-239, 1987. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.84.2.233>

CASTRO, G.L.S. et al. Açai palm seedling growth promotion by rhizobacteria inoculation. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 51, p. 205–216, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00159-2>

CEPEA. Advanced Study Center in Applied Economics. **Soybean indicator**. (In portuguese). 2020. Available in: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/soja.aspx> Access in November 2020.

CEPEA. Advanced Study Center in Applied Economics. **Soybean indicator**. (In portuguese). 2021. Available in: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/soja.aspx> Access in July 2021.

CEREZINI, P. et al. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**. v. 196, p. 160-167, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2016.06.017>

CHAGAS, L.F.B. et al. *Trichoderma asperellum* efficiency in soybean yield components. **Comunicata Scientiae**. v. 8, p. 1, p. 165-169, 2017. <http://dx.doi.org/10.14295/CS.v8i1.1754>

CONAB. National Supply Company. **Monitoring of the Brazilian grain crop**. Brasília: Conab, v. 1: 1, 2021. (In portuguese). Available in: <http://www.conab.gov.br> Access in October 2021.

CONAB. National Supply Company. **Costs of agricultural production: The methodology of Conab**, Brasília, DF. 2010. 60p. (In portuguese) Available in: <http://www.conab.gov.br> Access in November 2020.

COFRÉ, N. et al. Soybean growth and foliar phosphorus concentration mediated by arbuscular mycorrhizal fungi from soils under different no-till cropping systems. **Rhizosphere**. v. 16, e100254, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100254>

CUI-JUAN, W. et al. Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YTB1407 elicits resistance against two fungal pathogens in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Journal of Plant Physiology**. v. 253, e153260, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153260>

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00226-X)

DONAGEMMA, G.K. et al. **Granulometric analysis**. In: TEIXEIRA, P.C. et al. (Eds.). Soil Analysis Methods Manual. Embrapa Solos, Brasília, DF, p. 95-116, 2017.

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Leeuwenhoek**. v. 106, p. 85-125, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>

EMBRAPA. **Soybean production technologies, production systems**. 17. Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil. 2020.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. Stages of soybean development. Iowa State University. Agricultural and Home Economics Experiment Station. **Special Reports**. v. 80, 1977. <https://lib.dr.iastate.edu/specialreports/87>

FERRAREZI, J.A. et al. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria from the Brazilian Amazon on the bacterial community associated with maize in field. **Applied Soil Ecology**. v. 170, e104297, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104297>

FILIPINI, L.D. et al. Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of**



**Microbiology**. v. 203, p. 1033–1038, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>

FRANÇA, S.K.S. et al. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. **Agronomy for Sustainability Development**. v. 35, p. 317–324, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0244-3>

FUKAMI, J.; CERZIN, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**. v. 8, e73, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

GALINDO, F.S. et al. Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 22, n. 1, p. 51-56, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p51-56>

GARCÍA-LÓPEZ, A.M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Plant uptake of phosphorus from sparingly available P-sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. **Agriculture and Food Science**. v. 24, p. 3, p. 249-260, 2015. <https://doi.org/10.23986/afsci.49532>

GARNICA-VERGARA, A. et al. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. **New Phytologist**. v. 209, p. 1496–1512, 2016. <https://doi.org/10.1111/nph.13725>

GEZAF, S.A.; MAHAS, H.H.A.; ABDEL-AZEEM, A.M. Rhizosphere microbiomes and their potential role in increasing soil fertility and crop productivity. In: YADAV, A.N. et al. (Ed.). **Current trends in microbial biotechnology for sustainable agriculture**. Environmental and microbial biotechnology. Springer Nature. Singapore. 2021. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6949-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6949-4_8)

GUZMÁN-GUZMÁN, P. et al. *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. **Phytopathology**. v 109, n. 1, p. 6-16, 2018. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>

HAN, Q. et al. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. **ISME Journal**. v. 14, p. 1915–1928, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0648-9>

HASHAMI, S.Z. et al. Evaluation of immune responses induced by simultaneous inoculations of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) with soil bacteria and rhizobia. **Microbes Environment**. v. 34, n. 1, p. 64-75, 2019. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18110>

HASIBUAN, R.F.M. et al. Application of biofertilizer containing *Bacillus pumillus* TUAT1 on soybean without inhibiting infection by *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110. **Soil Science and Plant Nutrition**. v. 67, n. 5, 2021. <https://doi.org/10.1080/00380768.2021.1959837>

HUNGRIA, M. et al. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**. v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006. <https://doi.org/10.4141/P05-098>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**. v. 49, p. 791–801, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F.J (Ed). **Biological nitrogen fixation**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., pp 1009–1024. 2015. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>

IDRIS, E.E. et al. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 20, n. 6, p. 619-626, 2007. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0619>

IGIEHON, N.O.; BABALOLA, O.O. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 101, p. 4871–4881, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8344-z>

ISMAIEL, A.A.; ALI, D.M.I. 2017. Antimicrobial properties of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone produced by endophytic strains of *Trichoderma koningii* and its effect on aflatoxin B1 production. **Biologia**. v. 72, n. 12, p. 1403-1415, 2017. <https://doi.org/10.1515/biolog-2017-0173>

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v. 60, e969, 1970. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-60-969>

KOTTB, M. et al. *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, e995, 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00995>

KUCEY, R.M.N. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**. v. 63, p. 671-678, 1983. <http://dx.doi.org/10.4141/cjss83-068>

LEITE, R.C. et al. Adubação fosfatada na soja durante três safras consecutivas na nova fronteira agrícola brasileira. **Scientia Agraria**. v. 18, n. 4, p. 28-35, 2017. <http://dx.doi.org/10.5380/ras.v18i4.50310>

LEITE, R.C. et al. Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. **Crop and Pasture Science**. v. 70, n. 1, p. 61-67, 2019. <https://doi.org/10.1071/CP18105>

LEVENE, H. **Robust tests for equality of variances**. In: OLKIN, I. et al. (Eds.). Contributions to probability and statistics: Essays in Stanford University Press, pp. 278–292. 1960.

LIMA, J.V. et al. Hormonal imbalance triggered by rhizobacteria enhance nutrient use efficiency and biomass in oil palm. **Scientia Horticulturae**. v. 264, e109161, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109161>

MAHANTA, D. et al. Influence of phosphorus and biofertilizers on soybean and wheat root growth and properties. **Field Crops Research**. v. 166, p. 1-9, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2014.06.016>

MARTIN, N.B. et al. Integrated system of agricultural costs - "CUSTAGRI". **Informações Econômicas**. v. 28, n.1, p. 7-28, 1997.

MELO JÚNIOR, A.G. **A inoculação com microrganismos afeta positivamente arquitetura do sistema radicular e o acúmulo de nutrientes em mudas de *Euterpe oleracea* (Mart.)**. Universidade Federal Rural da Amazônia (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Agronomia. 2020. 55f.

MORETTI, L.V. et al. Beneficial microbial species and metabolites alleviate soybean oxidative damage and increase grain yield during short dry spells. **European Journal of Agronomy**. v. 127, e126293, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2021.126293>

MORETTI, L.V. et al. Bacterial consortium and microbial metabolites increase grain quality and soybean yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v. 20, p. 1923-1934, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00263-5>

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with Actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**. v. 37, p. 432-446, 2014. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.864308>

OLIVEIRA, C.M. et al. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean. **Biological Control**. v. 152, e104425, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104425>

OLIVEIRA, C.M. et al. Anatomical changes induced by isolates of *Trichoderma* spp. in soybean plants. **PLoS ONE**. v. 15, n. 11, e0242480, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242480>

OLIVEIRA, L.B.G. et al. Formas e tipos de coinoculação na cultura da soja no Cerrado. **Revista de Ciência Agrárias**. v. 42, n. 4, p. 924-932, 2019. <https://doi.org/10.19084/rca.15828>

PELAGIO-FLORES, R. et al. *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in arabidopsis root growth and determines fungal phytostimulation. **Frontiers in Plant Science**. v. 8, e822, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00822>

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2019. URL <https://www.R-project.org/>

REIS JUNIOR, F.B. et al. Biological nitrogen fixation: a revolution in agriculture. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JUNIOR, F.B. (ed.). **Biotechnology: state of the art and applications in agriculture**. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF. p. 247-

281, 2011. Available in: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/75345/1/LivroFaleiro01.pdf>  
 Accessed: November 2020.

RONDINA, A.B.L. et al. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**. v. 56, p. 537-549, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

ROSA, L.H. **Neotropical endophytic fungi**. diversity, ecology, and biotechnological Applications. Springer, Cham. 2021. 395p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-53506-3>

ROY, E.D. et al. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. **Nature Plants**. v. 2, e16043, 2016. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.43>

RUBIN, R.L.; VAN GROENIGEN, K.J.; HUNGATE, B.A. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis. **Plant Soil**. v. 416, p. 309–323, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3199-8>

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**. v. 9, e205, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-B6 on the Brazilian agriculture: lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v 45, e0200128, 2021. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcS20200128>

SCHMUTZ, J. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**. v. 463, n. 14, p. 178-183, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature08670>

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio a colheita**. Editora Viçosa. Viçosa-MG. 2015. 333p.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; REIS, M.S. Melhoramento da soja. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora. UFV: 2005. pp.553-603.

SHAO, J. et al. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Microbial Cell Factories**. v. 14, e130, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0323-4>

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (Complete Samples). **Biometrika**. v. 52, e591, 1965. <https://doi.org/10.2307/2333709>

SHARMA, S.K.; RAMESH, A.; JOHRI, B.N. Isolation and characterization of plant growth- promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks\_bnj\_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Journal Virology and Microbiology**. v. 2013, ID446006, 2013. <https://doi.org/10.5171/2013.446006>

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

SiBCS. **Sistema brasileiro de classificação do solo**. 5ª ed. Embrapa, Brasília, DF. 2018.

SILVA, E.R. et al. Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill.)? **Archives of Microbiology**. v. 201, p. 325-335, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-01617-5>

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2ª ed. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2009. 627p.

SILVA, J.C. Rice sheath blight biocontrol and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 55, n. 4, p. 243-250, 2012. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2012.078>

SILVA, M.A. et al. Screening of beneficial microorganisms to improve soybean growth and yield. Braz. **Archives of Biology and Technology**. v. 63, e20190463, 2020a. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190463>

SILVA, M.A., et al. Individual and combined growth-promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. **Caatinga**. v. 33, n. 3, p. 619-632, 2020b. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252020v33n305rc>

SOUSA, T.P. et al. *Trichoderma asperellum* modulates defense genes and potentiates gas exchanges in upland rice plants. **Physiology and Molecular Plant Pathology**. v. 112, e101561, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101561>

SUBRAMANIAN, P. et al. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Plant Growth Regulation**. v. 76, p. 327–332, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9993-x>

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy**. Washington, DC: US Gov. Print. Office. 2014.

STEINER, F. et al. Peanut response to co-inoculation of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* and molybdenum application in sandy soil of the Brazilian Cerrado. **Agronomy Journal**, v. 113, n. 1, p. 623-632, 2021. <https://doi.org/10.1002/agj2.20519>

STEWART, A.; HILL, R. **Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion**. In: GUPTA, V.K. et al. (Ed.) *Biotechnology and biology of *Trichoderma**. Boston, Elsevier USA, 2014. pp. 415-428. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-00434-6>

TAIZ, L. et al. **Plant physiology and development**. 6ª ed. Oxford University Press. 2017.

USDA (United States Department of Agriculture). **Oilseeds: world markets and trade**. Foreign Agricultural Service. 2021. Available in: [www.usda.com](http://www.usda.com) Accessed: Nov, 2020.

VAN RAIJ, B. et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos Tropicais**. Instituto Agronômico, Campinas, Brazil. 2001.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiology Molecular Plant Pathology**. v. 72, p. 80–86, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>

YADAV, R. et al. Bacteria from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi augment wheat yield and biofortification. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 150, p. 222–233, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.039>

YANG, Y. et al. Physical mapping and candidate gene prediction of branch number on the main stem in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 68, p. 2907–2921, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01163-y>

YAO, H. et al. Study on soybean potential productivity and food security in China under the influence of COVID-19 outbreak. **Geography, Environment, Sustainability**. v. 1, p. 163–171, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.geosus.2020.06.002>

ZOU, J. et al. Physiological and UPLC-MS/MS widely targeted metabolites mechanisms of alleviation of drought stress-induced soybean growth inhibition by melatonin. **Industrial Crops Production**. v. 163, e113323, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113323>

## Photosynthetic performance and root architecture of soybean co-inoculated with Amazonian strains of microorganisms associated with the application of red mud

Rubson da Costa Leite<sup>1</sup>; Fabio Murilo DaMatta<sup>2</sup>; Jefferson Santana da Silva Carneiro<sup>3</sup>; Gledson Luiz Salgado de Castro<sup>1</sup>; Rafael Rodrigo da Silva Costa<sup>1</sup>; Ênio Tarso de Souza Costa<sup>4</sup>; Gisele Barata da Silva<sup>1</sup>

1 Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA, Brasil.

2 Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

3 Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.

4 Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil.

How to cite: Leite RC, LRG Guilherme, Damatta FM, Carneiro JSS, Castro GLS, Costa RR, Costa ETS, Silva GB. Photosynthetic performance and root architecture of soybean co-inoculated with Amazonian microorganism strains associated with bauxite residue application. 2022.



### Highlights

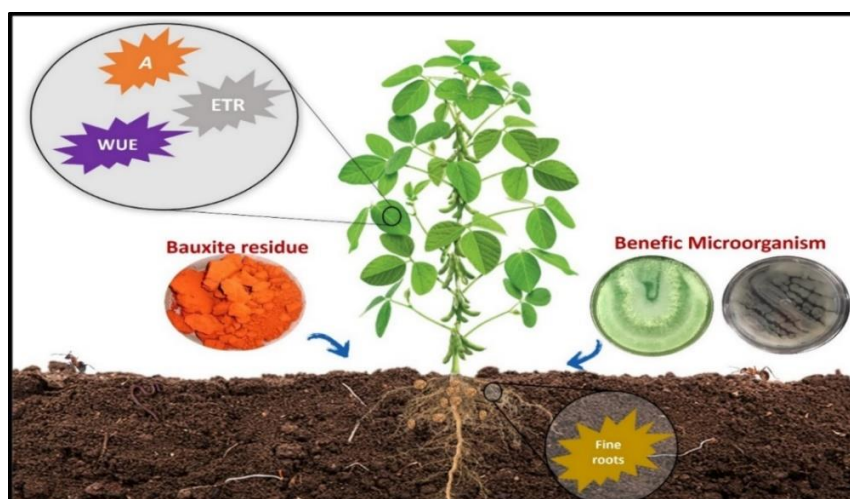
The association of red mud with beneficial microorganisms was studied.

1% red mud applied to the soil increases plant gas exchange.

*Bacillus amyloliquefaciens* increases the percentage of fine roots of soybean.

Red mud can be applied in low doses for revegetation of mined areas.

### Graphical abstract



#### 4 DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO E ARQUITETURA RADICULAR DA SOJA COINOCULADA COM CEPAS AMAZÔNICAS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À APLICAÇÃO DE LAMA VERMELHA

##### Resumo

A aplicação da lama vermelha (LV) e uso de microrganismos benéficos representa uma alternativa promissora para reutilização desse subproduto em solos utilizados para revegetar áreas contaminadas. Não há, porém, estudos sobre a associação simultânea dessas duas práticas, tampouco cepas regionalizadas de microrganismos. Objetivou-se avaliar o uso da LV em solo utilizado para revegetação de áreas contaminadas associado à coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* spp. e cepas de microrganismos benéficos isolados da Amazônia. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2, com 4 repetições. O primeiro fator foi composto pela coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* spp. e *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, e o tratamento inoculado exclusivamente com *Bradyrhizobium* spp.; o segundo fator foi composto pela aplicação ou não de LV no solo (1%). Trinta dias após a semeadura, as plantas foram avaliadas quanto ao crescimento/biometria, trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, nodulação e arquitetura radicular. A interação de LV com *B. amyloliquefaciens* promoveu mudanças na arquitetura radicular, elevando o percentual de raízes finas (<1 mm) em comprimento e volume. Os isolados aplicados não influenciaram as trocas gasosas. A aplicação de LV aumentou em 8,8% a taxa fotossintética líquida, 6,9% a eficiência de uso da água, 5,8% a taxa de transporte de elétrons e 23,0% o volume radicular em relação ao solo sem LV. Os resultados indicam a viabilidade de incorporação de 1% de LV em solos utilizados para revegetação de áreas contaminadas. A interação entre coinoculação com *B. amyloliquefaciens* e incorporação de LV promoveu alterações na arquitetura radicular de plantas de soja.

**Keywords:** *Bacillus*, bauxite residue, bioremediation, *Trichoderma*.



## PHOTOSYNTHETIC PERFORMANCE AND ROOT ARCHITECTURE OF SOYBEAN COINOCULATED WITH AMAZONIAN STRAINS OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH THE APPLICATION OF RED MUD

### Abstract

The application of red mud (RM) and the use of beneficial microorganisms is a promising alternative for reuse of this by-product in soils used for revegetation of contaminated areas. However, there are no studies on the association of these two practices simultaneously, nor with the use of regionalized strains of microorganisms. The objective of this study was to evaluate the use of RM in soil used for revegetation of contaminated areas associated with the co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. and strains of beneficial microorganisms isolated from the Amazon. The experiment was conducted in the greenhouse with completely randomized design in a 3x2 factorial scheme, with four repetitions. The first factor was composed by the co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. and *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens*, and the treatment inoculated only with *Bradyrhizobium* spp.; the second factor was composed of the application or not of RM in the soil (1%). Thirty days after sowing, the plants were evaluated for growth/biometry, gas exchange, chlorophyll a, nodulation, and root architecture. The interaction of RM with *B. amyloliquefaciens* promoted changes in root architecture, increasing the percentage of fine roots (<1 mm) in length and volume. The isolates applied did not influence the gas exchange. RM application increased net photosynthetic rate by 8.8%, water use efficiency by 6.9%, electron transport rate by 5.8% and root volume by 23.0% compared to soil without RM. The results indicate the feasibility of incorporating 1% VL into soils used for revegetation of contaminated areas. The interaction between co-inoculation with *B. amyloliquefaciens* and incorporation of LV promoted changes in root architecture of soybean plants.

**Keywords:** *Bacillus*, bauxite residue, bioremediation, *Trichoderma*.

#### 4.1 Introdução

O alumínio é amplamente utilizado na vida cotidiana e na produção industrial, por propriedades como leveza, maleabilidade, condutividade elétrica e térmica, resistência à corrosão e por possibilitar sua reciclagem (NATURE, 2018; SERVICE, 2020; LYU et al., 2021). Na maior parte do mundo, é extraído do minério de bauxita, por meio da reação de uma solução de hidróxido de sódio e cálcio sob alta pressão e temperatura (processo Bayer), formando a alumina e lama vermelha (também denominada de resíduo de bauxita) (XUE et al., 2016; RENFORTH, 2019).

A produção mundial de alumina foi de 133.078 megatoneladas em 2020 (INTERNATIONAL ALUMINIUM, 2021). Entretanto, para cada tonelada de alumina produzida, são geradas entre 0,5 e 2,0 toneladas de lama vermelha (LV) (XUE et al., 2016). Esse material produzido é um concentrado de óxidos de ferro alcalino (pH 10-13), salino-sódico, pobre em nutrientes e contém vários metais pesados e elementos de terras raras (XUE et al., 2016; DI CARLO; BOULLEMANT; COURTNEY, 2020; PHILLIPS; COURTNEY, 2022). Como qualquer subproduto, o uso inadequado da LV pode gerar riscos potenciais para o meio ambiente (DI CARLO; BOULLEMANT; COURTNEY, 2020). Por isso, pesquisas têm sido realizadas para propor a melhor forma de devolver esse material ao ambiente, potencializando seus benefícios e minimizando os riscos decorrentes de alguns de seus atributos indesejáveis (LYU et al., 2021).

Entre os métodos mais difundidos para a recuperação de barragens e uso de LV, tem sido proposta a adição de gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e de fontes de matéria orgânica (DI CARLO; BOULLEMANT; COURTNEY, 2020; MENZIES; KOPITTKER, 2021; XUE et al., 2022). Outra possibilidade é a aplicação de LV no solo (SUMMERS; BOLLAND; CLARKE, 2001; SNARS; GILKES; WONG, 2004; UJACZKI et al., 2016a, b; FEIGL et al., 2017). A adição de até 20% de LV incorporada ao solo promoveu aumento na capacidade de retenção de água do solo em condições de campo, sem constatar efeito tóxico (UJACZKI et al., 2016a). Summers, Guise e Smirk (1993) também verificaram que o LV pode promover a redução da lixiviação de fósforo em solos arenosos. Além disso, existe a possibilidade de aplicar LV como remediador de solo em áreas contaminadas com metais pesados devido a sua elevada capacidade de retenção decorrente da presença de óxidos de Fe e Al capazes de complexar esses metais (LOPES et al., 2013; TANEZ; HUREL, 2019; COSTA et al., 2021; FERREIRA et al., 2022).

Considerando os benefícios da disposição de LV incorporado ao solo para fins de uso na revegetação de áreas, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com microrganismos benéficos visando melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas (BABU; REDDY, 2011; SANTINI; KERR; WARREN, 2015; WANG, WANG; MA, 2022). Liao et al. (2018), avaliando a capacidade de uso de microrganismos para redução da alcalinidade de LV, identificaram um fungo (*Penicillium oxalicum*) produtor de ácidos orgânicos com potencial de reduzir o pH do material de 10,2 para 6,4. Já Anam, Reddy e Ahn (2019), em estudos com *Trichoderma asperellum* (cepa RM-28), observaram que a aplicação do fungo reduziu o pH (11,8 para 8,2) e a condutividade eletrolítica (2,2 para 1,4 dS m<sup>-1</sup>) do LV, favorecendo o estabelecimento de vegetação em solos que receberam aplicação de LV. Outros estudos identificaram a capacidade de bactérias isoladas de LV para promoção de crescimento em plantas sob áreas de deposição desse material (LIU et al., 2021; CHEN et al., 2022).

Pesquisas visando encontrar formas sustentáveis de reutilização de LV em diversos países são muito importantes, sobretudo no Brasil, um dos maiores produtores de bauxita, com cerca de 90% da extração vindo da região Amazônica, reconhecida por possuir a maior floresta tropical do mundo, e uma grande fonte de prospecção de microrganismos benéficos às plantas (SONTER et al., 2017; MARTINS et al., 2021; ROSA, 2021). Ademais, Santini et al. (2015) recomendam o uso de microrganismos nativos para maior sucesso do processo de biorremediação dos solos afetados pela mineração. Portanto, estudos com microrganismos oriundos da região amazônica permitem selecionar cepas com maior potencial de biorremediação dos solos dessa região, uma vez que possuem adaptação as condições edafoclimáticas locais.

Nesse contexto, a soja destaca-se no cenário agrícola com relação a eficiência na associação simbiótica com o rizóbio para fixação de nitrogênio (DÖBEREINER, 1997; HUNGRIA; MENDES, 2015). Por esse motivo, constitui uma planta com potencial para ser avaliada como pioneira para revegetação de áreas, pensando no aporte inicial de nitrogênio e de matéria orgânica, além da possibilidade de uso dos grãos para produção de biocombustíveis (COSTA; OLIVEIRA, 2022). Essas características podem se tornar ainda mais interessantes, mediante a associação de cepas regionalizadas de microrganismos benéficos às plantas que possuam capacidade de se desenvolver em solos contendo LV. Comprovada essa interação, a incorporação de LV aos solos utilizados para o recobrimento de uma área que

necessita ser revegetada e o plantio de soja associado a microrganismos benéficos já adaptados às condições locais poderá impulsionar a própria capacidade do ambiente de se regenerar por meio do desenvolvimento de outras plantas e de outras comunidades de microrganismos.

Dentro dessa proposta, foi estabelecida hipótese de que a aplicação de baixas quantidades de RB associada com cepas regionalizadas de microrganismos benéficos às plantas poderia favorecer áreas de revegetação. Para isso, foram utilizadas duas cepas amazônicas de microrganismos (*Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*) para coinoculação da soja cultivada em solo com 1% de LV incorporado.

#### **4.2 Material e Métodos**

Foi realizado um experimento em casa de vegetação na Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil (1°27'12.8"S 48°26'33.5"W). Plantas de soja [(*Glycine max* L. Merrill), cultivar M8644IPRO] foram cultivadas em vasos (6 dm<sup>3</sup>) preenchidos com solo argiloso (682 g kg<sup>-1</sup> de argila), classificado como Latossolo Vermelho (SiBCS) [Oxisol, segundo o Soil Survey Staff (2014)]. O solo foi coletado na camada de 0-20 cm de mata nativa em Paragominas-PA, Brasil (3°22'37.0"S 47°25'31.1"W). Após a coleta o solo foi destorroado, passado em peneira de 2 mm, seco a sombra e uma amostra retirada para caracterização.

#### ***Desenho experimental***

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2, com 4 repetições. Foram semeadas cultivares de soja. As plantas de todos os tratamentos foram inoculadas com estirpes de rizóbios [cepas SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*) e SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*)] com concentração de 5x10<sup>9</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. O primeiro fator foi composto pela coinoculação com microrganismos isolados da Amazônia brasileira (*Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*), em adição ao tratamento controle (padrão) inoculado exclusivamente com *Bradyrhizobium* spp. A inoculação somente com rizóbios (padrão) foi considerado como tratamento controle na soja, uma vez que a prática é adotada anualmente por produtores brasileiros. O segundo fator composto pela aplicação ou não de 1% de resíduo de bauxita no solo [equivalente a uma aplicação

de 20 t ha<sup>-1</sup> em campo, considerando a camada de maior desenvolvimento radicular da cultura (0-20 cm) e a densidade do solo (1,0 g cm<sup>-3</sup>).

### **Preparo e inoculação dos microrganismos**

As cepas dos microrganismos isolados da Amazônia brasileira (Mix de *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*) se encontram armazenados no Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém.

Os quatro isolados de *T. asperellum* utilizados no estudo, seguidos pelos seus respectivos códigos depositados no GenBank-NCBI (Ufra.T06 - MK086063, Ufra. T09 - MK086064, Ufra. T12 - MK086065, e Ufra. T52 - MK086066), foram isolados de solos rizosféricos de florestas nativas na Amazônia brasileira (SILVA et al., 2012). A bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* estirpe UFRAB01, código depositado no GenBank-NCBI (MK967809), foi isolada de solo rizosférico de plantas comerciais de palma de óleo cultivadas na Amazônia brasileira (LIMA et al. 2020).

Os fungos componentes do mix (cepas T06, T09, T12 e T52) de *T. asperellum* foram cultivados em placas de Petri separadas contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar) por cinco dias, ~25 °C, sob luminosidade contínua. De cada um dos quatro isolados de *T. asperellum*, com uso de água destilada e esterilizada, preparou-se uma suspensão única, com posterior armazenamento a 5 °C até o momento da inoculação. A concentração fúngica foi determinada por contagem de esporos em câmara de Neubauer e ajustada para 10<sup>9</sup> esporos ml<sup>-1</sup>. A bactéria *B. amyloliquefaciens* foi cultivada em meio sólido 523 (KADO; HESKETT, 1970) durante 48 h, a 28 °C. A suspensão bacteriana foi preparada com água destilada e esterilizada, e a concentração foi ajustada em espectrofotômetro (comprimento de luz de 540 nm) para 0,5 = 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, com posterior armazenamento a 5 °C até o momento da inoculação.

Os microrganismos avaliados foram testados quanto à capacidade em solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético (IAA) e produção de sideróforos (Tabela 1). Além disso, foi avaliada a capacidade dos isolados em crescerem em meio de cultivo incorporado com 1% de LV (Fig. 1).

Tabela 1. Análise bioquímica de síntese de AIA, solubilização de fosfato e produção de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens*.

Isolado	Identificação molecular	AIA	Sideróforos	P-solubilização
<sup>1</sup> UFRAT06	<i>T. asperellum</i>	-	-	+
<sup>1</sup> UFRAT09	<i>T. asperellum</i>	-	-	+
<sup>1</sup> UFRAT12	<i>T. asperellum</i>	+	-	+
<sup>1</sup> UFRAT52	<i>T. asperellum</i>	+	-	+
<sup>2</sup> UFRAB01	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	+	+

<sup>1</sup> Silva et al., 2012; <sup>2</sup> Lima et al., 2020.; + = produção do composto; - = composto não produzido.

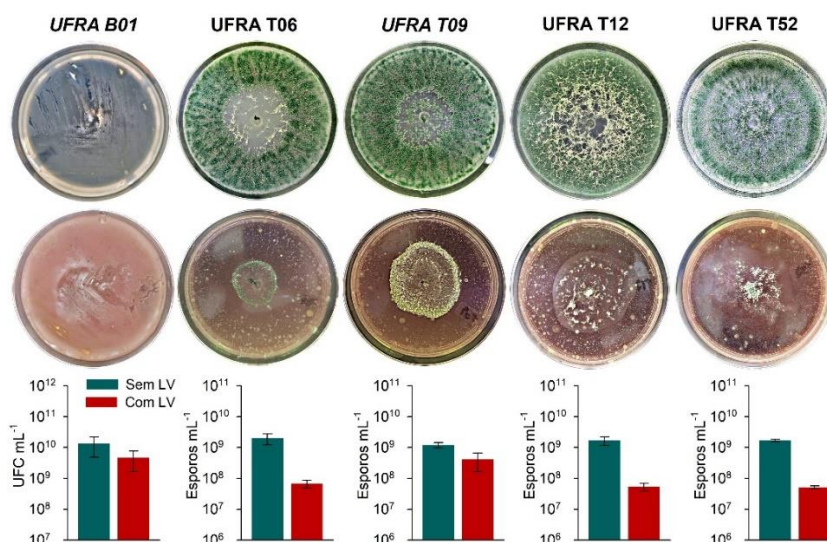


Figura 1. Cultivo de microrganismos isolados da Amazônia em meio de cultura sem incorporação de LV (linha superior) e com 1% de LV incorporada (linha inferior). Os valores dos gráficos representam médias de três repetições e as barras acima das colunas são referentes ao erro padrão.

### Caracterização do solo e resíduo de bauxita

O solo utilizado nos vasos foi coletado de floresta nativa em uma região reconhecida como província mineral de bauxita (Paragominas-PA: 3°22'S; 47°25'W). A LV utilizada é proveniente do processamento de minério de bauxita, que após coletada, foi seca, macerada e peneirada em peneira de 80 mesh. Valores da análise química e textural do solo (sem e com LV) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atributos químicos e físicos do solo e solo com 1% de lama vermelha.

Atributo	Valor	Atributo	Valor
Solo			
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,30	Alumínio trocável (cmol <sub>c</sub> /kg)	0,00
Matéria Orgânica (dag/kg)	3,60	Acidez potencial (H+Al) (cmol <sub>c</sub> /kg)	2,90
Fósforo (mg/kg)	18,00	Soma de bases (cmol <sub>c</sub> /kg)	6,60
Potássio (mg/kg)	154,00	Capacidade de troca de cátions (cmol <sub>c</sub> /kg)	9,50
Sódio (cmol <sub>c</sub> /kg)	0,17	Saturação por bases (V%)	69,40
Cálcio (cmol <sub>c</sub> /kg)	4,60	Areia (%)	14,90

Magnésio (cmol <sub>e</sub> /kg)	1,50	Silte (%)	23,30
Enxofre (mg/kg)	34,00	Argila (%)	61,80
Boro (mg/kg)	0,56	Arsênio (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,01
Cobre (mg/kg)	0,50	Cádmio (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,01
Ferro (mg/kg)	46,00	Cromo (mg kg <sup>-1</sup> )	37,95
Manganês (mg/kg)	9,60	Mercúrio (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,01
Zinco (mg/kg)	3,00	Chumbo (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,01

Solo com 1% de lama vermelha

pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,50	Alumínio trocável (cmol <sub>e</sub> /kg)	0,00
Matéria Orgânica (dag/kg)	3,60	Acidez potencial (H+Al) (cmol <sub>e</sub> /kg)	1,90
Fósforo (mg/kg)	24,00	Soma de bases (cmol <sub>e</sub> /kg)	7,90
Potássio (mg/kg)	0,84	Capacidade de troca de cátions (cmol <sub>e</sub> /kg)	10,80
Sódio (cmol <sub>e</sub> /kg)	1,14	Saturação por bases (V%)	73,10
Cálcio (cmol <sub>e</sub> /kg)	5,10	Areia (%)	16,20
Magnésio (cmol <sub>e</sub> /kg)	1,50	Silte (%)	29,00
Enxofre (mg/kg)	37,00	Argila (%)	54,80
Boro (mg/kg)	0,43	Arsênio (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,01
Cobre (mg/kg)	0,50	Cádmio (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,01
Ferro (mg/kg)	40,00	Cromo (mg kg <sup>-1</sup> )	54,81
Manganês (mg/kg)	14,00	Mercúrio (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,01
Zinco (mg/kg)	3,80	Chumbo (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,01

Solo: K, Cu, Fe, Mn e Zn: extração com Mehlich-1; P-disponível em resina; Ca, Mg e Al trocáveis: extração com KCl; H + Al: extração com acetato de cálcio; S: extrator de Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,01M; B: extrator BaCl<sub>2</sub> 0,125% água quente.; Arsênio, Cádmio, Cromo e Mercúrio: Método EPA 3051.; <0.01: abaixo do limite de quantificação para metais.

Quanto à mineralogia, o LV da região brasileira é composto pelos minerais hematita, goethita aluminosa, anatásio, sodalita, muscovita, gibbsita, maghemita, quartzo e outros (COSTA et al., 2009; LEITE et al., 2022). Além disso, segundo o Instituto Internacional de Alumínio (WORLD ALUMINIUM, 2015), o LV é composto principalmente de óxidos de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 20-45%), óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>=4-20%), óxido de silício (SiO<sub>2</sub> = 5-30%) e alumina não dissolvida (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 10-22%).

### **Implantação e condução do experimento**

A semeadura da soja (*Glycine max* L. Merrill), cultivar M8644IPRO, ocorreu no dia 08 de setembro de 2021 com densidade de três sementes por vaso, com posterior desbaste para uma planta por vaso. Anteriormente à semeadura, foi realizada uma adubação de acordo com análise de solo e exigências da cultura (Câmara, 2015): nitrogenada de 0,06 g vaso<sup>-1</sup> de N (sulfato de amônio), fosfatada de 0,36 g vaso<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (superfosfato simples), potássica com 0,18 g vaso<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (cloreto de potássio) e fonte de micronutrientes (molibdênio - 0,1%; boro - 1,8%; cobre - 0,8%; manganês - 2%; zinco - 7%) na dose de 0,24 g vaso<sup>-1</sup>. Durante o período experimental, o solo foi irrigado diariamente para manutenção em 50% da capacidade de campo. A avaliação das plantas ocorreu 30 dias após a semeadura (DAS), durante o estágio fenológico

V5 (FEHR; CAVINESS, 1977) sendo avaliadas variáveis relacionadas a biometria, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, nodulação e arquitetura radicular.

#### *Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a*

Avaliações das trocas gasosas foram realizadas na terceira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta, durante o estágio fenológico V5 (FEHR; CAVINESS, 1977) usando um sistema portátil de fluxo aberto de trocas gasosas (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE), entre 09:30 e 10:30 horas de um dia ensolarado. As condições na câmara eram fonte de luz constante de 1000  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PAR), concentração externa de  $\text{CO}_2$  de 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  e a quantidade de luz azul foi ajustada para 10% PAR para otimizar a abertura estomática. Durante as avaliações, as condições ambientais foram: temperatura do ar de  $34 \pm 0,7$  °C, umidade relativa do ar de  $72 \pm 0,6\%$ , radiação incidente de  $600 \pm 100$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e déficit de pressão de vapor do ar de  $2,6 \pm 0,1$  kPa. Foram avaliados a Taxa fotossintética líquida (*A*), taxa de transpiração (*E*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  (*C<sub>i</sub>*) e eficiência instantânea de uso da água ( $WUE = A/E$ ).

A fluorescência da clorofila *a* foi determinada simultaneamente com as trocas gasosas, utilizando uma câmara de fluorescência (IG6400-40; LI-COR Inc.) acoplada ao analisador portátil de trocas gasosas. As mesmas folhas avaliadas nas trocas gasosas foram adaptadas no escuro durante 30 minutos, o tecido foliar foi exposto a um feixe de medição modulado fraco ( $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 Hz) para determinar a fluorescência inicial (*F<sub>0</sub>*) quando todos os centros de reação PS II estavam “abertos”. Em seguida, um pulso de luz branca saturante de  $2.400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (10 Hz) foi aplicado por 0,8 s para garantir a emissão máxima de fluorescência (*F<sub>m</sub>*) quando todos os centros de reação PSII estivessem “fechados”. Em folhas adaptadas à luz, o rendimento de fluorescência em estado estacionário (*F<sub>s</sub>*) foi determinado por meio de luz actínica contínua ( $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 480 s.

Em seguida, um pulso de luz branca saturante ( $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foi aplicado para obter a fluorescência máxima adaptada à luz (*F<sub>m</sub>'*). A fluorescência inicial adaptada à luz (*F<sub>0</sub>'*) foi estimada de acordo com Oxborough e Baker (1997). A partir destas variáveis, foi calculada a atividade potencial do PSII (*F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>*), a eficiência fotoquímica máxima do PSII  $\{F_v/F_m [(F_m - F_0)/F_m]\}$ , coeficiente de dissipação fotoquímica  $[qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')]$  e não fotoquímica  $[NPQ = [(F_m'/F_m') - 1]$ , e taxa de transporte de elétrons  $[ETR = \Phi_{PSII} \times \text{PPFD} \times f \times \alpha]$ , onde  $\Phi_{PSII}$  é eficiência



fotoquímica real do PSII; PPFD é a densidade do fluxo de fótons fotossintéticos;  $f$  é um fator que estima a compartimentação de energia entre os fotossistemas (adota-se o valor de 0,5), e  $\alpha$  é a absorvância da folha pelos tecidos fotossintetizantes (adota-se o valor de 0,84) (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

#### *Biometria e índice de clorofilas*

A altura de plantas foi coletada através da medição com régua graduada medindo-se do solo ao topo da planta; o índice de clorofilas foi medido através de 6 medições na terceira folha completamente expandida a partir do ápice de cada planta, usando SPAD 502 (Konica Minolta, Japan); com auxílio de analisador de imagens em tempo real (Petiole<sup>®</sup> measure leaf area) a área foliar foi determinada, a partir de um gabarito com dimensão determinada.

#### *Arquitetura radicular*

Ao final do experimento, raízes foram separadas dos nódulos e da parte aérea, seguindo para lavagem em água e armazenadas em solução (álcool 30%) para posterior análise. A determinação do volume radicular ocorreu através de imersão das raízes em água em um cilindro graduado, observando-se o volume de água deslocado (RONDINA et al., 2020). Para determinação da Arquitetura do Sistema Radicular (ASR), as raízes foram emergidas em bandeja transparente contendo água para melhor distribuição (DELORY et al., 2017) e feitas imagens digitais para serem analisadas em sistema de análise de fibras e raízes por imagem (software Safira<sup>®</sup>) e obtenção do comprimento e volume de raízes por classe de diâmetro (< 1,0mm, 1,1 - 2,0 mm e > 2,0 mm). O diâmetro médio da raiz foi calculado pela fórmula  $2(V/L\pi)^{0,5}$ ; onde  $V$  representa o volume do sistema radicular e  $L$  o comprimento total da raiz (ZANGARO et al. 2013).

Realizadas as avaliações, parte aérea, raízes e nódulos foram identificados e acondicionadas em sacos de papel, seguindo para armazenamento em estufa com circulação fechada a uma temperatura de 55° C até atingir peso constante para determinação de suas respectivas massas secas.

#### **Análise estatística**

Inicialmente os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos e homocedasticidade. Após atendidos os pressupostos, foram submetidos a análise de

variância (Two-way ANOVA,  $p < 0,05$ ) e, quando significativos, as médias foram comparadas através do uso do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos a análise de componentes principais (ACP) com auxílio do pacote “*factoextra*” (KASSAMBARA; MUNDT, 2020), com o objetivo de verificar a relação entre as variáveis, os microrganismos e a aplicação ou não de resíduo de bauxita. Foi confeccionado um mapa térmico através do cálculo da correlação de Pearson para avaliar a relação entre as variáveis analisadas, com auxílio do pacote “*corrplot*” (WEI; SIMKO, 2021). A análise de correlação de Pearson e a análise de componentes principais foram realizadas usando o software R (R CORE TEAM, 2019).

### 4.3 Resultados

#### *Trocas gasosas e fluorescência da clorofila*

As plantas cultivadas em solo com LV apresentaram maior taxa fotossintética (A) e eficiência do uso da água (WUE) (Fig. 2). A aplicação de 1% de LV ao solo proporcionou um aumento de 9 e 7 % para A e WUE respectivamente, em comparação ao solo sem aplicação de LV. Os níveis de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>) foram maiores em plantas cultivadas no solo sem a aplicação de LV.

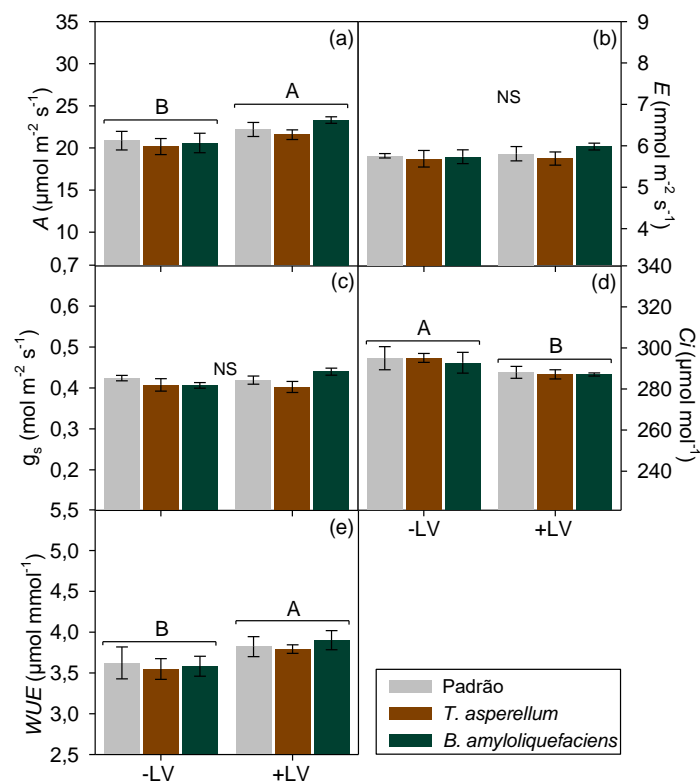


Figura 2. Trocas gasosas de plantas de soja inoculadas com microrganismos isolados da Amazônia em solo com lama vermelha. -LV = sem aplicação de lama vermelha; +

LV = com aplicação de 1% de lama vermelha; Letras distintas, maiúsculas para contaminação e minúsculas para microrganismos, indicam uma diferença significativa de 5% pelo teste Scott-Knott.; <sup>NS</sup> não significativo.

As variáveis de trocas gasosas relacionadas à taxa de transpiração ( $E$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) não foram influenciadas ( $p > 0,05$ ) pela inoculação dos microrganismos isolados da Amazônia brasileira e nem pela adição de LV no solo.

Para a fluorescência da clorofila  $a$  houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para a taxa de transporte de elétrons ( $ETR$ ), onde as folhas das plantas de soja em solo contendo LV apresentaram valores 6% superior em comparação ao solo sem aplicação de LV (Fig. 3). A aplicação dos microrganismos não afetou ( $p > 0,05$ ) as variáveis de fluorescência da clorofila  $a$  das plantas de soja relacionadas à eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v'/F_m'$ ), ao coeficiente de dissipação fotoquímica ( $qP$ ) e não fotoquímica ( $NPQ$ ) (Fig. 3).

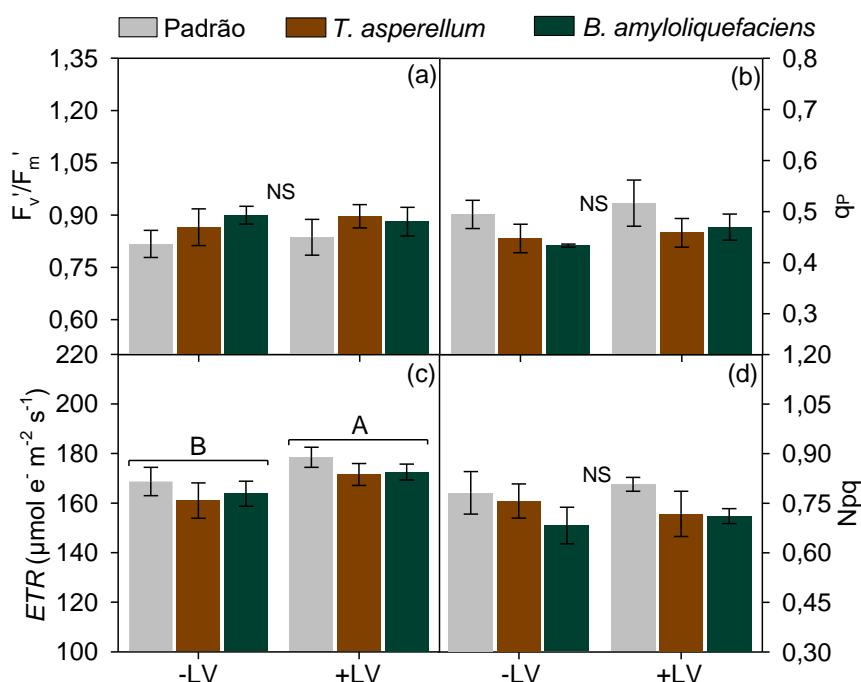


Figura 3. Fluorescência da clorofila  $a$  em folhas de soja inoculada com microrganismos isolados da Amazônia em solo com lama vermelha. -LV = sem aplicação de lama vermelha; +LV = com aplicação de 1% de lama vermelha; Letras distintas, maiúsculas para contaminação e minúsculas para microrganismos, indicam uma diferença significativa de 5% pelo teste Scott-Knott.. <sup>NS</sup> não significativo.

A altura de plantas, área foliar, a massa seca da parte aérea e o índice de clorofilas não foram influenciados pela inoculação de microrganismos, tampouco pela aplicação do LV ao solo (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de crescimento e nódulos de soja coinoculada com microrganismos isolados da Amazônia em solo com lama vermelha.

	Altura de plantas (cm)			Área foliar (cm <sup>2</sup> )		
	-LV	+LV	Média	-LV	+LV	Média
Padrão	51,0±4,2	53,5±4,9	52,3	759,3±37	720,1±68	739,7
<i>T. asperellum</i>	53,2±1,5	57,0±4,0	55,1	701,7±15	725,7±54	713,7
<i>B. amyloliquefaciens</i>	50,2±2,3	48,0±5,5	49,1	734,3±74	693,6±66	714,0
Média	51,5	52,8		731,8	713,2	
CV (%)			15,3			15,6
	Conteúdo de clorofilas			Massa seca da parte aérea (g)		
	-LV	+LV	Média	-LV	+LV	Média
Padrão	33,7±2,1	34,6±0,5	34,1	3,0±0,1	2,8±0,3	2,9
<i>T. asperellum</i>	32,9±1,1	35,2±0,5	34,1	2,9±0,1	2,9±0,2	2,9
<i>B. amyloliquefaciens</i>	32,6±1,1	34,8±0,3	33,7	2,7±0,3	2,7±0,3	2,7
Média	33,1	34,9		2,9	2,8	
CV (%)			6,7			18,3
	Número de nódulos			Massa seca de nódulos (mg)		
	-LV	+LV	Média	-LV	+LV	Média
Padrão	23,5±1,8	24,7±3,6	24,1 a	5,9±0,4	6,4±1,1	6,1
<i>T. asperellum</i>	17,7±0,6	17,5±2,4	17,6 b	5,5±0,7	4,7±0,5	5,1
<i>B. amyloliquefaciens</i>	16,5±1,1	20,5±3,0	18,5 b	5,7±0,7	4,9±0,6	5,3
Média	19,2 A	20,9 A		5,7	5,3	
CV (%)			24,5			26,6

CV = Coeficiente de variação; -LV = Sem lama vermelha; +LV = Com lama vermelha; Letras distintas na coluna ou linhas indicam diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Observou-se, pelo valor médio, menos nódulos radiculares nas plantas de soja coinoculadas com *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*. No entanto, a aplicação de LV não influenciou no número de nódulos. Com relação ao peso dos nódulos não houve efeito da inoculação e nem da adição de LV.

#### Arquitetura radicular

À exceção da massa radicular seca, o comprimento, o volume e o diâmetro das raízes foram influenciados ( $p < 0,05$ ) pelos microrganismos coinoculados e pela adição de LV no solo (Fig. 4). Em solo sem aplicação de LV, maior comprimento de raiz foi observado em plantas sem coinoculação, sendo o valor superior em 139 e 32% em

comparação a coinoculação com *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente.

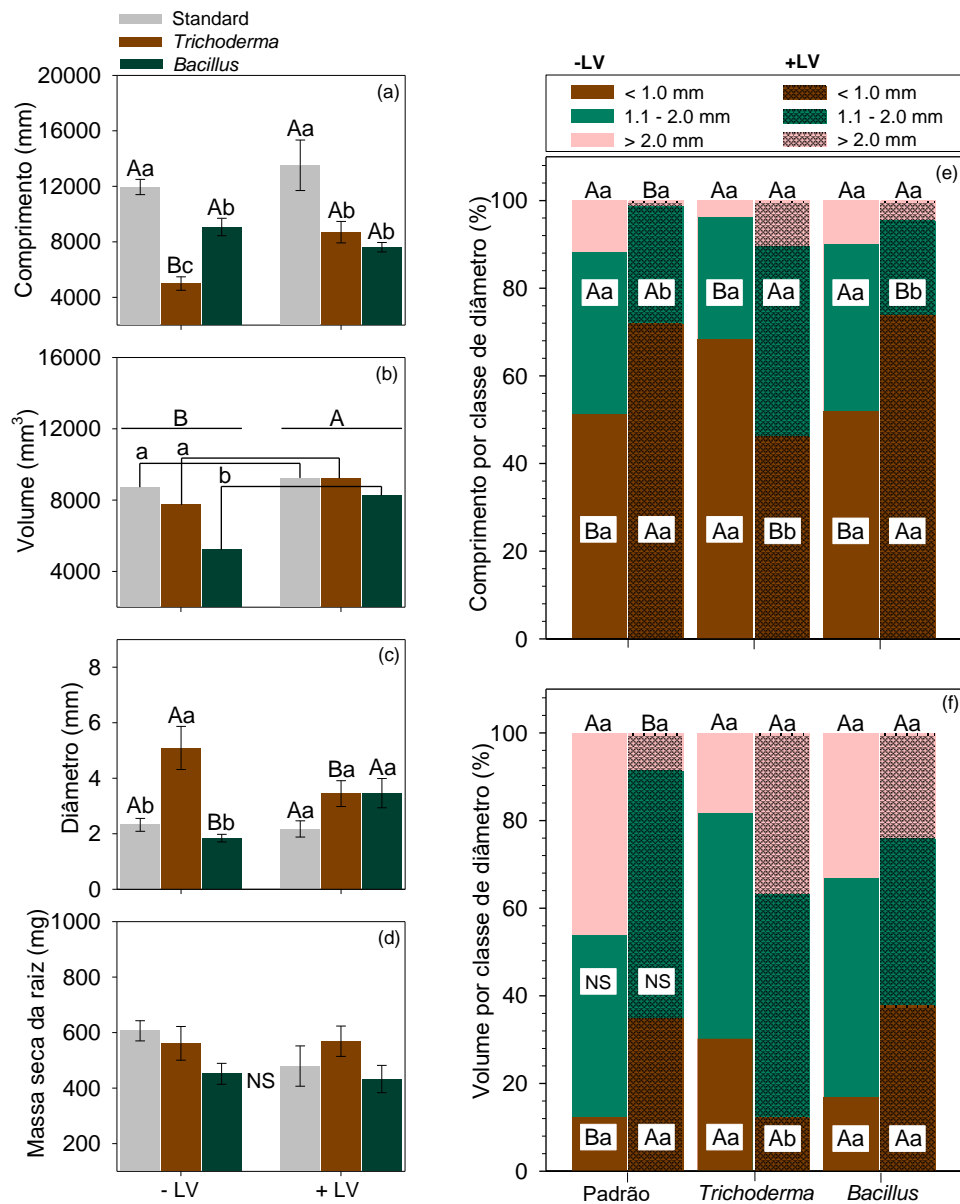


Figura 4. Comprimento (a), volume (b) diâmetro (c), massa seca (d) e porcentagem de classes radiculares em comprimento (e) e volume (f) em soja coinoculada com microrganismos isolados da Amazônia em solo com lama vermelha; Letras distintas, maiúsculas para contaminação e minúsculas para microrganismos, indicam diferença significativa de 5% pelo teste Scott-Knott. <sup>NS</sup> não significativo.; -LV = sem aplicação de lama vermelha; + LV = com aplicação de 1% de lama vermelha.

Com a aplicação de LV, o tratamento padrão foi superior em 55% e 77% em comparação à coinoculação com *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente. Plantas coinoculadas com *T. asperellum* apresentaram maior comprimento radicular quando associadas à aplicação de LV no solo, com incremento

de até 74% em comparação ao solo sem LV (Fig. 4a). No solo sem LV, o maior volume radicular foi observado em plantas sob tratamento padrão e em plantas coinoculadas com *T. asperellum*, sendo os valores 33% e 26% superiores à coinoculação com *B. amyloliquefaciens*, respectivamente. A aplicação de LV ao solo, independente da inoculação, resultou no aumento de 23% do volume radicular LV em relação ao solo que não recebeu LV.

Para o solo que não recebeu LV, as plantas coinoculadas com *T. asperellum* apresentaram maior diâmetro médio de raízes (5,0 mm) em relação às plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens* e sem coinoculação (Fig. 4c). Para o solo tratado com LV, não houve diferença entre as plantas com e sem coinoculação com os microrganismos. Raízes de plantas coinoculadas com *T. asperellum* apresentaram redução de 31% no diâmetro médio da raiz em relação ao padrão, quando aplicado LV ao solo. Já as plantas coinoculadas com *B. amyloliquefaciens* apresentaram um aumento de 88% no diâmetro médio das raízes.

Houve interação significativa entre os fatores para as três classes avaliadas (<1 mm, 1.1-2.0 mm e >2 mm) (Fig. 4e). Em ausência de LV, as raízes finas (diâmetro <1 mm) apresentaram maior percentual para plantas coinoculadas com *T. asperellum* em relação às plantas sob demais tratamentos. Em solo com LV incorporado, o maior percentual de raízes finas ocorreu em plantas sem coinoculação e coinoculadas com *B. amyloliquefaciens*, em comparação à coinoculação com *T. asperellum*. A aplicação de LV proporcionou maior percentual de raízes médias (1.1 – 2.0 mm) em plantas coinoculadas com *T. asperellum* em relação aos outros tratamentos.

Para o percentual por classe de diâmetro de raízes que compõem o volume radicular, apenas o percentual de raízes médias não foi influenciado significativamente pelos tratamentos aplicados (Fig. 4f). Para o percentual de raízes finas (<1.0 mm), plantas sem coinoculação e coinoculadas com *B. amyloliquefaciens* apresentaram maiores valores quando aplicado LV ao solo. Já em relação à coinoculação, houve diferença significativa apenas associada a aplicação de LV ao solo, onde plantas coinoculadas com *T. asperellum* apresentaram menor percentual de raízes finas no volume radicular.

#### *Análise de Componentes Principais e Correlação de Pearson*

A análise de componentes principais (ACP) (Fig. 5) foi capaz de explicar mais de 58% da variação para as variáveis de crescimento (Fig. 5a), 69% para as variáveis

de trocas gasosas e fluorescência da clorofila (Fig. 5b) e 64% para as variáveis relacionadas a arquitetura radicular (Fig. 5c) de plantas de soja coinoculadas com microrganismos isolados da Amazônia em solo com ou sem a aplicação de LV.

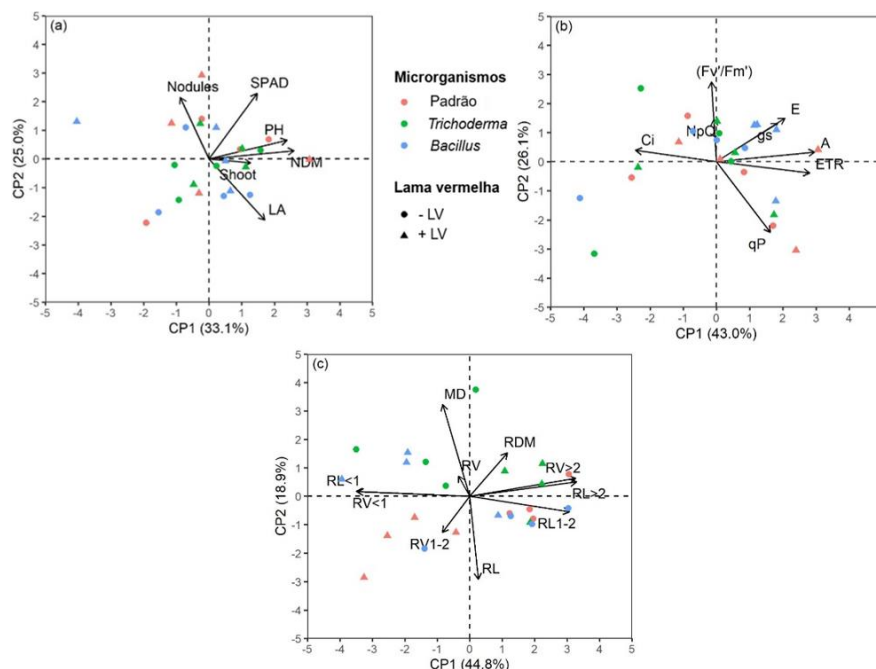


Figura 5. Análise de Componentes principais das variáveis de crescimento (a), trocas gasosas e fluorescência da clorofila (b) e arquitetura radicular (c) de plantas de soja coinoculadas com microrganismos isolados da Amazônia em solo com resíduo de bauxita. -LV = sem aplicação de lama vermelha; + LV = com aplicação de 1% de lama vermelha.

Para as variáveis crescimento de plantas, trocas gasosas e fluorescência da clorofila a não foi possível distinguir ou agrupar os tratamentos (efeito dos microrganismos ou da adição de LV). Já para as variáveis relacionadas a arquitetura radicular houve uma melhor distinção entre os efeitos dos microrganismos e da adição de LV. O uso da *Trichoderma* foi mais relacionado as variáveis volume de raízes (RV), volume de raízes grossas (RV>2), diâmetro médio (MD) e massa seca da raiz (RDM), enquanto o tratamento sem coinoculação foi mais relacionado as variáveis comprimento de raízes (RL), comprimento de raízes médias (RL1-2), comprimento de raízes grossas (RL>2) e volume de raízes médias (RV1-2).

A correlação de Pearson (Fig. 6) entre as variáveis apresentou coeficientes positivos e negativos. A grande maioria dos coeficientes variaram de -0,5 a 0,5, com algumas correlações pontuais de -1,0 a -0,5 ou 0,5 a 1,0 (correlação moderada a muito alta; positiva ou negativa). As correlações significativas foram observadas

principalmente para as variáveis de arquitetura radicular, assim como foi observado para a ACP, onde foi possível discriminar entre o efeito dos microrganismos e da adição de LV ao solo.

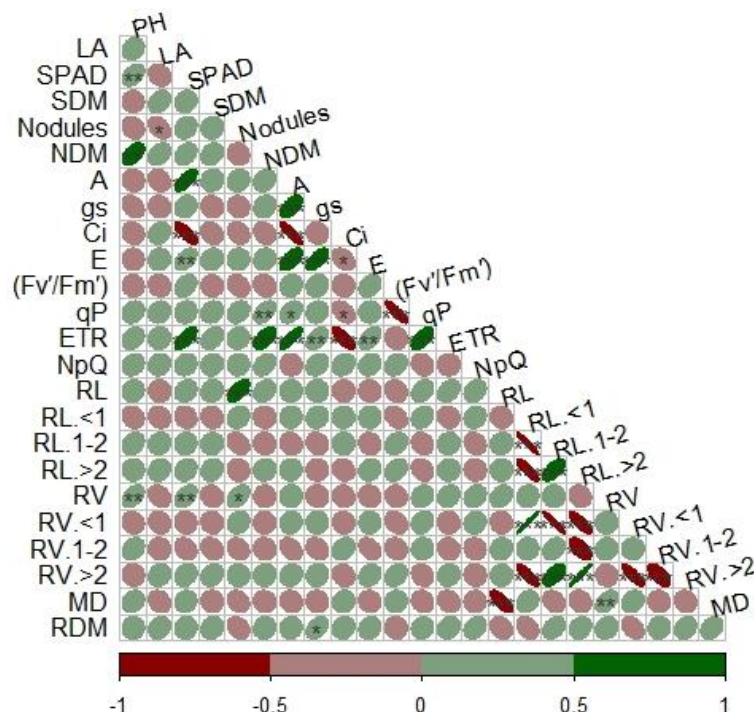


Figura 6. Mapa de calor da correlação de Pearson das variáveis avaliadas de plantas de soja coinoculadas com microrganismos isolados da Amazônia em solo com resíduo de bauxita.; Significância: \*\*\* = 1%, \*\* = 5% e \* = 10%.; PH: altura de plantas; LA: área foliar; SDM: massa seca da parte aérea; NDM: massa seca dos nódulos; RL: comprimento radicular; RV: volume radicular; MD: diâmetro médio da raiz; RDM: massa seca da raiz.

#### 4.4 Discussão

Os primeiros esforços para recuperação de áreas pós-mineração são concentrados na revegetação (MACDONALD et al., 2015; CHENOT et al., 2017). A estratégia mais utilizada para possibilitar a revegetação dessas áreas está relacionada à aplicação de uma camada de solo retirada na superfície de uma área sem contaminação, a qual servirá com substrato por conter atributos químicos e físicos favoráveis ao desenvolvimento das plantas (BULOT et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; ONÉSIMO et al., 2021). Para tornar essa prática mais viável e eficaz, está sendo proposto, no presente estudo, a incorporação de 1% de LV no solo que será utilizado para recobrimento da área contaminada a ser revegetada, seja ela uma área de mineração, seja o solo utilizado para recobrimento de barragem de rejeitos e aterros sanitários. Nesse caso, a adição de LV proporcionará benefícios diretos às plantas e redução do passivo ambiental gerado.



### *Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a*

Estresses abióticos, como em toxicidade por metais pesados, reduzem principalmente a eficiência fotossintética das plantas, devido às suas consequências negativas na biossíntese da clorofila, redução da condutância estomática, desempenho dos fotossistemas I e II, no transporte de elétrons e outros fatores (WEN et al., 2011; SHARMA et al., 2020). Assim, análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila são eficientes indicadores de estresses nas plantas.

No presente estudo, o índice de clorofila as trocas gasosas das folhas de soja não foram prejudicadas pela adição de LV ao solo. Esses resultados são um indicativo de que os níveis de metais pesados no solo eram abaixo das quantidades tóxicas para as plantas e/ou estavam em uma forma não biodisponível. Por exemplo, metais potencialmente tóxicos como Cd, As, Pb, Hg e Cr, já relatados em resíduo de bauxita oriundos da região amazônica (LEITE, et al., 2022), podem ser absorvidos e causar desregulação de diversos processos bioquímicos, fisiológicos e metabólicos nas plantas (COSTA et al., 2021; SHARMA et al., 2020). Além disso, alguns desses metais possuem a capacidade de substituir o Mg constituinte da molécula de clorofila e, posteriormente, torná-la inativa durante o processo fotossintético (BERTRAND; POIRIER, 2005).

Apesar da presença de metais pesados no LV, a alta quantidade de óxidos de Fe e Al presentes no material fornecem alta capacidade de adsorção desses elementos (WORLD ALUMINIUM, 2015; RUBINOS; SPAGNOLI, 2019; COSTA et al., 2021). Diversas pesquisas identificaram a capacidade de uso de LV para reter poluentes como As, Cd, Pb e outros metais pesados (RUBINOS; SPAGNOLI, 2019; ZHOU et al., 2017; COSTA et al., 2021; YANG et al., 2020). Além disso, em função das suas propriedades adsorptivas, o LV é considerado um dos materiais mais eficazes e baratos para o tratamento “in situ” de solo contaminado com metais pesados (ZHOU et al., 2017).

O LV é reconhecidamente rico em elementos terras raras (ETRs) (PANDA et al., 2021). Adicionalmente, ETRs são utilizados na agricultura para melhorar o crescimento das plantas, desenvolvimento de raízes e a fotossíntese nas folhas, regulando as atividades de enzimas e aumentando a absorção de nutrientes (LIAN et al., 2019). Além disso, diversos fertilizantes minerais possuem quantidades de ETRs em suas composições, como os fertilizantes fosfatados (HU et al., 2004). É possível

que os ETRs comumente presentes na LV estejam relacionados ao aumento dos parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a* (Fig. 2 e 3). Ademais, o LV possui nutrientes, mesmo que em baixas concentrações, que podem promover melhorias no aparato fotossintético das plantas. Por exemplo, o Mg (que é o átomo central da molécula de clorofila) e o P (necessário para a formação de ATP, ou seja, a energia necessária para processos metabólicos como a biossíntese da clorofila).

Em estudos com aplicação de ETRs em plântulas de soja, Wen et al. (2011) verificaram melhoria na fotossíntese. Também com plântulas de soja, Oliveira et al. (2015) observaram que baixas concentrações do ETR lantânio (La) estimularam a taxa fotossintética, elevaram a biomassa das plantas (parte aérea e raízes) e proporcionaram aumento dos teores nutricionais de elementos essenciais, como Ca, P, K e Mn. Já Elbasan et al. (2020) mencionam os ETRs (La, Ce, Gd, Y e Sc) aumentando a atividade fotossintética em plantas. Os resultados desses autores possibilitam a inferência de que o uso de LV pode ter proporcionado maior eficiência do aparato fotossintético da soja em razão da presença de ETRs.

No presente estudo, a condutância estomática ( $g_s$ ) não foi alterada pela aplicação de LV, indicando que a abertura estomática não foi afetada e, conseqüentemente, houve pouca resistência para a entrada de CO<sub>2</sub> nas folhas. Entretanto, a menor concentração de carbono intercelular na região no mesófilo ( $C_i$ ) revela a maior utilização do CO<sub>2</sub> disponível para a atividade de carboxilação da Rubisco, como pode ser observado na maior fotossíntese líquida ( $A$ ) nas plantas com adição de LV em comparação com as plantas sem LV (Fig. 2).

Semelhante à condutância estomática, a taxa de transpiração ( $E$ ) também não foi alterada pela aplicação de LV nas plantas de soja. Geralmente, esses dois parâmetros têm comportamento semelhante, pois o grau de abertura estomática controla a quantidade de água perdida pela transpiração. Entretanto, as plantas com adição de LV utilizaram esse grau de abertura estomática como ponto chave de regulação para favorecer a atividade de carboxilação sem aumentar a perda de água pela transpiração, como pode ser observado na maior eficiência do uso da água ( $WUE$ ), ou seja, menos água perdida para cada carbono assimilado (Fig. 2).

Variáveis como  $F_v'/F_m'$  estão entre os parâmetros de fluorescência da clorofila mais representativos, quando avaliados os efeitos biológicos do estresse ambiental (Wen et al., 2011). No presente estudo, os parâmetros  $F_v'/F_m'$  indicam que a aplicação de LV não alterou a integridade do aparato fotossintético responsável pela captura de

luz. Entretanto, a captura e utilização da luz foram maiores nas plantas com LV, como pode ser observado na maior taxa de transferência de elétrons (*ETR*).

A quantidade de luz utilizada (dissipada) nas reações fotoquímica (*qP*) não foi afetada, assim como a quantidade de energia perdida na forma de calor (*NPQ*), evidenciando a integridade dos fotossistemas I e II. Esses resultados revelam que o LV não prejudica as reações da etapa fotoquímica da fotossíntese, mas pode melhorar a utilização da luz capturada e manter melhor regularidade do suprimento de energia na forma de ATP e NADPH para a atividade de carboxilação da Rubisco na bioquímica da fotossíntese.

Não houve diferença significativa nas trocas gasosas e fluorescência da clorofila em função da coinoculação de plantas. Esses resultados estão de acordo com encontrado por Silva et al. (2020) e Fernandes et al. (2021) que, ao avaliarem o mesmo mix de *T. asperellum* do presente estudo e outros microrganismos, não observaram aumento significativo na taxa fotossintética de plantas coinoculadas apenas com *T. asperellum*, respectivamente para soja e arroz. No entanto, era esperado um aumento nas trocas gasosas pela coinoculação de plantas, visto que microrganismos promotores de crescimento promovem mudanças nas taxas hormonais das plantas e aumentam a absorção vegetal de macronutrientes que influenciam nas trocas gasosas (SILVA et al., 2020). Sabendo que essas medições são realizadas pontualmente em área foliar de 2 cm<sup>2</sup>, espera-se que a planta como um todo apresente valores mais contundentes, pois apresentam maior área foliar com a aplicação dos microrganismos. Possivelmente a boa fertilidade do solo de nosso estudo e boa resposta das plantas à aplicação de LV impossibilitaram os microrganismos de promover benefícios as plantas.

#### *Biometria e Índice de clorofilas*

Indicadores de crescimento como altura de plantas, área foliar, peso seco (parte aérea e raízes) refletem o estado de desenvolvimento da planta (WEN et al., 2011). A aplicação de LV não influenciou essas variáveis (Tabela 3). A não significância dos resultados indicou que 1% de LV aplicado ao solo não foi prejudicial ao crescimento das plantas de soja. Outro estudo identificou que somente a partir de 5% de LV aplicado ao solo havia redução do crescimento da parte aérea e raízes de trigo (*Triticum aestivum*) (UJACZKI et al., 2016a).

Avaliando a microbiota de solo misturado com LV, Feigl et al. (2017) observaram que a aplicação de LV em até 20% era benéfica para a comunidade microbiana do solo. Por outro lado, estes afirmam que doses superiores promovem a deterioração da microflora. Concomitantemente, nossos resultados para número de nódulos e massa de nódulos, que é um indicador da colonização rizosférica da soja por *Bradyrhizobium*, não diferiram entre solo com ou sem a aplicação de LV. Portanto, os resultados vão de acordo com os encontrados por Feigl et al. (2017).

Avaliando *B. amyloliquefaciens* como biorremediador em áreas contaminadas com metais pesados e ETRs, estudos indicaram essa bactéria com potencial para melhorar/reduzir a fitoacumulação em plantas de milho (*Zea mays*) e trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) de elementos potencialmente tóxicos (Cr, Pb, Co, Ge) (Okoroafor et al., 2022). Adicionalmente, Chen et al. (2022) isolaram bactérias [Z18 (*Mesorhizobium*) e Z28 (*Pseudomonas*)] de LV, posteriormente inoculando-as em plantas de grama bermuda (*Cynodon dactylon*). Como resultado, esses autores identificaram melhorias nas propriedades físico-químicas do LV e melhor crescimento das plantas, atribuindo os resultados positivos a capacidade dessas bactérias em solubilização de fosfatos e produção de sideróforos e auxinas.

Em contraste aos estudos mencionados, os resultados do presente estudo não indicaram benefícios às plantas de soja pela coinoculação com *B. amyloliquefaciens*. No entanto, nos dois estudos mencionados, as plantas se encontravam em situação de estresse por altas doses de metais pesados e/ou LV em forma pura. Microrganismos benéficos atuam como pré-sinalizadores de condições de estresses nas plantas, seja biótico ou abiótico, possibilitando que a planta se prepare para condições adversas. No entanto, como verificado pelos parâmetros de crescimento, a taxa de LV aplicado não foi estressante para as plantas de soja e, até mesmo promoveu melhorias de diversas outras variáveis.

#### *Arquitetura do sistema radicular*

As plantas de soja apresentaram maior percentual de raízes finas (<1 mm) para comprimento e volume de raízes quando aplicado LV ao solo. Esses resultados indicam uma modificação positiva da arquitetura do sistema radicular (ASR), uma vez que as raízes finas são mais eficientes em explorar o solo, adaptam-se mais facilmente a fertilidade do solo e restrição hídrica do que raízes grossas (>2 mm), e possuem melhor eficiência no uso de nutrientes (ZANGARO et al., 2014; RONDINA

et al., 2020). Por outro lado, o custo com carbono para manutenção de raízes finas é mais elevado, uma vez que a frequência de reposição dessas raízes é maior devido ao menor tempo de vida (SOLLY et al., 2018). Esse aumento da demanda de carbono pelo aumento de raízes finas relaciona-se diretamente com a maior taxa fotossintética observada em plantas com aplicação de LV.

A ASR das plantas tem importante função na absorção de água e nutrientes, além de contribuir para adaptações diante de estresses por nutrientes e/ou metais (RUÍZ-HERRERA et al., 2012; LIU et al., 2016). Essa importância decorre do fato de que muitos recursos do solo não estão uniformemente distribuídos, ou estão sujeitos a esgotamento localizado, assim a distribuição espacial do sistema radicular determinará a capacidade da planta em acessar esses recursos (LYNCH, 1995). As mudanças na ASR são influenciadas por propriedades físicas e químicas do solo, microrganismos, fitormônios, interação com outras raízes, tipo de bioma e sazonalidade (ZANGARO et al., 2014).

As modificações na ASR podem estar relacionadas à presença dos ETRs no solo, uma vez que estes possuem capacidade de modificar diretamente a ASR (RUÍZ-HERRERA et al., 2012; LIU et al., 2016). Quanto aos microrganismos testados, a coinoculação das plantas de soja (*T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*) promoveu plantas com menor comprimento radicular. Essa redução no comprimento radicular é constantemente atribuída à capacidade desses microrganismos em produzir e/ou estimular a produção de fitormônios pelas plantas. O ácido indol-acético (IAA) secretado pelas bactérias e fungos rizosféricos atua em conjunto com o suprimento endógeno do mesmo na planta, e sua resposta varia desde o alongamento da raiz primária, à formação de raízes laterais e adventícias, até a inibição do crescimento (DUCA et al., 2014; TAIZ et al., 2017).

Particularmente interessante, é o fato de plantas coinoculadas com *T. asperellum* apresentarem maior percentual de raízes grossas (>2 mm) quando as plantas foram cultivadas em solo com LV. A capacidade de *T. asperellum* promover modificações na ASR já foi relatada em outros estudos, por exemplo, estudos em plantas de açaí inoculadas com o mesmo mix de *T. asperellum* avaliado nesse experimento, indicaram que esse mix fúngico pode proporcionar aumento do comprimento, densidade, e número de pontas de raízes, conseqüentemente modificando a ASR das plantas (MELO JÚNIOR, 2020).

### *Análise de Componentes Principais e Correlação de Pearson*

A análise de componentes principais é uma técnica que agrupa os indivíduos de acordo com a variação de suas características (HONGYU; SANDANIELO; OLIVEIRA JUNIOR, 2015). De acordo com os resultados da ACP, as variáveis relacionadas ao desenvolvimento das plantas de soja (Fig. 5a) que mais contribuíram para cada componente principal (CP) foram NDM e SPAD para a CP1 e CP2 respectivamente. Já para as variáveis relacionadas as trocas gasosas e fluorescência de clorofila (Fig. 5b) foram as variáveis  $A$  e  $F_v'/F_m'$  para a CP1 e CP2 respectivamente. Para a ACP das variáveis relacionadas à arquitetura radicular a maior contribuição foi observada para as variáveis  $RV_{<1}$  e MD para a CP1 e CP2 respectivamente. Essas variáveis foram as que mais contribuíram para o percentual de variância explicado por cada componente. De acordo com Rencher (2002) a CP1 e CP2 devem explicar pelo menos 70% da variância dos dados. Sendo assim, a ACP para as variáveis relacionadas às trocas gasosas e fluorescência de clorofila foram melhor representadas.

A análise correlação de Pearson resultou em coeficientes variando de desprezível a muito alto, tanto positiva como negativamente (MUKAKA, 2012). Na grande maioria das vezes os coeficientes de correlação foram considerados desprezíveis (0,0 a 0,30) e baixos (0,30 a 0,50) positivos ou negativos (MUKAKA, 2012). Poucas dessas correlações foram significativas, variando de moderado (0,50) a muito alto (1,0) (MUKAKA, 2012), o que explica a maior variação explicada pela análise de componentes principais.

### **4.5 Conclusões**

Os resultados de nosso estudo vão em direção ao uso de LV em baixas quantidades em camadas superficiais de áreas de deposição de resíduos, revegetação de mineração e aterros sanitários. Adicionalmente, a recomendação de aplicação pode vir a ser estendida a áreas degradadas, após estudos futuros quanto à qualidade química do solo, níveis dos metais presentes no solo e na planta e colunas de lixiviação.

A adição de 1% de LV associada com a coinoculação de *Bacillus amyloliquefaciens* promoveu alterações na arquitetura do sistema radicular, elevando o percentual de raízes finas. Em estudos futuros, recomendamos experimentos com maiores doses de LV em associação com esses microrganismos.

## Referencias Bibliográficas

ANAM, G.B.; REDDY, M.S.; AHN, Y. Characterization of *Trichoderma asperellum* RM-28 for its sodic/saline-alkali tolerance and plant growth promoting activities to alleviate toxicity of red mud. **Science of the Total Environment**. v. 662, p. 462–469, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.279>

ALVARES, C.A. et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**. v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

BABU, A.G.; REDDY, M.S. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and nutrient status of bermudagrass grown in alkaline bauxite processing residue. **Environmental Pollution**. v. 159, p. 25-29, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.032>

BERTRAND, M.; POIRIER, I. Photosynthetic organisms and excess of metals. **Photosynthetica**. v. 43, n. 3, p. 345-353, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0058-2>

BULOT, A. et al. Ecological restoration by soil transfer: impacts on restored soil profiles and topsoil functions. **Restoration Ecology**. v. 25, n. 3, p. 354-366, 2017. <https://doi.org/10.1111/rec.12424.hal-01792467>

CÂMARA, G.M.S. 2015. **Adubação**. In: SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. Soja: do plantio a colheita. Editora Viçosa. Viçosa-MG; 2015. 333p.

CHEN, L. et al. Novel plant growth-promoting bacteria isolated from bauxite residue: the application for revegetation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03433-y>

COSTA, E.T.S. et al. Characterization of an aluminum industry by-product and its use on cadmium and lead retention in monoelementary systems. **Quimica Nova**. v. 32, n. 4, p. 868-874, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400008>

COSTA, E.T.S. et al. Phytoremediation of Arsenic-contaminated soils amended with red mud combined with phosphogypsum. **Water Air Soil Pollution**. v. 232, n. 417, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05360-4>

COSTA, M.W.; OLIVEIRA, A.A.M. Social life cycle assessment of feedstocks for biodiesel production in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 159, e112166, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112166>

CHENOT, J. et al. Long-term effects of topsoil transfer assessed thirty years after rehabilitation of dry alluvial quarries in Southeastern France. **Ecological Engineering**. v. 99, p. 1–12, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.010>

DELORY, B.M. et al. Accuracy and bias of methods used for root length measurements in functional root research. **Methods in Ecology and Evolution**. v. 8, p. 1594–1606, 2017. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12771>

DI CARLO, E.; BOULLEMANT, A.; COURTNEY, R. Ecotoxicological risk assessment of revegetated bauxite residue: Implications for future rehabilitation programmers. **Science of the Total Environment**. v. 698, e134344, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134344>

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00226-X)

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Leeuwenhoek**. v. 106, p. 85-125, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>

ELBASANA, F. 2020. Rare-earth element scandium improves stomatal regulation and enhances salt and drought stress tolerance by up-regulating antioxidant responses of *Oryza sativa*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 152, p. 157–169, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.040>

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. Stages of soybean development. Iowa State University. Agricultural and Home Economics Experiment Station. **Special Reports**. v. 80, 1977. <https://lib.dr.iastate.edu/specialreports/87>

FEIGL, V. et al. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. **Science of the Total Environment**. v. 595, p. 903–911, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.266>

FERNANDES, J.P.T. et al. Effects of beneficial microorganisms on upland rice performance. **Brazilian Journal of Agricultural and Environmental Engineering**. v. 25, n. 3, p. 156-162, 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v25n3p156-162>

FERREIRA, P.A.A. et al. Soil amendments affect the potential of *Gomphrena claussenii* for phytoremediation of a Zn- and Cd-contaminated soil. **Chemosphere**. v. 288, e132508, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132508>

HONGYU, K.; SANDANIELO, V.L.M.; OLIVEIRA JUNIOR, G.J. Principal Component Analysis: theory, interpretations and applications. **Engineering and Science**. v. 5, n. 1, p. 83-90, 2015. <https://doi.org/10.18607/ES20165053>

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F.J. (Ed) **Biological nitrogen fixation**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2015. pp. 1009–1024. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>



HU, Z. et al. Physiological and biochemical effects of rare earth elements on plants and their agricultural significance: A Review. **Journal of Plant Nutrition**. v. 27, n. 1, p. 183-220, 2004. <https://doi.org/10.1081/PLN-120027555>

INTERNATIONAL ALUMINIUM. **Aluminium, shaping and better tomorrow**. Statistical. 2021. Available at: <https://international-aluminium.org/statistics/primary-aluminium-production/> Accessed November 2021.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v. 60, p. 969, 1970. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-60-969>

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **Package “factoextra” version 1.0.7: extract and visualize the results of multivariate data analyses**. 2020. <http://www.sthda.com/english/rpkgs/factoextra>

LEITE, R.C. et al. Bauxite residue valorization - Soil conditioners production through composting with palm oil mill residual biomass. **Science of The Total Environment**. v. 835, e155413, 2022a. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155413>

LIAN, H. et al. Foliar-applied lanthanum chloride increases growth and phosphorus acquisition in phosphorus-limited adzuki bean seedlings. **Plant Soil**. v. 442, p. 385–399, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04197-5>

LIAO, J. et al. A novel acid-producing fungus isolated from bauxite residue: the potential to reduce the alkalinity. **Geomicrobiology Journal**. v. 35, n. 10, p. 840-847, 2018. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1479807>

LIMA, J.V. et al. Hormonal imbalance triggered by rhizobacteria enhance nutrient use efficiency and biomass in oil palm. **Scientia Horticulturae**. v. 264, e109161, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109161>

LIU, G.H. et al. *Bacillus alkalicellulosilyticus* sp. nov., isolated from extremely alkaline bauxite residue (red mud) site. **Archives of Microbiology**. v. 203, p. 719–723, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02063-y>

LIU, Y-Y. et al. Involvement of reactive oxygen species in lanthanum-induced inhibition of primary root growth. **Journal of Experimental Botany**. v. 67, n. 21, p. 6149–6159, 2016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw379>

LOPES, G. et al. Increasing arsenic sorption on red mud by phosphogypsum addition. **Journal of Hazardous Materials**. v. 262, p. 1196-1203, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.051>

LYNCH, J. Root architecture and plant productivity. **Plant Physiology**. v. 109, p. 7-13, 1995. <https://doi.org/10.1104/pp.109.1.7>

LYU, F. et al. Dealkalization processes of bauxite residue: a comprehensive review. **Journal of Hazardous Materials**. v. 403, e. 123671, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123671>

MACDONALD, S.E. et al. Forest restoration following surface mining disturbance: challenges and solutions. **New Forests**. v. 46, p. 703–732, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11056-015-9506-4>

MARTINS, W.B.R. et al. Ecosystem restoration after bauxite mining: favorable indicators for Technosols construction and soil management using liming and subsoiling. **New Forests**. v. 52, p. 971–994, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11056-021-09834-5>

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of Experimental Botany**. v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>

MENZIES, N.W.; KOPITTKE, P.M. Seawater neutralization and gypsum amelioration of bauxite refining residue to produce a plant growth medium. **Science of the Total Environment**. v. 763, e143046, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143046>

MELO JÚNIOR, J.A.G. **A inoculação com microrganismos afeta positivamente arquitetura do sistema radicular e o acúmulo de nutrientes em mudas de *Euterpe oleracea* (Mart.)**. Universidade Federal Rural da Amazônia (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Agronomia. 2020. 55f.

MUKAKA, M.M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**. v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

NATURE EDITORIAL. Aluminium producers promise a cleaner smelting pot. **Nature**. v. 557, e280, 2018. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05158-1>

OLIVEIRA, C. et al. Bioaccumulation and effects of lanthanum on growth and mitotic index in soybean plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 122, p. 136–144, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.020>

ONÉSIMO, C.M.G. Ecological succession in areas degraded by bauxite mining indicates successful use of topsoil. **Restoration Ecology**. v. 29, n. 1, e13303, 2021. <https://doi.org/10.1111/rec.13303>

OKOROAFOR, P.U. et al. Impact of soil inoculation with *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the phytoaccumulation of germanium, rare earth elements, and potentially toxic elements. **Plants**. v. 11, e341, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11030341>

OXBOROUGH, K.; BAKER, N.R. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency in to photochemical and non-photochemical components calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring F0'. **Photosynthesis Research**. v. 54, e13542, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1005936823310>

PANDA, S. et al. Biotechnological trends and market impact on the recovery of rare earth elements from bauxite residue (red mud) – A review. **Resources, Conservation & Recycling**. v. 171, e105645, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105645>

PAZ, S.P.A.; ANGÉLICA, R.S.; KAHN, H. Optimization of the reactive silica quantification method applied to Paragominas-type Gibbsite bauxites. **International Journal of Mineral Processing**. v. 162, p. 48-57, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.minpro.2017.03.003>

PHILLIPS, I.R.; COURTNEY, R. Long term field trials demonstrate sustainable nutrient supply and uptake in rehabilitated bauxite residue. **Science of the Total Environment**. v. 804, e150134, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150134>

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Found Stat Comput Vienna, Austria. 2019.

RENCHER, A.C. **Methods of multivariate analysis**. A John Wiley & Sons, Inc. Publication. 2ed. 2002. 727p. <https://doi.org/10.1002/0471271357>

RENFORTH, P. 2019. The negative emission potential of alkaline materials. **Nature Communications**. v. 10, e1401, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09475-5>

RIBEIRO, R.A. Topsoil application during the rehabilitation of a manganese tailing dam increases plant taxonomic, phylogenetic and functional diversity. **Journal of Environmental Management**. v. 227, p. 386–394, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.060>

RONDINA, A.B.L. et al. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**. v. 56, p. 537-549, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

ROSA, L.H. **Neotropical endophytic fungi**. diversity, ecology, and biotechnological Applications. Springer, Cham. 2021. 395p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-53506-3>

RUBINOS, D.A.; SPAGNOLI, G. Assessment of red mud as sorptive landfill liner for the retention of arsenic (V). **Journal of Environmental Management**. v. 232, p. 271–285, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.041>

RUÍZ-HERRERA, L.F. et al. Rare earth elements lanthanum and gadolinium induce phosphate-deficiency responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant and Soil**. v. 353, p. 231–247, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1026-1>

SANTINI, T.C.; KERR, J.L.; WARREN, L.A. Microbially-driven strategies for bioremediation of bauxite residue. **Journal of Hazardous Materials**. v. 293, p. 131–157, 2015. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.024>

SERVICE, R.F. Red alert: researchers are working to find new uses for red mud, the caustic byproduct of aluminum production. **Science**. v. 369, n. 6506, p. 910-911, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.369.6506.910>

SHARMA, A. et al. Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: A review. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 39, p. 509–531, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10018-x>

SiBCS. **Sistema brasileiro de classificação do solo**. 5ª ed. Embrapa, Brasília, DF. 2018.

SILVA, J.C. et al. Rice sheath blight biocontrol and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 55, n. 4, p. 243-250, 2012. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2012.078>

SILVA, M.A. et al. Individual and combined growth-promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. **Caatinga**. v. 33, n. 3, p. 619-632, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252020v33n305rc>

SNARS, K.E.; GILKES, R.J.; WONG, M.T.F. The liming effect of bauxite processing residue (red mud) on sandy soils. **Australian Journal of Soil Research**. v. 42, p. 321-328, 2004. <https://doi.org/10.1071/SR03021>

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy**. Washington, DC: US Gov. Print. Office. 2014.

SOLLY, E.F. et al. Unravelling the age of fine roots of temperate and boreal forests. **Nature Communications**. v. 9, e3006, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05460-6>

SONTER, L.J. Mining drives extensive deforestation in the Brazilian Amazon. **Nature Communications**. v. 8, e1013, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00557-w>

SUMMERS, R.N.; BOLLAND, M.D.A.; CLARKE, M.F. Effect of application of bauxite residue (red mud) to very sandy soils on subterranean clover yield and P response. **Australian Journal of Soil Research**. v. 39, p. 979–990, 2001. <https://doi.org/10.1071/SR97095>

SUMMERS, R.N.; GUISE, N.R.; SMIRK, D.D. Bauxite residue (Red Mud) increases phosphorus retention in sandy soil catchments in Western Australia. **Fertilizer Research**. v. 34, p. 85-94, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00749964>

TANEEZ, M.; HUREL, C. A review on the potential uses of red mud as amendment for pollution control in environmental media. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 26, p. 22106–22125, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05576-2>

TAIZ, L. et al. **Plant physiology and development**. 6ª ed. Oxford University Press. 2017.

UJACZKI, E. et al. Red mud as acidic sandy soil ameliorant: a microcosm incubation study. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 91, n. 6, p. 1596-1606, 2016a. <https://doi.org/10.1002/jctb.4898>

UJACZKI, E. et al. The potential application of red mud and soil mixture as additive to the surface layer of a landfill cover system. **Journal of Environmental Sciences**. v. 44, p. 189-196, 2016b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.12.014>

WANG, G., WANG, L., MA, F. Effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on improvement of fertility and microbial communities of soils heavily polluted by cadmium. **Chemosphere**. v. 286(Part 2), e131567, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131567>

WEI, T.; SIMKO, V. **R package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix**. CRAN.R-project.org. 2021.

WEN, K. et al. Combined effects of lanthanum ion and acid rain on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in soybean seedlings. **Chemosphere**. v. 84, p. 601–608, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.054>

WORLD ALUMINIUM. **Bauxite residue management: Best practice**. 2015. Available at: [www.world-aluminium.org](http://www.world-aluminium.org) Accessed January 2022.

XUE, S. et al. Insights into variations on dissolved organic matter of bauxite residue during soil-formation processes following 2-year column simulation. **Environmental Pollution**. v. 292, e118326, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118326>

XUE, S. et al. A review of the characterization and revegetation of bauxite residues (Red mud). **Environmental Science and Pollution Research**. v. 23, p. 1120–1132, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4558-8>

YANG, T. et al. Enhancing Cd(II) sorption by red mud with heat treatment: Performance and mechanisms of sorption. **Journal of Environmental Management**. v. 255, e10986, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109866>

ZANGARO, W. et al. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. **Mycorrhiza**. v. 23, p. 221–233, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0464-9>

ZANGARO, W. et al. Succession and environmental variation influence soil exploration potential by fine roots and mycorrhizal fungi in an Atlantic ecosystem in southern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**. v. 30, n. 3, p. 237-248, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0266467414000078>

ZHOU, R. et al. Remediation of Cu, Pb, Zn and Cd-contaminated agricultural soil using a combined red mud and compost amendment. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 118, p. 73-81, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.023>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coinoculação das plantas de soja com *Bradyrhizobium* e cepas de microrganismos benéficos, regionalizadas ou não, proporcionou incremento em crescimento, nutrição, rendimento e rentabilidade às plantas de soja. Além da importância voltada a maior produtividade da soja, a coinoculação pode se tornar uma peça chave para promoção de uma agricultura mais ambientalmente sustentável, pelo fato de os organismos utilizados não serem danosos ao meio ambiente e seres humanos.

O uso de microrganismos na agricultura vem sendo cada vez mais difundido, com uma diversidade de cepas difundidas, de algumas poucas espécies fúngicas e bacterianas. Estudos futuros devem ser direcionados a seleção de microrganismos isolados da própria região de interesse, visando o uso de cepas regionalizadas, com maior capacidade de estabelecimento aos solos e clima locais. Além disso, frente aos custos elevados e capacidade finita de matérias primas para produção de fertilizantes fosfatados, mais estudos são indicados para redução da adubação fosfatada pela coinoculação com esses microrganismos.

## APÊNDICE

Tabela 1A. Valores de *p* das variáveis de produção, teores nutricionais e rentabilidade da soja em campo submetida a coinoculação com linhagens de *Bacillus* e micorrizas arbuscular nos anos de 2020 e 2021.

Ano	P valor							
	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021
	Rendimento		Peso de 1000 grãos		Vagens		Grãos	
<b>Biológico (B)</b>	0,0390	0,0026	0,0008	0,6073	0,0071	0,0011	0,0034	0,0456
<b>Adubação (A)</b>	0,3431	0,0000	0,6905	0,0166	0,0000	0,5183	0,0000	0,9181
<b>B x A</b>	0,0332	0,1540	0,3419	0,7523	0,9214	0,5170	0,5824	0,7445
<b>Bloco</b>	0,2247	0,1475	0,6222	0,9394	0,2258	0,0320	0,0925	0,0527
<b>CV (%)</b>	7,05	6,39	5,18	5,45	6,36	8,47	5,92	10,29
	Grãos/vagem		Ramos		AP		AIPV	
<b>Biológico (B)</b>	0,6066	0,0215	0,1390	0,3068	0,9445	0,9396	0,0001	0,7772
<b>Adubação (A)</b>	0,0591	0,5702	0,1176	0,5020	0,0000	0,0057	0,0295	0,0439
<b>B x A</b>	0,8453	0,9361	0,2219	0,0237	0,0033	0,0362	0,0015	0,3868
<b>Bloco</b>	0,9786	0,2009	0,6318	0,2469	0,0255	0,8829	0,8017	0,9661
<b>CV (%)</b>	6,27	3,21	14,20	5,15	6,17	8,48	11,79	8,92
	N		P		K		Ca	
<b>Biológico (B)</b>	0,1196	0,6128	0,0357	0,2599	0,0001	0,7649	0,1427	0,1397
<b>Adubação (A)</b>	0,0796	0,2085	0,5090	0,0002	0,7122	0,1797	0,7138	0,1046
<b>B x A</b>	0,6509	0,9233	0,1071	0,6287	0,0849	0,4737	0,9452	0,3122
<b>Bloco</b>	0,6862	0,1727	0,7445	0,0167	0,7686	0,5134	0,2252	0,0001
<b>CV (%)</b>	12,04	10,95	11,26	7,28	6,14	12,54	14,92	6,59
	Mg		S		B		Cu	
<b>Biológico (B)</b>	0,0540	0,0029	0,0586	0,2718	0,0066	0,4187	0,0001	0,3819
<b>Adubação (A)</b>	0,8460	0,0074	0,4455	0,0915	0,4225	0,6519	0,2170	0,8463
<b>B x A</b>	0,7094	0,0856	0,9424	0,7542	0,7310	0,0734	0,1294	0,8102
<b>Bloco</b>	0,7174	0,0056	0,1661	0,9667	0,5937	0,0409	0,0239	0,7644
<b>CV (%)</b>	8,60	4,76	14,16	8,74	8,56	4,65	18,39	33,85
	Fe		Mn		Zn		Mo	
<b>Biológico (B)</b>	0,0041	0,0080	0,0008	0,0011	0,9782	0,3989	0,0002	0,0010
<b>Adubação (A)</b>	0,0449	0,3435	0,0001	0,0000	0,2371	0,5309	0,0001	0,3926
<b>B x A</b>	0,2903	0,3608	0,0001	0,0000	0,3093	0,9285	0,0001	0,8404
<b>Bloco</b>	0,1819	0,5524	0,1184	0,3219	0,3272	0,6238	0,2678	0,3828
<b>CV (%)</b>	2,27	19,19	2,79	5,76	21,97	12,73	30,33	23,46
	RB		LL		IL			
<b>Biológico (B)</b>	0,0390	0,0006	0,1072	0,0017	0,4743	0,0053		
<b>Adubação (A)</b>	0,3431	0,0000	0,6933	0,0002	0,0035	0,0307		
<b>B x A</b>	0,0332	0,2130	0,0332	0,2130	0,0190	0,1707		
<b>Bloco</b>	0,2247	0,0460	0,2247	0,0460	0,2522	0,0390		
<b>CV (%)</b>	7,05	5,53	11,01	8,43	3,37	2,49		

AP: altura de plantas; AIPV: altura de inserção da primeira vagem; RB: renda bruta; LL: lucro líquido; IL: índice de lucratividade.

Tabela 2A. Valores de  $p$  das variáveis de crescimento da soja submetida a coinoculação com linhagens de *Bacillus* e micorrizas arbuscular em casa de vegetação.

<b>Variável</b>	<b>P-valor</b>	<b>CV (%)</b>
Massa de raízes	0,1219	14,39
Índice SPAD	0,1140	3,11
Nódulos	0,9100	26,52
Massa de nódulos	0,3058	29,24
Volume de raízes	0,0063	11,56
Massa seca da parte aérea	0,0724	27,18



Tabela 3A. Valores de *p* das variáveis de produção, teores nutricionais e rentabilidade de soja submetida à coinoculação com microrganismos benéficos isolados da Amazônia nos anos de 2020 e 2021.

Ano	P valor							
	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021
	Rendimento		Peso de 1000 grãos		Vagens		Grãos	
<b>Biológico (B)</b>	0,0001	0,0028	0,8757	0,8233	0,0346	0,0126	0,1407	0,0628
<b>Adubação (A)</b>	0,0029	0,0014	0,9975	0,0039	0,8382	0,0099	0,0109	0,0090
<b>B x A</b>	0,0805	0,7372	0,6761	0,1278	0,0001	0,2618	0,0004	0,3320
<b>Bloco</b>	0,0001	0,0147	0,7847	0,7983	0,8973	0,3171	0,3859	0,3049
<b>CV (%)</b>	4,09	6,19	5,49	3,59	7,17	8,96	7,45	9,86
	Grãos/vagem		Ramos		AP		AIPV	
<b>Biológico (B)</b>	0,0025	0,0769	0,6251	0,0177	0,0010	0,0346	0,0103	0,0475
<b>Adubação (A)</b>	0,0007	0,2412	0,9975	0,0119	0,0001	0,0003	0,4855	0,4553
<b>B x A</b>	0,0150	0,7505	0,2404	0,1629	0,0028	0,2138	0,0016	0,2421
<b>Bloco</b>	0,3726	0,2362	0,8583	0,3270	0,2234	0,9497	0,5921	0,2660
<b>CV (%)</b>	4,20	2,73	14,86	7,14	7,39	5,49	14,98	6,96
	N		P		K		Ca	
<b>Biológico (B)</b>	0,2246	0,9284	0,2318	0,7682	0,7916	0,1085	0,5058	0,8736
<b>Adubação (A)</b>	0,9311	0,4669	0,0545	0,0066	0,1508	0,7665	0,8435	0,0901
<b>B x A</b>	0,2978	0,3120	0,3676	0,7785	0,6002	0,3986	0,9867	0,7587
<b>Bloco</b>	0,0015	0,5663	0,0428	0,0253	0,3994	0,5217	0,0007	0,0145
<b>CV (%)</b>	5,45	9,10	7,72	8,87	10,61	8,54	9,31	9,13
	Mg		S		B		Cu	
<b>Biológico (B)</b>	0,4080	0,8520	0,1328	0,7912	0,2086	0,8798	0,6027	0,9648
<b>Adubação (A)</b>	0,1043	0,0003	0,5081	0,9975	0,9785	0,6004	0,2638	0,0699
<b>B x A</b>	0,8163	0,6918	0,9367	0,4207	0,8831	0,1196	0,3766	0,1324
<b>Bloco</b>	0,2200	0,0016	0,0046	0,2975	0,0013	0,2372	0,0026	0,5872
<b>CV (%)</b>	7,67	4,06	7,38	2,72	4,50	4,77	16,48	4,75
	Fe		Mn		Zn		Mo	
<b>Biológico (B)</b>	0,7898	0,0067	0,1360	0,9317	0,1702	0,8824	0,8135	0,5443
<b>Adubação (A)</b>	0,7621	0,2331	0,3827	0,1950	0,7826	0,4864	0,4829	0,4072
<b>B x A</b>	0,7608	0,6898	0,1933	0,6376	0,5128	0,7160	0,1936	0,8870
<b>Bloco</b>	0,4105	0,0899	0,0246	0,6389	0,1529	0,2792	0,4017	0,4914
<b>CV (%)</b>	19,62	17,10	15,69	29,06	16,78	20,25	62,34	64,48
	RB		LL		IL			
<b>Biológico (B)</b>	0,0001	0,0028	0,0001	0,0042	0,0001	0,0075		
<b>Adubação (A)</b>	0,0029	0,0014	0,2448	0,0168	0,0015	0,6334		
<b>B x A</b>	0,0805	0,7372	0,0805	0,7404	0,0332	0,7893		
<b>Bloco</b>	0,0001	0,0147	0,0001	0,0147	0,0001	0,0090		
<b>CV (%)</b>	4,09	6,20	6,27	9,52	1,82	3,01		

AP: altura de plantas; AIPV: altura de inserção da primeira vagem; RB: renda bruta; LL: lucro líquido; IL: índice de lucratividade.

Tabela 4A. Valores de *p* das variáveis de produção e conteúdo nutricional de soja submetida à coinoculação com microrganismos benéficos isolados da Amazônia em casa de vegetação.

	<i>p</i> -valor				
	<b>AP</b>	<b>SPAD</b>	<b>Área foliar</b>	<b>MSPA</b>	<b>VR</b>
<b>Biológico (B)</b>	0,5466	0,9808	0,7332	0,5728	0,0007
<b>Adubação (A)</b>	0,0000	0,0031	0,0286	0,0001	0,0000
<b>B x A</b>	0,5069	0,4863	0,9108	0,7004	0,5296
<b>CV(%)</b>	9,10	5,90	18,60	17,40	9,70
	<b>MSR</b>	<b>Nódulos</b>	<b>MSN</b>	<b>N</b>	<b>P</b>
<b>Biológico (B)</b>	0,4415	0,6950	0,9829	0,2737	0,3283
<b>Adubação (A)</b>	0,0000	0,0095	0,0392	0,0023	0,0017
<b>B x A</b>	0,9076	0,9805	0,9285	0,9951	0,9528
<b>CV(%)</b>	14,41	21,40	25,80	18,68	22,65
	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>S</b>	<b>B</b>
<b>Biológico (B)</b>	0,1636	0,3264	0,5819	0,2539	0,1674
<b>Adubação (A)</b>	0,0001	0,0004	0,0011	0,0008	0,0010
<b>B x A</b>	0,8073	0,9231	0,8878	0,9318	0,6969
<b>CV(%)</b>	15,03	17,88	19,15	19,45	0,28
	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>	
<b>Biológico (B)</b>	0,4132	0,0698	0,6888	0,5143	
<b>Adubação (A)</b>	0,4324	0,2454	0,0629	0,0304	
<b>B x A</b>	0,9502	0,5939	0,7029	0,7834	
<b>CV(%)</b>	0,14	0,66	0,29	0,20	

AP: altura de plantas; MSPA: massa seca da parte aérea; VR: volume radicular; MSR: massa seca das raízes; MSN: massa seca de nódulos.

Tabela 5A. Valores de *p* das variáveis de produção, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e arquitetura do sistema radicular de soja submetida à coinoculação com microrganismos benéficos isolados da Amazônia em solo incorporado com lama vermelha.

	<i>p</i> -valor				
	AP	Área foliar	SPAD	MSPA	Nódulos
<b>Biológico (B)</b>	0,3452	0,8713	0,9287	0,6587	0,0338
<b>Lama vermelha (LV)</b>	0,6875	0,6916	0,0741	0,6643	0,4174
<b>B x LV</b>	0,7344	0,8103	0,8047	0,8916	0,6866
<b>CV(%)</b>	15,31	15,66	6,74	18,34	24,49
	MSN	A	E	gs	Ci
<b>Biológico (B)</b>	0,3562	0,4800	0,5289	0,1957	0,8978
<b>Lama vermelha (LV)</b>	0,5505	0,0208	0,4199	0,3755	0,0297
<b>B x LV</b>	0,5871	0,6790	0,6989	0,1387	0,9478
<b>CV(%)</b>	26,63	8,19	5,14	5,11	2,45
	WUE	F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> '	q <sub>p</sub>	ETR	Npq
<b>Biológico (B)</b>	0,8494	0,2824	0,1324	0,3478	0,1855
<b>Lama vermelha (LV)</b>	0,0273	0,7596	0,3406	0,0316	0,9017
<b>B x LV</b>	0,8957	0,8217	0,9114	0,9840	0,7581
<b>CV(%)</b>	6,97	9,62	12,32	6,00	13,69
	CR	VR	DMR	MSR	CR (<1 mm)
<b>Biológico (B)</b>	0,0001	0,0455	0,0008	0,0747	0,6198
<b>Lama vermelha (LV)</b>	0,1042	0,0306	0,8779	0,3053	0,2071
<b>B x LV</b>	0,0348	0,3718	0,0079	0,4282	0,0034
<b>CV(%)</b>	19,54	21,53	29,91	20,71	7,40
	CR (1-2 mm)	CR (>2 mm)	VR (<1 mm)	VR (1-2 mm)	VR (>2 mm)
<b>Biológico (B)</b>	0,4686	0,9487	0,6923	0,4822	0,9852
<b>Lama vermelha (LV)</b>	0,2751	0,3053	0,1533	0,8472	0,3672
<b>B x LV</b>	0,0107	0,0423	0,0106	0,1503	0,0458
<b>CV(%)</b>	11,19	34,75	19,38	9,85	31,73

AP: altura de plantas; MSPA: massa seca da parte aérea; MSN: massa seca de nódulos; A: fotossíntese; gs: condutância estomática; Ci: CO<sub>2</sub> intercelular; WUE: eficiência do uso da água; F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>' ; q<sub>p</sub> ; ETR: ; Npq: ; CR: comprimento de raízes; VR: volume radicular; DMR: diâmetro médio da raiz MSR: massa seca das raízes; CR (<1 mm): comprimento de raízes finas; CR (1-2 mm): comprimento de raízes médias; CR (>2 mm): comprimento de raízes grossas; VR (<1 mm): volume de raízes finas; VR (1-2 mm): volume de raízes médias; VR (>2 mm): volume de raízes grossas.

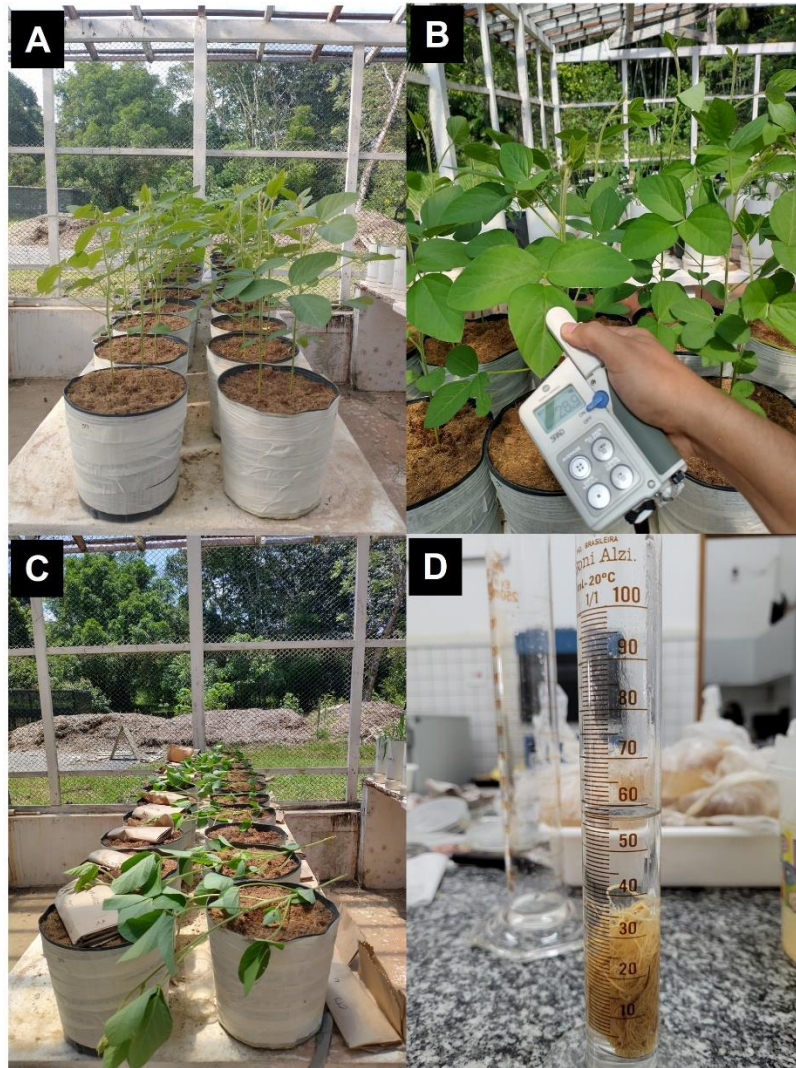


Figura A1, Plantas cultivadas em vasos em casa de vegetação (A), leitura de clorofila com SPAD (B), corte de plantas no estágio fenológico V5 (C) e determinação do volume da raiz da planta (D).



Figura A2. Aplicação de microrganismos no tanque de aplicação da máquina de semeadura (A), aplicação da solução com microrganismos no sulco de semeadura (B), início (C) e final (D) da semeadura de soja coinoculada.

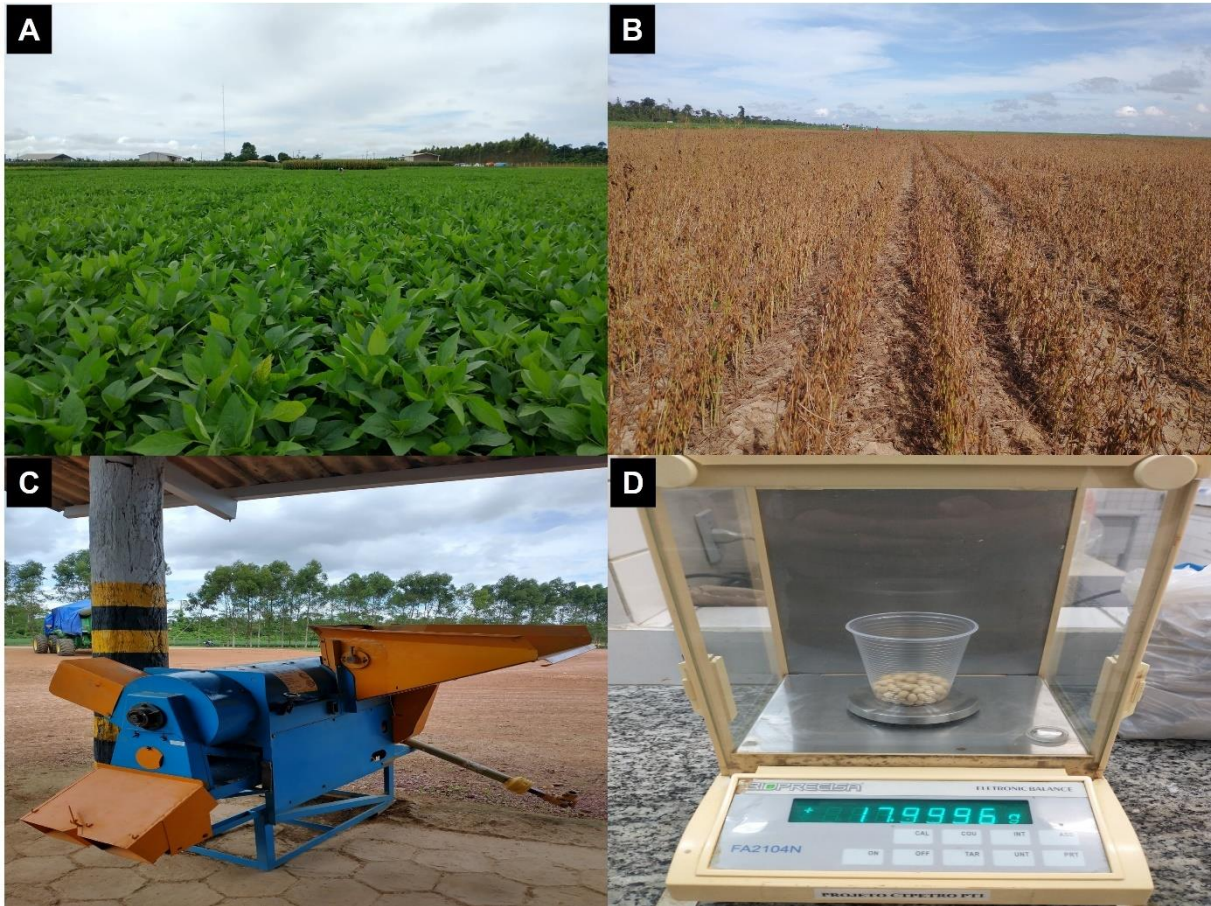


Figura A3. Plantas no campo experimental durante a coleta para diagnóstico foliar (A), plantas de soja no momento da colheita (B), máquina usada para debulhar a soja (C) e pesagem de 100 grãos (D).

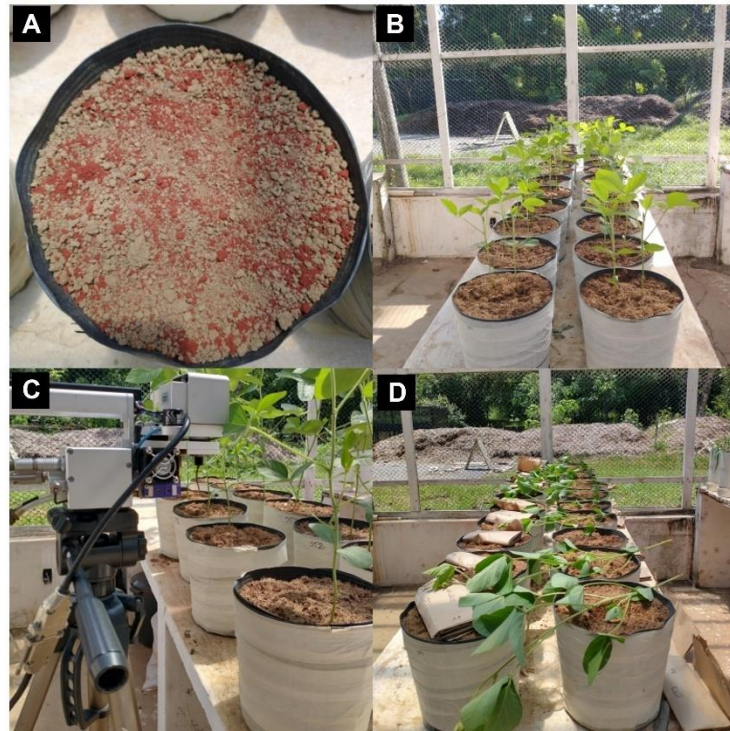


Figura A4. aplicação e distribuição da lama vermelha no solo (a), plantas do experimento em estágio V3 (b), avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a (c) e finalização do experimento e corte das plantas.



Figura A5. Parte aérea de plantas de soja coinoculadas com microrganismos isolados da Amazônia em solo com (+LV) e sem (-LV) lama vermelha.



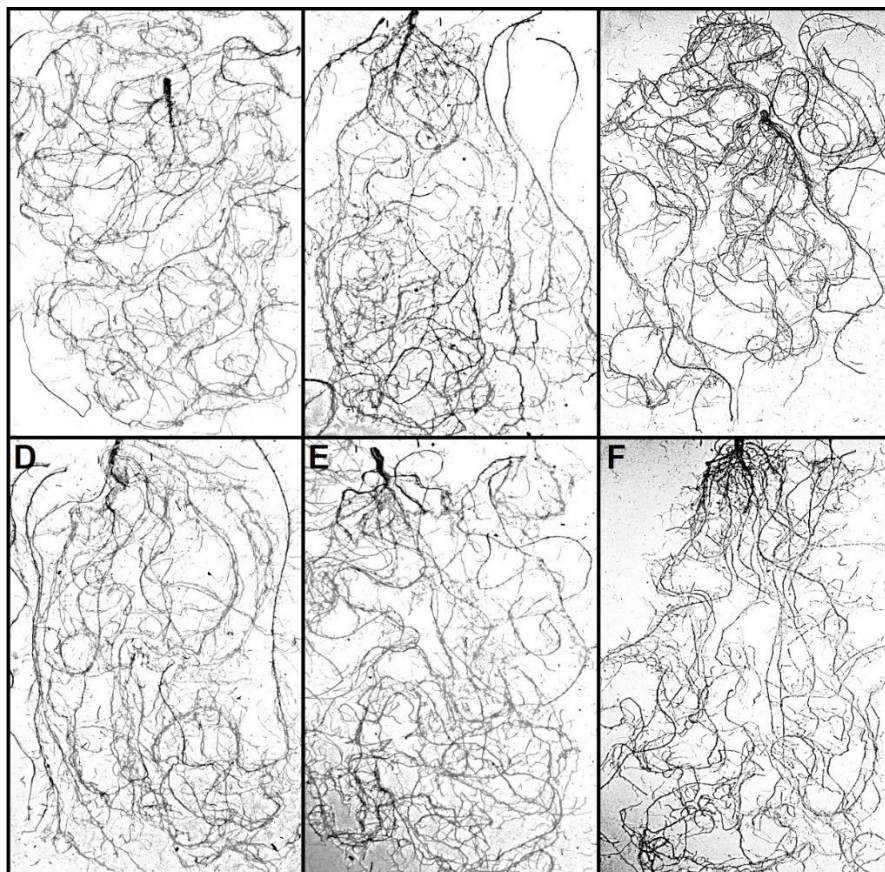


Figura A6. Fotografia das raízes de plantas submetidas à inoculação com microrganismos isolados da Amazônia em solo sem lama vermelha (a, b, c) e com a aplicação de lama vermelha (d, e e f) respectivamente para padrão, *Trichoderma* e *Bacillus*.

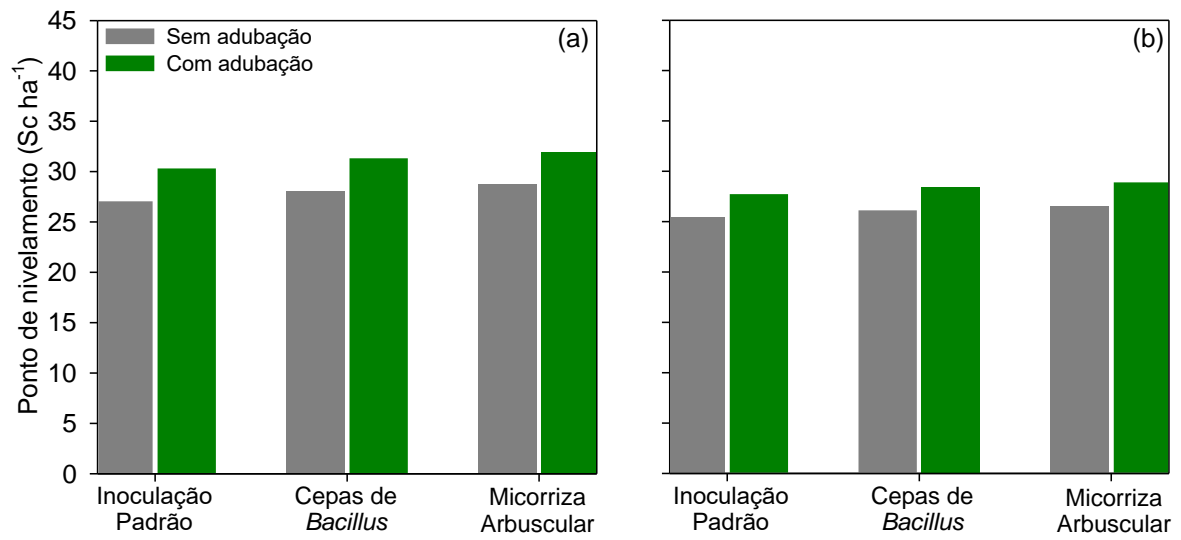


Figura A7. Ponto de nivelamento de soja coinoculada com linhagens de *Bacillus* e micorriza arbuscular nos anos de 2020 (a) e 2021 (b).

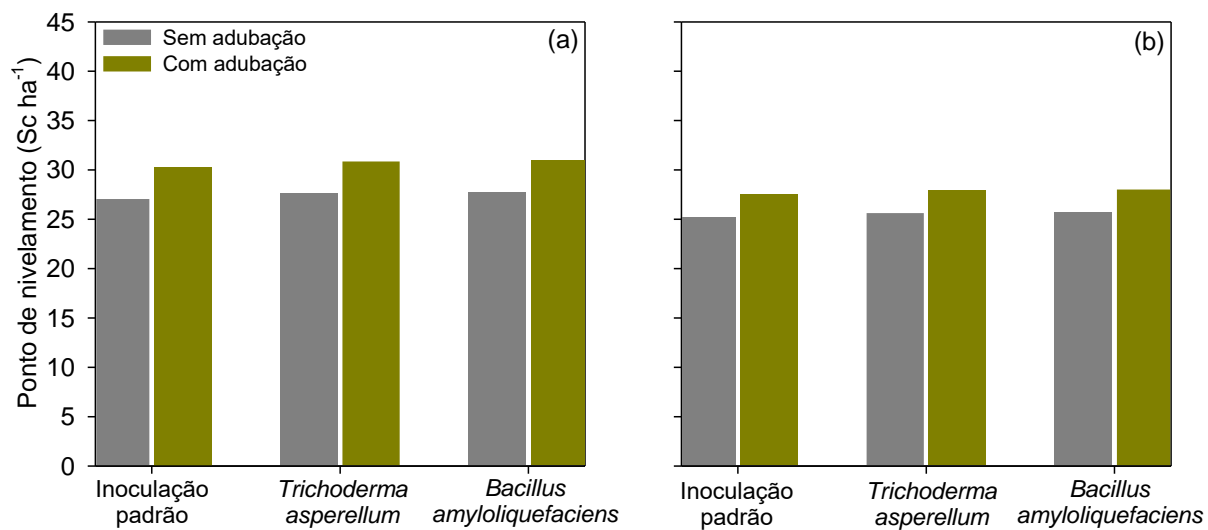


Figura A7. Ponto de nivelamento de soja coinoculada com linhagens de *Bacillus* e micorriza arbuscular nos anos de 2020 (a) e 2021 (b).