



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FITOTECNIA

**SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL NO DESENVOLVIMENTO E
PRODUTIVIDADE DO MILHO (*Zea mays* L.)**

ELISMAR PEREIRA DE OLIVEIRA

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA – BRASIL
2024

ELISMAR PEREIRA DE OLIVEIRA

**SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL NO DESENVOLVIMENTO E
PRODUTIVIDADE DO MILHO (*Zea mays* L.)**

Tese apresentada à Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração em
Fitotecnia, para obtenção de título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Lopes Leal

Coorientadora: Profa. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

VITÓRIA DA CONQUISTA

BAHIA – BRASIL

2024

O47s

Oliveira, Elismar Pereira de.

Substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal no desenvolvimento e produtividade do milho. / Elismar Pereira de Oliveira, 2024.

127f.: il.

Orientador (a): Dra. Patrícia Lopes Leal

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia,
Programa

de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia.
Vitória da Conquista, 2024.

Inclui referência F. 82 - 84.

1. *Achromobacter spanius*. 2. *Azospirillum brasiliense*. 3. *Bacillus proteolyticus*.

4. Fixação Biológica de Nitrogênio. 5. Manejo sustentável. 6. Promoção de crescimento. I. Leal, Patrícia Lopes. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós- Graduação em Agronomia. III. T.

CDD. 633.159

Catálogo na fonte: Juliana Teixeira de Assunção – CRB 5/1890

UESB - Campus Vitória da Conquista – Ba.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Área de Concentração em Fitotecnia

Campus de Vitória da Conquista, BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “Efeito Do Uso De Substâncias Húmicas E Bactérias Promotoras De Crescimento Vegetal No Desenvolvimento E Produtividade Do Milho (*Zea Mays L.*)”.

AUTOR (A): Elismar Pereira de Oliveira

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela seguinte Banca Examinadora:

Patrícia Lopes Leal, D.Sc. (UESB)



Documento assinado digitalmente

PATRICIA LOPES LEAL

Data: 05/07/2024 15:04:01-0300

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



Documento assinado digitalmente

RAYKA KRISTIAN ALVES SANTOS

Data: 10/07/2024 13:32:53-0300

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

Rayka Kristian Alves Santos, D.Sc. (UESB)



Documento assinado digitalmente

MARILIA ALVES BRITO PINTO

Data: 08/07/2024 10:07:18-0300

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

Marília Alves Brito Pinto, D.Sc. (UESB)



Documento assinado digitalmente

JOICE ANDRADE BONFIM

Data: 08/07/2024 09:37:51-0300

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

Joice Andrade Bonfim, D.Sc. (IFBAIANO)



Documento assinado digitalmente

ELAINE MARTINS DA COSTA

Data: 09/07/2024 15:38:49-0300

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

Elaine Martins da Costa, D.Sc. (UFPI)

Data de realização: 05 de Julho de 2024.

Estrada do Bem Querer, Km 4, CEP 45031-900, Caixa Postal 95, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil
Telefone: (77) 3425-9383, e- mail: ppgagronomia@uesb.edu.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu refúgio e fonte de força diante das dificuldades e desafios; principalmente após passar por perdas de entes queridos e situação delicada de saúde, o Senhor segurou a minha mão e permitiu a concretização dessa etapa tão importante em minha vida. GRATIDÃO!

Aos meus pais, Valdevino e Maria de Fátima, pelas mãos amorosas que cuidaram de mim em todos os momentos que, por meio do exemplo, ensinou-me os verdadeiros valores da vida: a importância da educação, a nobreza do trabalho árduo e a virtude do respeito; e aos meus irmãos, pelo apoio, confiança e incentivo concedidos.

A minha orientadora Dra. Patrícia Leal, pelos ensinamentos e contribuições para o meu crescimento científico, intelectual e profissional.

A minha coorientadora Dra. Rafaela Nóbrega, pela disponibilidade, por compartilhar tantos conhecimentos; e pelas contribuições, tanto para a realização dos trabalhos, como para minha formação profissional.

As minhas grandes amigas, colegas de doutorado e companheiras de todos os momentos, Zilda Malheiros e Priscila Miranda, por sempre estarem comigo, me apoiando, dando suporte técnico e científico na realização das pesquisas, pelos conselhos e puxões de orelha, quando necessário; e claro, pelos bons “goles” e boas gargalhadas de sempre. Vocês foram o meu combustível em meio às dificuldades e tornou essa jornada mais tênue. Essa conquista também é de vocês.

A minha amiga e colega de doutorado, Poliana Prates, que nesse período foi como uma irmã para mim. Muito obrigado pelas conversas, conselhos, pela ajuda em todos os momentos e por se preocupar comigo. Aprecio demais sua amizade e espero contar com ela sempre.

Aos meus amigos Manoel e Robson França, pelo apoio e disponibilidade de sempre em ajudar, pelos incentivos e trocas de “figurinhas”.

Aos meus grandes amigos e irmãos que a vida me deu, Felipe e Rogério, gratidão por existirem. Ao longo dessa jornada, tive a imensa sorte de ter vocês presentes em minha vida. Vocês estiveram ao meu lado em todos os momentos, compartilhando alegrias, superando desafios e oferecendo um apoio incondicional. Suas palavras de incentivo, conselhos sábios e presença constante foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos, Rafael, Léo e Franklim, muito obrigado pelo carinho, apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amigos do Grupo “Topa nada”: Maída, Paulo Eduardo, Paulo Monroe, Sarah, Rayka, Danilo, Fabrício, Zilda e Matheus Manduca; e aos meus amigos do grupo “Encontros”: Zilda, Priscila, Robson, Jadson, Iasmin, Leozinho e Binho, os quais eu considero muito; vocês tornaram meus dias mais leves, cada sorriso, cada encontro e os diversos momentos de descontração compartilhados comigo foram combustíveis para eu encarar os desafios e as dificuldades com mais serenidade. Gratidão amigos, vocês foram fundamentais nessa etapa.

Todos os amigos que fiz durante este período e que aqui não foram mencionados, sintam-se agraciados com minha imensa gratidão. A amizade de vocês foi essencial para deixar essa jornada mais leve e possível.

Ao pessoal do campo Agropecuário da UESB, pelo apoio e serviços prestados, em especial, a Dui e Sr. Manoel, pela disponibilidade e agilidade na obtenção de área e

insumos para a realização dos meus experimentos e por auxiliar nos tratos culturais e condução dos experimentos.

Aos colegas e amigos do setor de solos, pelo apoio, acolhimento, momentos e risadas compartilhadas. Vocês tornaram meus dias mais leves. Não poderia deixar de destacar meu agradecimento, em especial, a minha grande amiga Ione, uma grande irmã que me acolheu, cuidou de mim, se preocupou, deu bons conselhos, mas, acima de tudo, me presenteou todos os dias com sua amizade, carinho e grandes gargalhadas.

Ao professor Divino, pela concessão do laboratório de Microbiologia do Solo para a realização de parte dos trabalhos, pelos conhecimentos compartilhados e pelo suporte prestado.

À Biofábrica, pela disponibilidade de equipamentos, casa de vegetação e apoio, especialmente, ao prof. Alcebíades Rebouças, que sempre esteve à disposição.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Muito obrigado aos membros do Programa de Pós-graduação em Agronomia, professores e colaboradores, pelo suporte e conhecimentos compartilhados, em especial, à ex-coordenadora do programa, professora Dra. Maria Aparecida Castellani e ao coordenador Prof. Dr. Quelmo Novais.

Enfim, a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a materialização deste estudo, deixo aqui o meu muito obrigado.

Muito obrigado a todos.

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, E. P. **SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL NO DESENVOLVIMENTO E PRODUTIVIDADE DO MILHO** (*Zea mays* L.). Vitória da Conquista – BA: UESB, 2024. 127 f. (Tese – Doutorado em Agronomia: Área de concentração em Fitotecnia)*

O milho é uma cultura de grande importância econômica e social para o Brasil. Por ser rico em carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais, apresenta-se como importante fonte para alimentação humana e animal. No entanto, são plantas que, para atingirem uma boa produção, exigem grandes quantidades de fertilizantes químicos, e isso tem originado sérios problemas ambientais, afetando negativamente diversas funções ecológicas do solo e elevando os custos de produção. Mediante o exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição e interação entre substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal sobre a promoção de crescimento vegetal do milho e sua produtividade, sob condições de casa de vegetação e de campo, na região sudoeste da Bahia, Brasil. Foram realizados três experimentos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - *Campus* de Vitória da Conquista. O primeiro experimento foi conduzido em casa de vegetação e avaliou-se os efeitos de cinco doses de substâncias húmicas e três bactérias promotoras de crescimento sobre parâmetros de emergência e crescimento das plantas de milho. O segundo e terceiro experimento foram conduzidos em campo, testando as melhores doses de substâncias húmicas obtidas no ensaio anterior e as bactérias promotoras de crescimento. No segundo experimento, avaliou-se os efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros de emergência, bioquímicos e de crescimento; enquanto no terceiro, avaliou-se o desenvolvimento, a produtividade e o estado nutricional de nitrogênio e fósforo em plantas de milho. A inoculação com *Bacillus proteolyticus* melhorou o crescimento das plantas em casa de vegetação, aliado ao elevado teor de nitrogênio foliar, clorofila total, carotenoides e taxa fotossintética. Em plantas inoculadas com *Achromobacter spanius* e estirpe comercial, a aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resultou em aumento de pigmentos fotossintéticos e crescimento das plantas em casa de vegetação. O uso de substâncias húmicas melhorou a porcentagem de emergência e os índices de velocidade de emergência das plântulas no campo. Plantas inoculadas com *Achromobacter spanius* e tratadas com 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas apresentaram maior teor de açúcares solúveis totais e redutores, respectivamente. Plantas inoculadas com *Azospirillum brasiliense* apresentaram maior teor de amido ao receber 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas. Em campo, sob inoculação com *Achromobacter spanius*, a aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resulta em maior massa seca da parte aérea e diâmetro do colmo das plantas; e nas inoculadas com *Bacillus proteolyticus*, a aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas proporciona maior peso de mil grãos. Sob inoculação da estirpe comercial de *Azospirillum brasiliense*, as doses de 0,0 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resultam em maior teor de nitrogênio foliar para as plantas de milho, quando comparado à dose de 1,5 L ha⁻¹.

Palavras-chave: *Achromobacter spanius*. *Azospirillum brasiliense*. *Bacillus proteolyticus*. Fixação Biológica de Nitrogênio. Manejo sustentável. Promoção de crescimento.

* **Orientadora:** Profa. Dra. Patrícia Lopes Leal, UESB e Coorientadora: Profa. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega inserir a instituição

GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, E. P. **HUMIC SUBSTANCES AND BACTERIA THAT PROMOTE PLANT GROWTH IN THE DEVELOPMENT AND PRODUCTIVITY OF CORN** (*Zea mays* L.) Vitória da Conquista – BA: UESB, 2024. 127 p. (Thesis: Master Science in Agronomy; Area of Concentration: Crop Science).*

Corn is a crop of great economic and social importance for Brazil. Being rich in carbohydrates, proteins, vitamins, and minerals, it serves as an important source for human and animal nutrition. However, these plants require large amounts of chemical fertilizers to achieve good production, which has led to serious environmental problems, negatively affecting various ecological functions of the soil and increasing production costs. Given this context, this study aimed to evaluate the effect of the addition and interaction between humic substances and plant growth-promoting bacteria on the growth promotion of corn and its productivity, under greenhouse and field conditions in the southwestern region of Bahia, Brazil. Three experiments were conducted at the State University of Southwestern Bahia - *Campus* Vitória da Conquista. The first experiment was conducted in a greenhouse and assessed the effects of five doses of humic substances and three plant growth-promoting bacteria on parameters of emergence and growth of corn plants. The second and third experiments were conducted in the field, testing the best doses of humic substances obtained from the previous trial and the plant growth-promoting bacteria. The second experiment evaluated the effects of treatments on emergence, biochemical parameters, and growth; while the third assessed development, productivity, and nutritional status of nitrogen and phosphorus in corn plants. Inoculation with *Bacillus proteolyticus* improved plant growth in the greenhouse, coupled with high leaf nitrogen content, total chlorophyll, carotenoids, and photosynthetic rate. In plants inoculated with *Achromobacter spanius* and a commercial strain, the application of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances resulted in increased photosynthetic pigments and plant growth in the greenhouse. The use of humic substances improved the percentage of emergence and seedling emergence rate indices in the field. Plants inoculated with *Achromobacter spanius* treated with 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances showed higher total soluble sugars and reducing sugars content, respectively. Plants inoculated with *Azospirillum brasiliense* showed higher starch content when receiving 3.0 L ha⁻¹ of humic substances. In the field, under inoculation with *Achromobacter spanius*, the application of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances results in greater dry mass of the aerial part and diameter of the stem of the plants, and in those inoculated with *Bacillus proteolyticus*, the application of 1.5 L ha⁻¹ of humic substances provides greater weight of a thousand grains. Under inoculation of the commercial strain of *Azospirillum brasiliense*, the doses of 0.0 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances result in greater foliar nitrogen content for corn plants when compared to the dose of 1.5 L ha⁻¹.

Keywords: *Achromobacter spanius*. *Azospirillum Brasiliense*. *Bacillus proteolyticus*. Biological Nitrogen Fixation. Sustainable management. Growth promotion.

***Adviser:** Profa. Dra. Patrícia Lopes Leal, UESB and Coadviser: Profa. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega inserir a instituição

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Análise química e física do solo utilizado no experimento.....	10
Tabela 1.2 – Porcentagem de emergência (EM), velocidade de emergência (VE), índice de velocidade de emergência (IVE) e coeficiente de velocidade de emergência (CVE) de plantas de milho inoculadas com bactérias promotoras de crescimento isolados UFRB FA72A2-1.1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), estirpe comercial (EC) e testemunhas com nitrogênio de cobertura (TNC) e total (TNT).....	15
Tabela 1.3 - Volume de raiz, massa seca de raiz e relação raiz/parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), estirpe comercial (EC) e testemunhas nitrogênio de cobertura (TNC) e total (TNT).....	18
Tabela 1.4 - Massa seca da parte aérea (MSPA) (g planta^{-1}), número de folhas (NF planta^{-1}), fotossíntese líquida (A) ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), transpiração (E) ($\mu\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), condutância estomática (g_s) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), teor de nitrogênio foliar (N) ($\text{g kg}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), nitrogênio foliar acumulado (N ACUM) (mg planta^{-1}) e fósforo foliar acumulado (P ACUM) (mg planta^{-1}) de plantas de milho sob a inoculação de bactérias isolado UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), estirpe comercial (EC) e testemunhas com nitrogênio de cobertura (TNC) e total (TNT).....	22
Tabela 1.5 – Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson, com as suas respectivas significâncias, entre 16 variáveis morfofisiológicas da cultura do milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento vegetal e diferentes doses de substâncias húmicas.....	24
Tabela 2.1 - Análise química e física do solo da área experimental.....	38
Tabela 3.1 - Análise química e física do solo da área experimental.....	61
Tabela 3.2 - Altura da folha bandeira (AFB) e área foliar (AF) em função de diferentes doses de substâncias húmicas, inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero.....	69
Tabela 3.3 - Diâmetro de colmo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e altura de inserção da primeira espiga (APE) de plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero.....	70
Tabela 3.4 - Teor de nitrogênio foliar – N (g kg^{-1}) em plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero.....	73
Tabela 3.5 - Teor de carotenoides (CAR), teor de clorofila total (CLOR), quantidade de nitrogênio acumulado nos tecidos foliar (N ACUM), teor de fósforo foliar (P) e P acumulado nos tecidos foliar (P ACUM) em plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação	

de bactérias promotoras de crescimento vegetal e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero.....	74
Tabela 3.6 - Peso de 1000 grãos – PMG (g) de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero.....	77
Tabela 3.7 - Diâmetro de espiga (DE) comprimento de espiga (CE), número de fileiras de grãos por espiga (NFGE), número de grãos por fileiras (NGF) e produtividade estimada (PE) de plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas, inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero.....	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Altura da planta (ALT) [A], diâmetro do caule (DIAM) [B], número de folhas (NF) [C] e área foliar (AF) [D] de plantas de milho inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal isolados UFRB FA72A2-1 (_ _ _ ▲ I1), UFRB FA34C2-2 (- ● I2), estirpe comercial (---- ■ EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (■). ** significativo ($p < 0,01$), de acordo com o teste t . Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). 16
- Figura 1.2** - Massa seca da parte aérea (MSPA) [A] em função da aplicação de doses de substâncias húmicas (■) massa seca total (MST) [B] de plantas de milho em função da aplicação de doses de substâncias húmicas e inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal isolados UFRB FA72A2-1 (_ _ _ ▲ I1), UFRB FA34C2-2 (- ● I2), estirpe comercial (---- ■ EC) e testemunhas com nitrogênio de cobertura (● TNC) e total (◆ TNT). ** significativo ($p < 0,01$), de acordo com o teste t . As médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). 17
- Figura 1.3** – Fotossíntese líquida (A) de plantas de milho em função da aplicação de doses de substâncias húmicas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si (Teste Scott-Knott, $p < 0,05$). 19
- Figura 1.4** – Teor de clorofila total (CLOR) [A] e carotenoides (CAR) [B] em folhas de milho em função da aplicação de doses de substâncias húmicas e inoculação de bactérias promotoras de crescimento UFRB FA72A2-1 (_ _ _ ▲ I1), UFRB FA34C2-2 (- ● I2), estirpe comercial (---- ■ EC), testemunhas com nitrogênio de cobertura (● TNC) e total (◆ TNT). Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (Teste Scott-Knott, $p < 0,01$). ** significativo ($p < 0,01$), de acordo com teste t 20
- Figura 1.5** – Teor foliar de fósforo (P) em plantas de milho em função de doses de substâncias húmicas e inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal isolados UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), estirpe comercial (EC). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre doses de substâncias húmicas e minúsculas iguais não diferem entre bactérias (Teste Scott-Knott, $p < 0,05$). 23
- Figura 2.1** – Condições climáticas no período de condução do experimento (maio/junho de 2023). 38
- Figura 2.2** – Porcentagem de emergência (A), velocidade de emergência (B), índice de velocidade de emergência (C) e coeficiente de velocidade de emergência (D) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com *B. proteolyticus* (B1), *A. spanius* (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH). ns = não significativo e * significativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste F, para as médias do fatorial ($\bar{F}$) em relação à testemunha N (TN). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para S.H. $n =$

16).....	43
Figura 2.3 – Altura de planta (A), diâmetro de colmo (B), massa seca da parte aérea (C), carotenoides (D) e clorofila total (E) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com <i>B. proteolyticus</i> (B1), <i>A. spanius</i> (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH ns = não significativo e * significativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste F, para as médias do fatorial ($\bar{F}$) em relação à testemunha N (TN). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para S.H. $n = 16$)	44
Figura 2.4 – Açúcares solúveis totais (A), açúcares redutores (B), teor de amido (C) e prolina (D) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com <i>B. proteolyticus</i> (B1), <i>A. spanius</i> (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas. ns = não significativo e * significativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste F, para as médias do fatorial ($\bar{F}$) em relação à testemunha N (TN). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio ($n = 4$)	46
Figura 3.1 - Dados diários de temperaturas máximas e mínimas e de precipitação pluvial durante o período de condução do experimento (maio/outubro de 2023)...	60
Figura 3.2 - Altura de folha bandeira (A), área foliar (B), diâmetro de colmo (C), massa seca da parte aérea (D) e altura de inserção da primeira espiga (E) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com <i>B. proteolyticus</i> (B1), <i>A. spanius</i> (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para SH $n = 16$, para fatorial $n = 4$)	67
Figura 3.3 - Teor de carotenoides (A), clorofila total (B), teor de N foliar (C), teor de P foliar (D), N acumulado (E) e P acumulado (F) em plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com <i>B. proteolyticus</i> (B1), <i>A. spanius</i> (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para S.H. $n = 16$, para fatorial $n = 4$)	72
Figura 3.4 - Diâmetro de espiga (A), comprimento de espiga (B), número de fileiras de grãos por espiga (C) número de grãos por fileira (D), produtividade estimada (E) e peso de 1000 grãos (F) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com <i>B. proteolyticus</i> (B1), <i>A. spanius</i> (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste	

de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para SH $n = 16$, para fatorial $n = 4$)	75
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcento
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µmol	Micromol
A	Fotossíntese líquida
AF	Área foliar
AFB	Altura da folha bandeira
Al ³⁺	Alumínio
ALT	Altura de plantas
AM	Amido
ANPII	Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes
APE	Altura de inserção da primeira espiga
AR	Açúcares redutores
AST	Açúcares solúveis totais
ATPase	Adenosinatrifosfatases
B	Bactéria
BA	Bahia
BPCV	Bactérias promotoras de crescimento vegetal
Ca ²⁺	Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAR	Carotenoides
CE	Comprimento de espiga
CLOR	Clorofila total
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COT	Carbono orgânico total
CTC	Capacidade de troca de cátions
CV	Coeficiente de variação
CVE	Coeficiente de velocidade de emergência
DAE	Dias após a emergência

DC	Diâmetro do colmo
DE	Diâmetro de espigas
DIAM	Diâmetro de colmo
dm ⁻³	Decímetro cúbico
<i>E</i>	Transpiração
EC	Estirpe Comercial
EM	Emergência
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FV	Fonte de Variação
g	Gramas
GL	Graus de Liberdade
g _s	Condutância estomática
h	Hora
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O	Água
I	Isolado
IRGA	<i>Infra Red Gas Analyser</i>
IVE	Índice de velocidade de emergência
K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
Kg ha ⁻¹	Quilogramas por hectare
L	Litros
m	Metro
m%	Saturação de Alumínio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg ²⁺	Magnésio
MJm ⁻² ,	megajoule por metro quadrado
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mmol	Milimol
MO	Matéria Orgânica
MOS	Matéria orgânica do solo

MSPA	Massa Seca da Parte Aérea
MSR	Massa Seca de Raiz
MST	Massa seca total
N	Nitrogênio
N ACUM	Nitrogênio acumulado
n°	Número
N ₂	Nitrogênio gasoso
NF	Número de folhas
NFG	Número de grãos por fileira
NFGE	Número de fileiras de grãos por espigas
nm	Nanómetro
ns	Não significativo
P	Fósforo
P ACUM	Fósforo acumulado
PE	Produtividade estimada
pH	Potencial hidrogeniônico
PMG	Peso de 1000 grãos
PRO	Prolina
RPCP	Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas
R/PA	Relação parte raiz/aérea
rpm	Rotação por minuto
S	Enxofre
SB	Soma de Bases
SHs	Substâncias húmicas
T	Capacidade de troca catiônica
t	Capacidade de troca de cátions efetiva
T0	Testemunha zero
Tfsa	Terra fina seca ao ar
TN	Testemunha nitrogênio
TNC	Testemunha nitrogênio de cobertura
TNT	Testemunha nitrogênio total
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

USDA	<i>United States Department Of Agriculture</i>
V%	Saturação de base
VE	Velocidade de emergência
VR	Volume de raízes
YMA	Yeast, Manitol, Ágar

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
3. ARTIGO I	6
Substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal melhoram o desenvolvimento do milho (<i>Zea mays</i> L.)	6
Resumo	7
3.1. Introdução	7
3.2. Material e métodos	9
3.2.1. Local de desenvolvimento do experimento	9
3.2.2. Multiplicação do inóculo, preparo do inoculante e obtenção do inoculante	9
3.2.3. Atributos físicos e químicos do solo	10
3.2.4. Delineamento experimental	10
3.2.5. Plantio e adubação	11
3.2.6. Análises morfofisiológicas	12
3.2.6.1. Análises de emergência	12
3.2.6.2. Características morfológicas	12
3.2.6.3. Trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos	13
3.2.6.4. Teor foliar de nitrogênio e fósforo	13
3.2.7. Análises estatísticas	14
3.3. Resultados	14
3.4. Discussão	25
3.5. Conclusões	28
3.6. Referências	29
4. ARTIGO II	34
Bactérias promotoras de crescimento vegetal e substâncias húmicas promovem alterações bioquímicas e de emergência em plantas de milho	34
Resumo	35
4.1. Introdução	36
4.2. Material e métodos	37
4.2.1. Caracterização da área experimental	37
4.2.2. Características físicas e químicas do solo	38
4.2.3. Preparo da área experimental	39
4.2.4. Preparo do inoculante bacteriano	39
4.2.5. Delineamento experimental	39

4.2.6. Plantio e adubação	40
4.2.7. Características avaliadas da cultura do milho.....	40
4.2.8. Análises estatísticas	41
4.3. Resultados.....	42
4.5. Discussão	48
4.6. Conclusão	50
4.7. Referências	51
5. ARTIGO III.....	57
Sinergia de substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal no desenvolvimento e produtividade do milho	57
Resumo	58
5.1. Introdução.....	58
5.2. Material e métodos	60
5.2.1. Período e caracterização do local do experimento	60
5.2.2. Características físicas e químicas do solo e preparo da área	61
5.2.3. Preparo do inoculante bacteriano	61
5.2.4. Delineamento experimental.....	62
5.2.5. Plantio e adubação	62
5.2.6. Análises realizadas na cultura do milho	63
5.2.6.1. Características morfológicas.....	63
5.2.6.2. Pigmentos fotossintéticos	64
5.2.6.3. Teor foliar de nitrogênio e fósforo.....	64
5.2.6.4. Parâmetros de produção	65
5.2.7. Análises estatísticas	65
5.3. Resultados.....	65
5.4. Discussão	79
5.5. Conclusões.....	81
5.6.Referências	82
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
APÊNDICES	86

INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L) é uma monocotiledônea anual pertencente à família das *Poaceas* e nativo da América Central, que se destaca por sua grande capacidade de adaptação a diferentes condições climáticas, viabilizando seu cultivo em diversas regiões ao redor do mundo (Matos et al., 2006). No entanto, são plantas que, para atingirem uma boa produção, exigem grandes quantidades de fertilizantes químicos, sendo os nutrientes mais requisitados o nitrogênio e potássio, seguido de cálcio, magnésio e fósforo (Ribeiro, 2014).

O uso indiscriminado de fertilizantes tem originado sérios problemas ambientais, levando à degradação dos recursos naturais e afetando negativamente diversas funções ecológicas do solo (Shahzad et al., 2013). Dentre os impactos negativos, podemos destacar: a redução da biodiversidade, a capacidade do solo de sustentar a vida vegetal e animal, comprometendo a produtividade agrícola a longo prazo. Nesse contexto, a utilização de inoculantes biológicos, como as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) surge como uma opção viável para aprimorar o desempenho produtivo das plantas e reduzir a dependência de insumos agrícolas (Oliveira et al., 2015; Grady et al., 2016).

As BPCV são um grupo diversificado de bactérias que vivem associativamente nas superfícies radiculares, na rizosfera e filosfera, e nos tecidos internos de diferentes espécies vegetais, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento de plantas de interesse econômico por meio de efeitos diretos e/ou indiretos (Fan et al., 2011; Estrada et al., 2013). Os efeitos diretos são por meio da fixação do nitrogênio atmosférico, solubilização de compostos minerais, como fósforo, produção de sideróforos e hormônios vegetais, enquanto os indiretos são através do antagonismo a organismos fitopatogênicos e indução à resistência sistêmica contra doenças (Vargas et al., 2012; Arruda et al., 2013; Liu et al., 2013).

A exploração dos benefícios das BPCV ocorre, especialmente, através da adoção de práticas de inoculação das sementes com estirpes de bactérias eficientes. Embora ainda não se constitua em uma prática agrícola consolidada no Brasil para a cultura do milho, a taxa de uso de inoculantes, na safra 2022/2023, foi de 22,4% da área cultivada, cerca 8,2 milhões de doses, indicando uma tendência de avanço gradual do uso dessa biotecnologia safra a safra (Anpii, 2024).

Para a cultura do milho no Brasil, há registros de, pelo menos, 65 inoculantes à base de BPCV, sendo, compostos, especialmente, pelas espécies: *Azospirillum brasilense* (n= 41); espécies de *Bacillus* isoladamente ou em consórcio, a exemplo de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *B. aryabhattai*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefacies* e *B. pumilus* (n= 15); *Pseudomonas fluorescens* (n= 4); *A. brasiliense* + *Bradyrhizobium japonicum* (n= 2); *A. brasiliense* + *P. fluorescens* (n= 2); *Methylobacterium symbioticum* (n= 1) (Mapa, 2024).

Embora as estirpes atualmente recomendadas, ou em fase de recomendação, demonstrem capacidade de aumentar a produção de milho na região semiárida brasileira, a prospecção e seleção de estirpes autóctones podem contribuir para alcançar incrementos ainda maiores na produtividade (Cavalcanti, 2016). Isso se deve à possibilidade de melhor adaptabilidade e estabilidade dessas estirpes às condições específicas da região, tais como solos com condutividade elétrica elevada, altas temperaturas e baixa precipitação (Cavalcanti, 2016).

Ainda sobre abordagens tecnológicas sustentáveis aplicáveis ao uso do solo, cresce o interesse pela utilização de substâncias húmicas (SH). Estas constituem a fração coloidal da matéria orgânica do solo (MOS) que, por sua vez, representa o maior reservatório de carbono da superfície terrestre, podendo variar em decorrência de práticas de manejo (Dick et al., 2009). Na maioria dos solos brasileiros, o teor de MOS pode variar de 5 a 50 g.kg⁻¹ nos horizontes minerais (Moreira e Siqueira, 2006). Isso realça a importância da adição e conservação da MOS, especialmente, em solos bastantes intemperizados como, por exemplo, do semiárido do Nordeste brasileiro, em que o baixo teor de MOS está associado ao baixo pH do solo, devido à presença de óxidos de alumínio (Primo et al., 2011).

As SH compõem, aproximadamente 70 a 80% da MOS, na maioria dos solos, e são compostas pelas frações ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina, determinadas com base na solubilidade em meio ácido ou alcalino (Baldotto e Baldotto, 2014). Estudos demonstram que as SH proporcionam o aumento da microbiota do solo, incorpora matéria orgânica, melhora a estrutura física e química do solo, favorecendo o crescimento radicular e ciclagem de nutrientes, promovendo, assim, o crescimento vegetal e o aumento da produtividade e da qualidade das culturas (Canellas e Santos, 2005; Caron et al., 2015).

No entanto, a escolha e a aplicação das SH devem ser criteriosas, de acordo com a cultura a ser manejada, no tipo de solo de cultivo, e dos nutrientes e defensivos agrícolas a serem utilizados (Gomes et al., 2016). Além disso, é importante determinar em que

características morfológicas das plantas se desejam incrementos, quais são as doses de maior eficiência dos ácidos húmicos, e de que fonte os ácidos húmicos devem ser extraídos, a fim de assegurar o sucesso do uso deste bioestimulante (Baldotto e Baldotto, 2014).

Diante do exposto, quanto aos benefícios das BPCV e das SH sobre a fertilidade do solo e, conseqüentemente, na promoção do desenvolvimento vegetal, desponta o interesse pelo melhor entendimento da sinergia entre eles e com a cultura agrícola. A partir dessa elucidação, é possível traçar novas rotas biotecnológicas que sejam economicamente vantajosas e ambientalmente sustentáveis, para serem empregadas em condições que necessitem melhorar a fertilidade do solo.

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição e interação entre SH e BPCV sobre a promoção de crescimento vegetal do milho e sua produtividade, sob condições de casa de vegetação e de campo, na região sudoeste da Bahia, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes - ANPII. Estatísticas. Disponível em: <https://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em fevereiro de 2024.
- Arruda, L.; Beneduzi, A.; Martins A.; Lisboa, B.; Lopes, C.; Bertolo, F.; Vargas, L.K.; Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.09.001>
- Baldotto, M.A.; Baldotto, L.E.B. Ácidos Húmicos. **Revista Ceres**, v.61, p.856-881, 2014. <https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000011>
- Canellas, L.P.; Santos, G.A. **HUMOSFERA, tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. UENF, 2005. <http://ceiba.agro.uba.ar/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=18651>
- Caron, V.C.; Graças, J.P.; Castro, P.R.C. **Condicionadores do solo: ácidos húmicos e fúlvicos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2015. <https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/publicacoes-a-venda/pdf/SPR58.pdf>
- Cavalcanti, M.I.P. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento em milho cultivado no semiárido obtidas por diferentes estratégias de isolamento**. 2016.
- Dick, D.; P.; Novotny, E.; H., Dieckow, J.; Bayer, C. Química da matéria orgânica do solo. In: Melo, V. de F.; Alleoni, L. R. F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo: Parte II - aplicações**. Viçosa, MG: SBCS, 2009, p. 1-67.
- Estrada, G.; Baldani, V.L.D; Oliveira, D.M; Urquiaga, S; Baldani, J.I Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v. 369, n.1-2, p. 115-129, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>
- Fan. B.; Chen, XH.; Budiharjo, A.; Bleiss, W.; Vater, J.; Borriss, R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 4, p. 303-311, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.022>
- Gomes, E., Silva, U.D.C., Paiva, C., Lana, U.D.P., Marriel, I., dos Santos, V.L. Microrganismos promotores do crescimento de plantas. **Embrapa Milho e Sorgo- Documentos (INFOTECA-E)**, 2016. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1063799>
- Grady, E.N.; MacDonald, J.; Liu, L.; Richman, A.; Yuan, Z.C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. **Microbial Cell Factories**, v. 1, n. 203, p. 1-15, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>

Liu, F.; Xing, S.; Ma, H.; Du, Z.; Ma, B. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4617-4625, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4255-1>

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. Programa Bioinsumos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: Aplicativo. Acesso em junho de 2024.

Matos, M.J.L.F.; Tavares, S.A.; Santos, F.F. Dos; Melo, M.F. de; Lana, M.M. Milho verde. 2006. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/laborato/pos_colheita/dicas/pagina_milho_verde.html. Acesso em fevereiro de 2024.

Moreira, F.M.S. Siqueira, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

Oliveira, A.L.M.; Lima, K.; Barbosa, M.; Sanos, O. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56–77, 2014. <https://doi.org/10.5433/2316-5200.2014v3n1p56>

Primo, D.C; Menezes, R.C; Silva, T.O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia plena**, v. 7, n. 5, 2011. <https://scientiaplena.org.br/sp/article/view/342>

Ribeiro, S.S. Cultura do milho no Brasil. **Revista Científica Semana Acadêmica**, v. 49, n. 1, p. 1-13, 2014.

Shahzad, S.M.; Arif, M.S.; Riaz, M.; Iqbal, Z.; Ashraf, M. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 57, p. 27-34, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.04.002>

Vargas, L.; de Carvalho, T.L. G.; Ferreira, P.C.G.; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I.; Hemerly, A.S. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1274-8>

ARTIGO I

Substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal melhoram o desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.)*

* **Situação:** Publicado

Substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal melhoram o desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.)

Resumo - Este estudo avaliou o comportamento morfofisiológico e o estado nutricional de plantas de milho sob utilização de diferentes doses de substâncias húmicas, bactérias promotoras de crescimento vegetal e adubação convencional. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se diferentes concentrações de substâncias húmicas (0,0, 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 L ha⁻¹), diferentes bactérias promotoras de crescimento (isolado UFRB FA72A2-1 + suplementação de nitrogênio, UFRB FA34C2-2 + suplementação de nitrogênio e estirpe comercial + suplementação de nitrogênio), além de dois tratamentos-controle (nitrogênio total e cobertura), totalizando 68 parcelas experimentais. A avaliação contemplou parâmetros como porcentagem de emergência, velocidade de emergência, índice de velocidade de emergência e coeficiente de velocidade de emergência, observados durante a fase de emergência das plântulas. Posteriormente, a avaliação estendeu-se à altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, área foliar, biomassa da parte aérea, biomassa radicular, massa seca total, volume de raiz, fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração, bem como quantificação do teor de clorofila total, carotenoides, nitrogênio e fósforo. Plantas de milho inoculadas com o isolado UFRB BA72A2.1 apresentaram maior crescimento, associado ao maior teor foliar de N, maiores teores de pigmentos fotossintéticos e fotossíntese líquida. Para UFRB FA342-2 e estirpe comercial, a aplicação combinada com 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas elevou a concentração de pigmentos fotossintéticos e resultou em aumento da altura e diâmetro do colmo. Além disso, essa combinação contribuiu para o aumento da massa seca total, no caso da estirpe comercial. Nessas doses, a aplicação isolada de substâncias húmicas resultou em aumento significativos na fotossíntese líquida e massa seca de parte aérea das plantas de milho. Este estudo ressalta o potencial sinérgico entre bactérias promotoras de crescimento vegetal e substâncias húmicas na estimulação do crescimento de plantas de milho. O efeito da aplicação combinada de substâncias húmicas com bactérias promotoras de crescimento vegetal depende tanto da dose da substância húmica, quanto das espécies de bactérias envolvidas.

Palavras-chave: Ácidos fúlvicos; ácidos húmicos; milho; bactérias diazotróficas.

1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é, atualmente, uma das *commodities* agrícolas mais importantes no cenário econômico nacional, visto que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial do grão, com produção de 102 milhões de toneladas na safra 2020/2021 (USDA, 2021), sendo responsável pela geração de emprego e renda para o país. Suas múltiplas formas de utilização, que vai do consumo *in natura* até diversos fins industriais, tanto para humanos quanto para animais (Demétrio et al., 2008; Duarte et al., 2011), têm uma grande importância econômica e social, para o agronegócio e, também, para a agricultura familiar.

A produção brasileira de milho, durante os últimos 40 anos, teve um aumento espetacular. Saindo de menos de 20 milhões de toneladas, na safra 1976/77 (CONAB,

2020), cresceu a ponto de atingir o pico de 102 milhões em 2020/2021 (USDA, 2021). No entanto, para se obter alta produção, é necessário dispor de alto nível tecnológico, com uso intenso de insumos, normalmente adquiridos fora da propriedade, e que aumentam os custos do sistema de produção. Nesse aspecto, um dos fatores limitantes na produção do milho é a disponibilidade de nutrientes. A maior exigência é referente a nitrogênio e potássio, seguido de cálcio, magnésio e fósforo (Ribeiro, 2014).

Sendo assim, há necessidade de o setor produtivo de milho buscar alternativas que possam diminuir a utilização de fertilizantes, sem que haja diminuição da produtividade, tornando os sistemas agrícolas de produção mais sustentáveis. Nesse contexto, o uso de bactérias diazotróficas e de substâncias húmicas (SHs) constituem-se em alternativas promissoras para essa cultura.

As bactérias diazotróficas estão presentes no solo, na rizosfera e em outras partes da planta, as quais são capazes de transformar o N atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas (Moreira et al., 2013). Além de fixarem N₂, essas bactérias podem realizar ainda processos importantes, como a solubilização de fosfato, produção de hormônios e antagonismo a patógenos, induzir o crescimento radicular e melhorar a absorção de água e nutrientes pelas plantas (Doornbos et al., 2012; Moreira et al., 2013), sendo, então, considerada como bactérias promotoras do crescimento vegetal - BPCV.

Por sua vez, as SHs são formadas a partir da degradação química e biológica de resíduos de plantas, animais e atividades microbianas (Burlakovs et al., 2013). Suas propriedades químicas, microbiológicas e físicas podem garantir um incremento na produtividade em decorrência dos benefícios que promove para a estrutura física, química e microbiológica do solo e para o metabolismo da planta (Caron et al., 2015). Atuam como reservatório de N, P, S e micronutrientes, favorecem o incremento no peso e tamanho do sistema radicular, desenvolvimento de pelos radiculares e radículas, aumentando a superfície de contato com a solução do solo (Canellas e Santos, 2005; Aguiar et al., 2009; Borcioni et al., 2016).

Vários estudos têm sido realizados na cultura do milho com a inoculação de bactérias fixadoras de N₂ (Sangoi et al., 2015; Dartora et al., 2013; Araújo et al., 2013; Dotto et al., 2010) e com substâncias húmicas (Filho et al., 2020; Baldotto et al., 2019; Batista et al., 2018; Rodrigues et al., 2017; Bowden et al., 2010; Verlinden et al., 2009), no entanto, muitos destes estudos têm apresentado resultados divergentes e há poucas informações disponíveis sobre as respostas da aplicação combinada desses bioestimulantes na cultura do milho.

Resultados divergentes em plantas inoculadas com BPCV estão relacionados à presença da microbiota nativa do solo, que geralmente é competitiva e bem adaptada e pode reduzir os benefícios da simbiose (Pereira et al., 2013), além disso, outros fatores ambientais podem alterar os padrões de competitividade desses microrganismos no solo (Valiente-Banuet et al., 2015; Naamala et al., 2016). Já o efeito das substâncias húmicas no crescimento das plantas depende do modo de aplicação, do teor de moléculas bioativas, fonte, dose e peso molecular da fração húmica e espécie vegetal (Canellas et al., 2010; Nardi et al., 2021).

Neste estudo, considerou-se a hipótese de que a utilização combinada de SH, em doses pré-definidas, e inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal contribuem com o desenvolvimento e melhoram o suprimento nutricional de nitrogênio e fósforo do milho. Dessa forma, o estudo objetivou avaliar o comportamento morfofisiológico e o estado nutricional de plantas de milho sob utilização de diferentes doses de substâncias húmicas, bactérias promotoras de crescimento vegetal e adubação convencional.

2. Material e métodos

2.1. Local de desenvolvimento do experimento

O estudo foi desenvolvido em casa de vegetação, no período de 11 de julho (semeadura) a 15 de setembro de 2022, no *Campus* da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, na cidade de Vitória da Conquista, situado a 880 m de altitude e com as coordenadas geográficas de 14° 53' 08'' de latitude Sul e 40° 48' 02'' de longitude oeste de *Greenwich*. Durante a condução do experimento, a temperatura oscilou, em média, entre 12,35 °C (mínima) e 24,12 °C (máxima), com radiação solar média de 2,30 MJm⁻² e umidade média entre 80,53 e 86,24%.

2.2. Multiplicação do inóculo, preparo do inoculante e obtenção do inoculante

Dois isolados de bactérias promotoras de crescimento vegetal foram adquiridos junto ao Departamento de Biologia do Solo, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). As bactérias, UFRB FA72A2-1 e UFRB FA34C2-2, foram isoladas por Sousa (2017), caracterizados e identificados por Bráulio (2023) como *Bacillus proteolyticus* e *Achromobacter spanius*, respectivamente. Estas foram multiplicadas em meio YMA (Yeast, Manitol, Ágar) líquido (Döbereiner et al., 1995), à temperatura de 28

°C, sob 110 rpm por 72 h. Alíquotas de 5 mL foram retiradas para determinação de densidade ótica e do valor de pH. Para a avaliação da densidade ótica, foi utilizado um espectrofotômetro, marca Hitachi, modelo U-2001 UV/Vis, fazendo-se a leitura da absorbância a 560 nm. O número de células viáveis foi determinado pelo método da diluição seriada em placas contendo o meio sólido. Além desses isolados, foi utilizado também um inóculo comercial recomendado para a cultura do milho, composto com as estirpes Abv5 e Abv6 de *Azospirillum brasiliense*.

2.3. Atributos físicos e químicos do solo

Para o estudo do desenvolvimento vegetativo, foi conduzido o experimento em casa de vegetação, utilizando-se vasos plásticos de 21 L, preenchidos com 20 dm³ de solo coletado em uma profundidade 0 a 0,20 m, em área com histórico de cultivo de milho. Amostras de solo foram coletadas, secas ao ar e peneiradas em malhas de 2 mm e uma porção de 400 g foi retirada para análises físicas e químicas, as quais foram efetuadas de acordo com as metodologias adotadas pela Embrapa (2011), com resultados descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química e física do solo utilizado no experimento

Análise química do solo													
pH	mg dm ⁻³	Cmol _c dm ⁻³ de solo								%	g dm ⁻³	g Kg ⁻¹	
(H ₂ O)	*P	*K ⁺	**Ca ²⁺ +	**Mg ²⁺ +	**Al ³⁺ +	***H +	SB	t	T	V	m	MO	COT
5,4	31	0,09	2,0	0,5	0,2	3,2	2,6	2,8	6,0	43	7	16	9,28
Análise física do solo													
Frações totais da amostra %		Composição Granulométrica (g Kg ⁻¹ de TFSA)					Classe textural						
Terra fina < 2 mm		Areia grossa 2-0,20 mm		Areia fina 0,20-0,05 mm		Silte 0,05-0,002 mm		Argila < 0,002 mm					
100		550		170		20		260		Argilo-arenoso			

*Extrator Mehlich I; ** Extrator KCl 1N; ***CaCl₂ 0,01M; SB = Soma de base; t = CTC efetiva; T = CTC a pH 7; V = Saturação de base; m = Saturação por alumínio; MO = Matéria orgânica; COT = Carbono orgânico total; e TFSA = terra fina seca ao ar.

2.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em arranjo fatorial 5 x 3, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto por diferentes doses de substâncias húmicas (SH) - Ecohumic® (0,0 - 1,5 - 3,0 - 4,5 e 6,0 L ha⁻¹); e o segundo fator por diferentes bactérias promotoras de crescimento vegetal (B) (isolado UFRB FA72A2-1 + nitrogênio de cobertura (I1), isolado UFRB FA34C2-2 + nitrogênio de

cobertura (I2), estirpe comercial + nitrogênio de cobertura (EC)). Foram introduzidos dois tratamentos-testemunha adicionais (nitrogênio de cobertura (TNC) e nitrogênio total (TNT)), culminando, assim, em um total de 68 parcelas experimentais. As doses de Ecohumic® foram criteriosamente selecionadas, com base nas recomendações do fabricante para a cultura do milho ($3,0 \text{ L ha}^{-1}$).

2.5. *Plantio e adubação*

Para o plantio, foram utilizadas sementes do milho híbrido AG 1051, de ciclo semiprecoce, com maturação fisiológica de 133-139 dias, e destinadas à produção de silagem, milho verde e produção de grãos. Foram semeadas três sementes por vaso, a uma profundidade de aproximadamente 3 cm, sendo adicionada a estas a solução inoculante com uma população estabelecida de 10^8 células bacterianas e doses de SH, nos respectivos tratamentos. O inoculante comercial foi aplicado nas sementes antes do plantio, usando-se 100 mL para 60.000 sementes, conforme as recomendações do fabricante. Adicionalmente, foram aplicados 4,4 mL de inóculo esterilizado diretamente em cada semente, no momento da semeadura.

As inoculações envolvendo os isolados I1 e I2 foram realizadas pipetando-se 4,4 mL do inóculo diretamente sobre cada semente durante a semeadura. As SH utilizadas continham, em sua composição, 10% de Carbono Orgânico Total, 13% de Ácido Húmico, 17% Ácido Fúlvico, 0% de Humina, 10 gL^{-1} nitrato de potássio, $7,0 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de cobre, $7,0 \text{ gL}^{-1}$ de ácido bórico, $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de espessante. As respectivas doses foram diluídas em 60 mL de água, sendo aplicadas 1 mL em cada semente após a semeadura.

O desbaste das plantas foi realizado 15 dias após a emergência (DAE), deixando-se uma única planta por vaso, e foi mantida irrigação regular para garantir a umidade do solo em nível próximo à capacidade do vaso, determinada pela retenção de água no solo (Casaroli e Van Lier, 2008).

Para atender às necessidades de nutrientes da cultura, foram realizadas adubações com 80 Kg ha^{-1} de N, sendo considerada 20 Kg ha^{-1} como adubação de plantio, realizada apenas no tratamento testemunha de N total com a aplicação de 440 mg vaso^{-1} de ureia; e 60 Kg ha^{-1} como adubação de cobertura, realizada em todos os tratamentos, usando-se $1330 \text{ mg vaso}^{-1}$ de ureia. O fornecimento de P foi de 30 Kg ha^{-1} , sendo realizado em todos os tratamentos cinco dias antes do plantio. A fonte utilizada foi o superfosfato simples ($1700 \text{ mg vaso}^{-1}$). Todos os tratamentos receberam adubação potássica de cobertura por

meio do uso 50 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio (860 mg de KCl vaso⁻¹). Todas as adubações de cobertura foram realizadas, quando as plantas apresentavam de seis a oito folhas bem desenvolvidas (25 DAE), conforme a análise de solo e a recomendação para a cultura (Ribeiro et al., 1999).

2.6. Análises morfofisiológicas

O experimento foi conduzido até o início da floração, e foram realizadas análises de emergência, morfológicas, fisiológicas e de nutrientes foliares.

2.6.1. Análises de emergência

Foram avaliadas a porcentagem de emergência (EM), velocidade de emergência (VE), índice de velocidade de emergência (IVE) e coeficiente de velocidade de emergência (CVE). Os dados de emergência das plântulas foram avaliados a partir do sétimo dia de implantação do experimento, que correspondeu ao primeiro dia de emergência, até a estabilização de emergência das plântulas (16º dia após a semeadura). Foram consideradas emergidas as plântulas que apresentaram coleóptilo acima do solo. Os resultados foram expressos em porcentagem média, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Regulamento de Análise de Sementes (Brasil, 2009).

A velocidade de emergência foi avaliada conforme metodologia proposta por Edmond e Drapala (1958); o índice de velocidade de emergência foi determinado pelas contagens diárias, a partir da emergência da primeira plântula, conforme indica Maguire (1962); e o coeficiente de velocidade de emergência foi determinado, conforme recomenda Furbeck et al. (1993).

2.6.2. Características morfológicas

O crescimento das plantas foi avaliado aos 60 DAE, sendo levada em consideração a altura (ALT) obtida pela medição de todas as plantas de cada tratamento, considerando a altura máxima à base da planta no nível do solo, mensurada com o auxílio de uma régua graduada em centímetros; o diâmetro de colmo (DIAM) mensurado na parte basal da planta, com o auxílio de um paquímetro digital e expresso em milímetros; e o número de folhas (NF) obtido pela contagem das folhas de todas as plantas de cada tratamento.

Ao final do experimento, as plantas foram coletadas, separadas em parte aérea e

raízes. As folhas foram separadas do colmo para obtenção da área foliar (AF), que foi mensurada através do medidor de área foliar marca LI 3100C. Área meter com resolução de 0,1 mm² e os resultados expressos em cm². As partes da planta foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C, até atingirem peso constante. A produção de massa seca, parte aérea e das raízes (MSPA e MSR) e a massa seca total (MST) foram obtidos pesando-se os materiais vegetais secos em uma balança digital de precisão. A relação parte raiz/aérea (R/PA) foi calculada, dividindo a massa seca total das raízes pela massa seca total da parte aérea.

O volume de raízes (VR) foi determinado pelo método de deslocamento em água, com auxílio de uma régua graduada e mm, acoplada em uma caixa de vidro preenchida com um volume conhecido, e, após inserção das raízes, considerou-se como volume de raízes a diferença obtida entre o valor inicial e final, marcada na régua pelo deslocamento de água.

2.6.3. Trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos

As taxas de fotossíntese líquida (*A*), transpiração (*E*) e condutância estomática (*g_s*) foram determinadas por meio da avaliação de trocas gasosas, entre 8h e 11h da manhã, tomando-se como referência o terço médio da última folha completamente expandida, localizadas na porção mediana da planta. A temperatura foliar foi mantida, em média, em 30 °C. O aparelho utilizado foi um analisador de gases infravermelho (IRGA LCPro, ADC, UK), com área de câmara medindo 6,25 cm². Durante as medições, as plantas foram expostas a um nível de irradiância de 1000 mmol de fótons m⁻² s⁻¹, com a concentração de CO₂ no ar fornecido ao IRGA, fixada em 400 mmol mol⁻¹.

Para a determinação dos teores dos pigmentos fotossintéticos, quatro discos foliares (7 mm de diâmetro) foram colocados em um tubo contendo 5 mL de acetona (80%) (Arnon, 1949), por 48h, em ambiente escuro, para extração dos pigmentos que posteriormente foram determinados em espectrofotômetro (Wellburn, 1994).

2.6.4. Teor foliar de nitrogênio e fósforo

O material seco da área foliar foi moído em moinho de facas com peneiras de 1 mm, acondicionados em sacos plásticos identificados e, posteriormente, determinados os teores de nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar. Sendo o N realizada através da solubilização sulfúrica, seguida do método semimicro Kjeldahl. O teor de P foi determinado por digestão, via úmida, com solubilização nítrico perclórica,

com espectrometria empregando o amarelo de vanadato; as leituras foram realizadas em 420 nm, conforme Carmo et al. (2000).

A quantidade de N e P acumulado (N ACUM e P ACUM) na área foliar foi calculada usando-se os valores de N e P encontrados. Os níveis de cada nutriente foram multiplicados pela massa seca da folha (Jian et al., 2019).

2.7. Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Lilliefors) e homogeneidade de variâncias (Cochran e Bartlett) e, em seguida, realizada a análise de variância (F a 0,05), posteriormente, as médias dos tratamentos qualitativos foram agrupados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade e, para os dados quantitativos, foi realizada a análise de regressão. Com as variáveis analisadas, foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson e suas significâncias testadas pelo teste t de Student a 1% e a 5% de probabilidade, usando-se o *software* R, versão 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Áustria).

3. Resultados

Os resultados obtidos no experimento revelam efeitos significativos de fatores isolados, especificamente as doses de substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento de plantas, em diversas variáveis, incluindo a massa seca da parte aérea, o número de folhas e a fotossíntese líquida (Tabela Suplementar 2 e 3). Por outro lado, parâmetros, como porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência, teor de nitrogênio e nitrogênio acumulado, foram significativamente influenciados pela presença apenas de bactérias promotoras de crescimento vegetal (Tabela Suplementar 1 e 4).

Para altura, diâmetro, área foliar, massa seca de raiz, massa seca total, relação raiz/parte aérea, volume de raiz, clorofila total, carotenoides e teor de P, houve interação significativa entre os fatores doses de substância húmicas x bactérias promotoras de crescimento de plantas (Tabela Suplementar 2, 3 e 4). Já as variáveis velocidade de emergência, coeficiente de velocidade de emergência, transpiração, condutância estomática e P acumulado não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) com os tratamentos realizados neste experimento (Tabela Suplementar 1, 3 e 4).

Os tratamentos adicionais, testemunha N total e testemunha N de cobertura,

apresentaram interação significativa com o fatorial doses de substância húmicas x bactérias promotoras de crescimento de plantas, apenas para as características massa seca de raiz, massa seca total, relação raiz/parte aérea, volume de raiz, clorofila total, carotenoides teor de N e N acumulado (Tabela Suplementar 2, 3 e 4). Sendo também estes adicionais significativos entre si para as respectivas características, com exceção da relação raiz/parte aérea, além do teor de P, altura e diâmetro.

Avaliando o efeito das bactérias de forma isolada, sem a influência das substâncias húmicas, observa-se efeitos positivos nas plântulas de milho, cujas variáveis percentagem de emergência e índice de velocidade de emergência apresentaram valores maiores com o isolado UFRB FA72A2-1 do que com a estirpe comercial, mas não diferiu do isolado UFRB FA34C2-2; e, para as características velocidade de emergência e coeficiente de velocidade de emergência, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem de emergência (EM), velocidade de emergência (VE), índice de velocidade de emergência (IVE) e coeficiente de velocidade de emergência (CVE) de plantas de milho inoculadas com bactérias promotoras de crescimento isolados UFRB FA72A2-1.1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), estirpe comercial (EC) e testemunhas com nitrogênio de cobertura (TNC) e total (TNT)

Tratamento	EM (%)	VE	IVE	CVE
I1	96,67 ^{2,29a}	7,99 ^{0,16a}	0,371 ^{0,01a}	12,61 ^{0,24a}
I2	90,00 ^{4,26a}	8,01 ^{0,14a}	0,343 ^{0,02a}	12,56 ^{0,21a}
EC	81,67 ^{4,51b}	8,05 ^{0,13a}	0,307 ^{0,02b}	12,49 ^{0,21a}
TNT	100,00 ^{0,0}	7,83 ^{0,17}	0,383 ^{0,01}	12,78 ^{0,26}
TNC	91,67 ^{8,33}	8,17 ^{0,29}	0,345 ^{0,04}	12,29 ^{0,41}
CV (%)	19,26	7,92	20,63	7,5

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Os valores sobrescritos são os erros-padrão.

Sob inoculação com o isolado UFRB FA72A2-1, plantas de milho apresentaram valores similares de altura em função do aumento das doses de substâncias húmicas. Para o isolado UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial, as doses de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resultaram em maior altura, comparadas às doses 0,0 - 4,5 e 6,0 L ha⁻¹ (Fig. 1A). Nas doses de substâncias húmicas, 0,0- 4,5 e 6,0, verificou-se maior altura em plantas inoculadas com UFRB FA72A2-1, nas demais doses, a altura não se diferiu entre as bactérias. Plantas de milho inoculadas com UFRB FA72A2-1 também apresentaram maior massa seca da parte aérea e número de folhas, comparadas às demais bactérias,

conforme Tabela 4.

Sob inoculação com UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial, o aumento das doses de substâncias húmicas ocasionou aumento do diâmetro até o nível estimado de 3,36 e 3,16 L ha⁻¹, com valores máximo de 25,02 e 26,09 mm planta⁻¹, respectivamente (Fig. 1B). Plantas inoculadas com UFRB FA72A2-1 apresentaram maior diâmetro, quando comparadas às demais bactérias, exceto sob aplicação de 3,0 Lha⁻¹ de substâncias húmicas, cujos valores não se diferiram entre as bactérias.

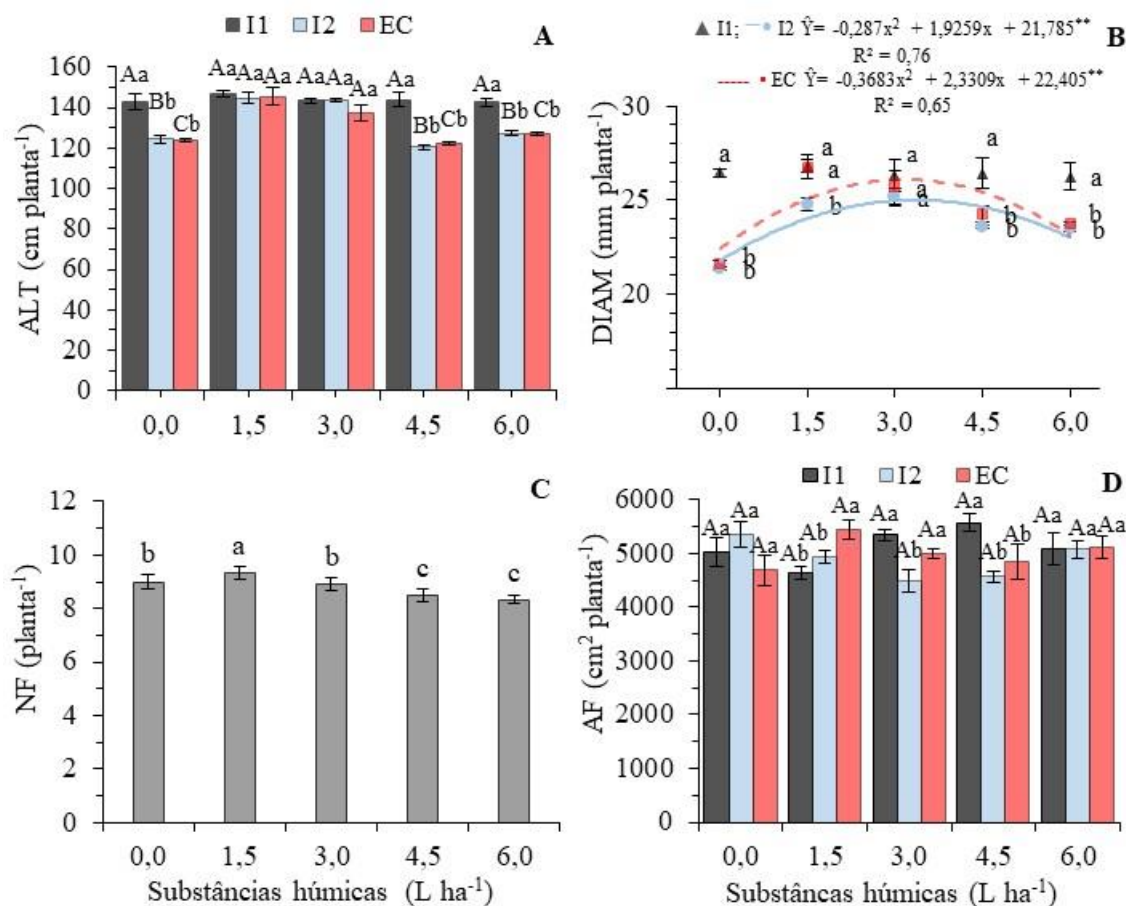


Fig. 1. Altura da planta (ALT) [A], diâmetro do caule (DIAM) [B], número de folhas (NF) [C] e área foliar (AF) [D] de plantas de milho inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal isolados UFRB FA72A2-1 (—▲ I1), UFRB FA34C2-2 (—● I2), estirpe comercial (---■ EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (■). ** significativo ($p < 0,01$), de acordo com o teste t . Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$).

O aumento das doses de substâncias húmicas resultou em aumento do número de folhas, mas não levou ao incremento da área foliar de plantas de milho (Fig. 1C-D). No nível de 1,5 L ha⁻¹, o número de folhas foi maior que o nível 0,0 e as demais doses. Sob aplicação de 4,5 e 6,0 L ha⁻¹, verificou-se menor número de folhas, quando comparado a

0,0 - 1,5 e 3,0 (Fig. 1C). No nível de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, verificou-se maior área foliar sob inoculação com estirpe comercial; e, nas doses de 3,0 e 4,5 L ha⁻¹, verificou-se menor área foliar em plantas inoculadas com UFRB FA34C2-2, quando comparadas ao UFRB FA72A2-1 e à estirpe comercial. Nas demais doses, a área foliar não se diferiu entre as bactérias.

A aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas proporcionou o aumento da massa seca da parte aérea das plantas de milho (Fig. 2A). Sob inoculação com estirpe comercial, o aumento do nível de substâncias húmicas até o valor estimado de 2,65 L ha⁻¹ também promoveu o aumento da massa seca total das plantas, atingindo peso máximo de 147,18 g planta⁻¹, valor acima do encontrado para a testemunha N de cobertura (142,75) e inferior a N total (159,49 g planta⁻¹) (Fig. 2B). Nas doses de 0,0 – 4,5 e 6,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, verificou-se maior massa seca total em plantas inoculadas com UFRB FA72A2-1; já para 1,5 L ha⁻¹, a massa seca total não se diferiu entre os tratamentos com bactérias; e sob aplicação de 3,0 L ha⁻¹, os isolados UFRB FA72A2-1 e a estirpe comercial proporcionaram maior massa seca total em relação UFRB FA34C2-2.

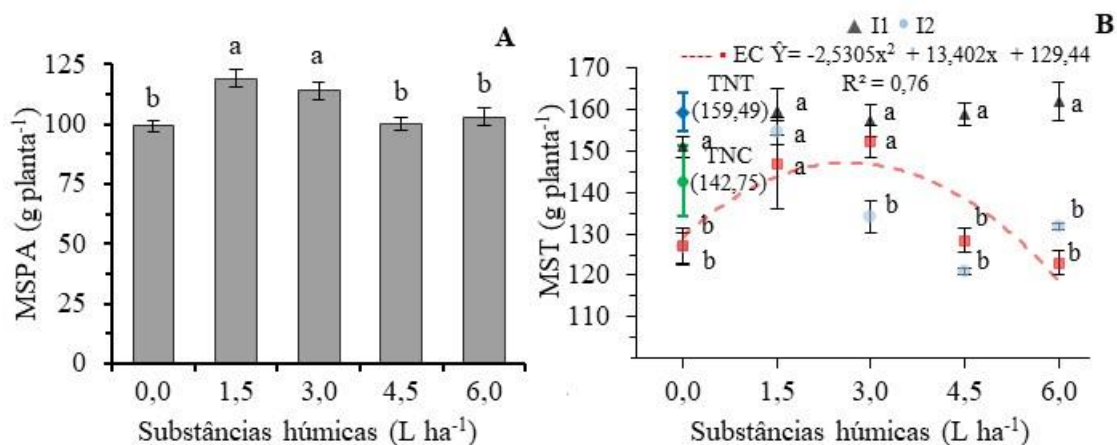


Fig. 2. Massa seca da parte aérea (MSPA) [A] em função da aplicação de doses de substâncias húmicas (■) massa seca total (MST) [B] de plantas de milho em função da aplicação de doses de substâncias húmicas e inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal isolados UFRB FA72A2-1 (___ ▲ I1), UFRB FA34C2-2 (—● I2), estirpe comercial (--- ■ EC) e testemunhas com nitrogênio de cobertura (● TNC) e total (♦ TNT). ** significativo ($p < 0,01$), de acordo com o teste t . As médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$).

Para os valores de volume de raiz, massa seca de raiz e relação raiz/parte aérea, houve efeito significativo da interação entre as doses de substâncias húmicas vs

tratamentos adicionais. Testemunhas N total e N de cobertura exibiram valores de volume de raiz, massa seca de raiz e relação raiz/parte aérea superiores à média dos fatores doses de substâncias húmicas x bactérias promotoras de crescimento de plantas (Tabela 3). Além disso, verificou-se maior volume de raiz e massa seca de raiz para testemunha N total em comparação à testemunha N de cobertura, para a relação raiz/parte aérea; as testemunhas não se diferiram entre si.

Em geral, a aplicação das substâncias húmicas não resultou em aumento do volume de raiz, massa seca de raiz e relação raiz/parte aérea, quando comparado ao nível 0,0 para nenhuma das bactérias, exceto sob inoculação com UFRB FA72A2-1, quando a aplicação de 1,5 - 4,5 e 6,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resultou em maior volume de raiz (311,08 - 353,00 e 355,33 cm³ planta⁻¹), sob o nível 0,0 (266,67 cm³). Para esta mesma característica, as testemunhas N total e N cobertura obtiveram valores de 400,00 e 333,33 cm³ de raiz planta⁻¹.

Sem a aplicação de substâncias húmicas e nas doses de 3,0 - 4,5 e 6,0 L ha⁻¹, plantas de milho inoculadas com estirpe comercial apresentaram volume de raiz superior ou igual aos isolados (Tabela 3). Sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, verificou-se menor volume de raiz sob inoculação com estirpe comercial, quando comparado a UFRB FA34C2-2 e valor similar a UFRB FA72A2-1.

Tabela 3 - Volume de raiz, massa seca de raiz e relação raiz/parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), estirpe comercial (EC) e testemunhas nitrogênio de cobertura (TNC) e total (TNT)

Testemunhas**		Estirpe	Volume de raiz (cm ³ planta ⁻¹)				
			Substâncias húmicas (L ha ⁻¹)				
			0,0	1,5	3,0	4,5	6,0
TNT	400,00 ^{27,22a}	I1	266,67 ^{0,00Bb}	311,08 ^{15,71Aa}	216,67 ^{16,67Bb}	353,00 ^{16,67Aa}	355,33 ^{15,96a}
TNC	333,33 ^{0,00b}	I2	294,42 ^{16,65Ab}	333,33 ^{23,57Aa}	233,33 ^{13,61Bb}	266,67 ^{0,00 Bb}	266,67 ^{0,00Bb}
$\bar{F}$	299,81	EC	333,33 ^{0,00Aa}	266,67 ^{0,00Bb}	316,66 ^{16,66Aa}	350,00 ^{49,99Aa}	333,33 ^{0,00Aa}
Testemunhas**		Estirpe	Massa seca de raiz (g planta ⁻¹)				
			0,0	1,5	3,0	4,5	6,0
			0,0	1,5	3,0	4,5	6,0
TNT	45,99 ^{2,43a}	I1	44,05 ^{2,12Aa}	34,52 ^{1,11Ba}	32,03 ^{0,67Ba}	47,31 ^{0,67Aa}	42,40 ^{1,82Aa}
TNC	39,86 ^{2,85b}	I2	30,80 ^{1,01Ab}	33,91 ^{1,82Aa}	33,13 ^{3,49Aa}	29,91 ^{0,31Ab}	33,02 ^{0,63Ab}
$\bar{F}$	35,33	EC	32,13 ^{0,60Ab}	35,40 ^{3,59Aa}	37,93 ^{2,52Aa}	32,11 ^{0,04Ab}	31,32 ^{0,28Ab}
Testemunhas**		Estirpe	Relação raiz/parte aérea				
			0,0	1,5	3,0	4,5	6,0
			0,0	1,5	3,0	4,5	6,0
TNT	0.40 ^{0.01a}	I1	0,41 ^{0,018Aa}	0,28 ^{0,016Ca}	0,26 ^{0,012Cb}	0,42 ^{0,009Aa}	0,35 ^{0,009Ba}
TNC	0.39 ^{0.03a}	I2	0,32 ^{0,010Ab}	0,28 ^{0,022Aa}	0,33 ^{0,046Aa}	0,33 ^{0,007Ab}	0,33 ^{0,006Aa}
$\bar{F}$	0.33	EC	0,34 ^{0,008Ab}	0,32 ^{0,027Aa}	0,33 ^{0,029Aa}	0,33 ^{0,010Ab}	0,34 ^{0,008Aa}

**Médias dos tratamentos-testemunha diferem em relação à média do fatorial (Teste F, p

< 0,01). Os valores sobrescritos são os erros padrão. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem entre doses de substâncias húmicas e minúsculas iguais nas colunas não diferem entre testemunhas ou estirpes de bactérias (Teste Scott-Knott, $p < 0.05$). $\bar{F}$: média do fatorial doses de substâncias húmicas (SH) x bactérias promotoras de crescimento de plantas (B).

Nas doses de 0,0 - 4,5 e 6,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, verificou-se maior massa seca de raiz sob inoculação com UFRB FA72A2-1 e maior relação raiz/parte aérea nas doses de 0,0 e 4,5, quando comprado a UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial. Nas demais doses, os valores de massa seca de raiz e relação raiz/parte aérea se mantiveram similares entre as estirpes. A testemunha N total apresentou valores de 45,99 g e 0,40 e a testemunha N de cobertura de 39,86 g e 0,33, respectivamente, para essas características.

A condutância estomática e transpiração das plantas de milho não foram influenciadas pelos fatores estudados (Tabela suplementar 3 e 5). Para a fotossíntese líquida houve efeito isolado dos fatores estirpes de bactérias e doses de substâncias húmicas, verificando-se maior valores sob inoculação com UFRB FA72A2-1 (Tabela 4) e nas doses de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas (Fig. 3).

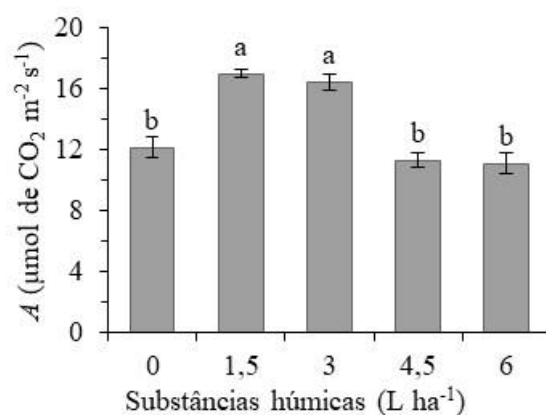


Fig. 3. Fotossíntese líquida (A) de plantas de milho em função da aplicação de doses de substâncias húmicas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si (Teste Scott-Knott, $p < 0,05$).

Em plantas inoculadas com UFRB FA72A2-1, o aumento das doses de substâncias húmicas ocasionou o decréscimo linear no teor de clorofila total (Fig. 4A). Para UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial, verificou-se aumento da clorofila total com o aumento das substâncias húmicas até as doses estimadas de 2,63 e 2,82 L ha⁻¹, havendo decréscimo para doses superiores. Na ausência de substâncias húmicas, o teor de clorofila total foi maior, sob inoculação com UFRB FA72A2-1; sob aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹, verificou-se maior teor para UFRB FA72A2-1, seguido de UFRB FA34C2-2; e menor teor em

estirpe comercial. No nível de 4,5 L ha⁻¹, os teores não se diferiram entre os tratamentos com bactérias; e sob aplicação de 6,0 L ha⁻¹, verificou-se maior teor para UFRB FA72A2-1 em relação à estirpe comercial. As testemunhas N total e N cobertura apresentaram teores de clorofila total de 0,0253 e 0,0152 µg cm⁻² planta⁻¹ (Fig. 4A).

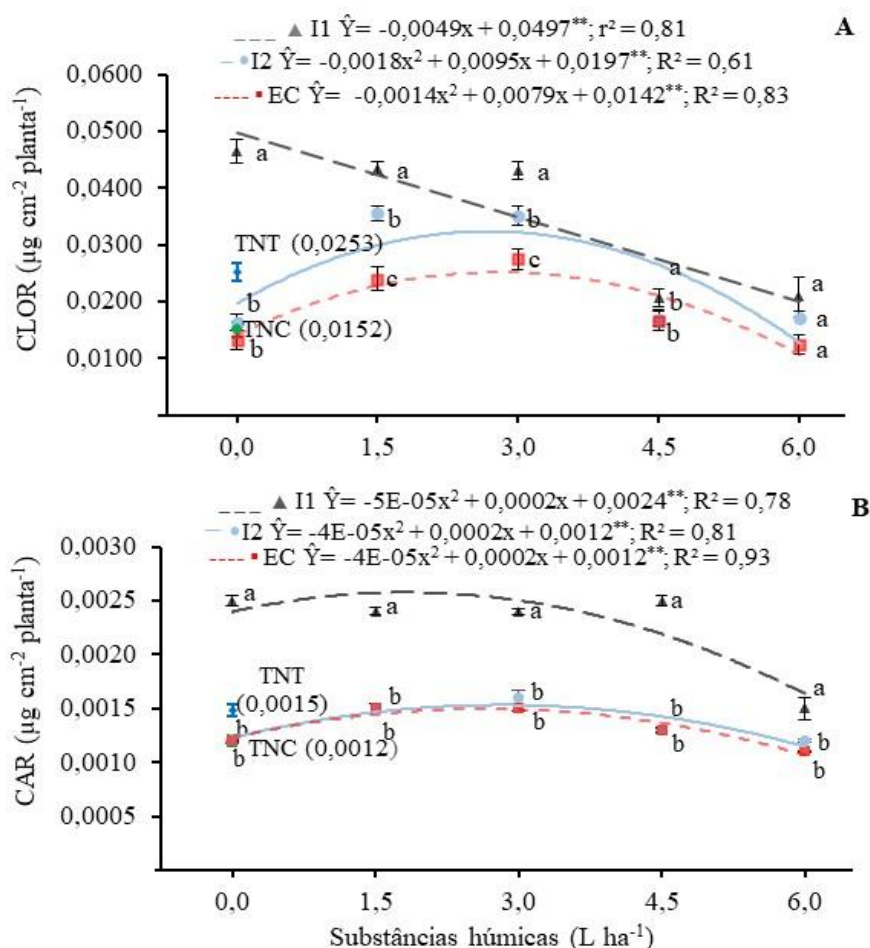


Fig. 4. Teor de clorofila total (CLOR) [A] e carotenoides (CAR) [B] em folhas de milho em função da aplicação de doses de substâncias húmicas e inoculação de bactérias promotoras de crescimento UFRB FA72A2-1 (—▲ I1), UFRB FA34C2-2 (—● I2), estirpe comercial (---■ EC), testemunhas com nitrogênio de cobertura (● TNC) e total (◆ TNT). Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (Teste Scott-Knott, $p < 0,01$). ** significativo ($p < 0,01$), de acordo com teste t .

Para o teor de carotenoides, o aumento das doses de substâncias húmicas causou um efeito quadrático, aumentando o teor até o nível estimado de 2,0 L ha⁻¹ para UFRB FA72A2-1 e 2,5 L ha⁻¹ para UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial com posterior declínio (Fig. 4B). Independentemente das doses de substâncias húmicas, plantas de milho inoculadas com UFRB FA72A2-1 apresentaram maiores teores de carotenoides que UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial, que apresentaram teores similares entre si. Para as

testemunhas N total e N cobertura, os valores médios encontrados foram de 0,0015 e 0,0012 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ planta}^{-1}$.

As plantas de milho, quando inoculadas com a bactéria UFRB BA72A2.1, apresentaram maiores teores foliares de N e N acumulado do que as demais bactérias, no entanto, os valores médios se mantiveram inferiores às testemunhas N total e N cobertura, sendo o N total estatisticamente superior ao N de cobertura, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Massa seca da parte aérea (MSPA) (g planta⁻¹), número de folhas (NF planta⁻¹), fotossíntese líquida (A) (μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹ planta⁻¹), transpiração (E) (μmol de H₂O m⁻² s⁻¹ planta⁻¹), condutância estomática (*g_s*) (mol m⁻² s⁻¹ planta⁻¹), teor de nitrogênio foliar (N) (g kg⁻¹ planta⁻¹), nitrogênio foliar acumulado (N ACUM) (mg planta⁻¹) e fósforo foliar acumulado (P ACUM) (mg planta⁻¹) de plantas de milho sob a inoculação de bactérias isolado UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), estirpe comercial (EC) e testemunhas com nitrogênio de cobertura (TNC) e total (TNT)

Tratamento	MSPA	NF	A	E	<i>g_s</i>	N	N ACUM	P ACUM
I1	117,69 ^{2,20a}	9,70 ^{0,10a}	15,52 ^{0,57a}	2,04 ^{0,15a}	0,07 ^{0,003a}	2,47 ^{0,07a}	85,26 ^{3,19a}	23,29 ^{0,81a}
I2	101,49 ^{2,68b}	8,30 ^{0,13b}	12,7 ^{0,73b}	2,26 ^{0,12a}	0,08 ^{0,004a}	1,64 ^{0,07b}	57,84 ^{2,84b}	23,56 ^{0,45a}
EC	101,71 ^{2,88b}	8,45 ^{0,13b}	12,51 ^{0,65b}	2,26 ^{0,15a}	0,08 ^{0,004a}	1,74 ^{0,06b}	64,14 ^{3,41b}	25,03 ^{0,89a}
TNT	113,50 ^{2,38A}	9,00 ^{0,41A}	13,13 ^{1,09A}	2,12 ^{0,21A}	0,07 ^{0,01A}	2,66 ^{0,16**A}	102,89 ^{7,29**A}	28,03 ^{0,72A}
TNC	102,90 ^{6,92A}	8,75 ^{0,25A}	12,29 ^{1,36A}	2,47 ^{0,30A}	0,08 ^{0,01A}	1,84 ^{0,05**B}	65,48 ^{1,61**B}	23,15 ^{1,53B}
CV (%)	7,65	4,96	8,81	21,34	19,07	14,73	21,36	13,98

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre as bactérias e maiúsculas entre tratamentos adicionais (Teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). Os valores sobrescritos são os erros padrão. ** Médias dos tratamentos testemunha difere em relação à média do fatorial (Teste F, $p < 0,01$).

A aplicação das substâncias húmicas não influenciou o teor foliar de P nas plantas de milho. Sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, verificou-se menor teor de P em plantas inoculadas com UFRB FA34C2-2, quando comparadas a UFRB FA72A2-1; e sob aplicação de 4,5 L ha⁻¹, verificou-se maior teor de P para estirpe comercial, quando comparada a UFRB FA72A2-1. Nas demais doses de substâncias húmicas, os teores de P não se diferiram entre as bactérias (Fig. 5).

O teor de P acumulado nas folhas diferiu-se apenas entre as testemunhas, verificando-se maior teor para N total (28,03 mg planta⁻¹), conforme Tabela 4.

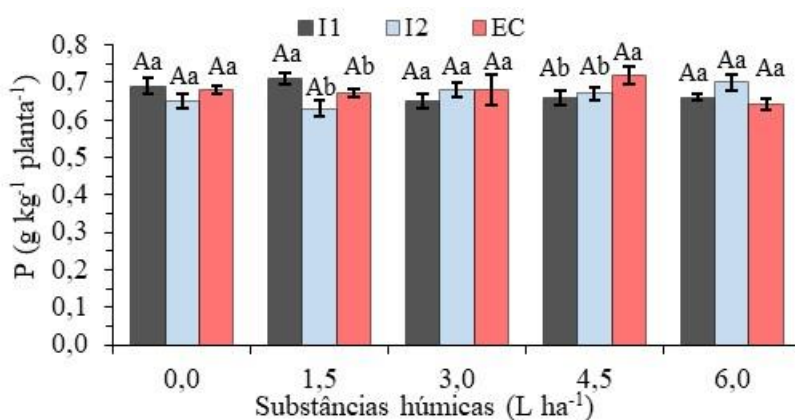


Fig. 5. Teor foliar de fósforo (P) em plantas de milho em função de doses de substâncias húmicas e inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal isolados UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), estirpe comercial (EC). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre doses de substâncias húmicas e minúsculas iguais não diferem entre bactérias (Teste Scott-Knott, $p < 0,05$).

A massa seca da parte aérea e total das plantas apresentou correlação positiva com fotossíntese líquida e altura de planta. Por sua vez, a fotossíntese líquida correlacionou-se com os teores de carotenoides e clorofila total, altura de planta e número de folhas. Já o teor de carotenoides teve correlação com o teor de clorofila total, altura, diâmetro, número de folhas e teor de N foliar. A clorofila total correlacionou-se apenas com a altura de planta e, por fim, houve correlação da altura com o diâmetro e o número de folha com o teor de N foliar, conforme Tabela 5.

Esses resultados evidenciam uma correlação positiva da fotossíntese e dos teores de pigmentos com os parâmetros de crescimento das plantas de milho, principalmente, da massa seca total, altura e número de folhas.

Tabela 5. Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson, com as suas respectivas significâncias, entre 16 variáveis morfofisiológicas da cultura do milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento vegetal e diferentes doses de substâncias húmicas

Variáveis	AF	MSPA	MSR	MST	R/PA	VR	A	CAR	CLOR	ALT	DIAM	NF	P	PACUM	N
MSPA	0,13 ^{ns}														
MSR	0,29*	0,33 ^{ns}													
MST	0,22 ^{ns}	0,93**	0,65**												
R/PA	0,21 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	0,76**	0,01 ^{ns}											
VR	0,05 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,30 ^{ns}										
A	-0,05 ^{ns}	0,67**	0,20 ^{ns}	0,62*	-0,23 ^{ns}	-0,23 ^{ns}									
CAR	0,13 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,59 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	0,64**								
CLOR	-0,10 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,52 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	-0,32 ^{**}	0,78**	0,74**							
ALT	0,14 ^{ns}	0,68**	0,41 ^{ns}	0,71**	-0,05 ^{ns}	-0,60 ^{ns}	0,75**	0,62*	0,62*						
DIAM	0,20 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,63*	0,59 ^{ns}	0,63**					
NF	0,16 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,51 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,61*	0,74**	0,60 ^{ns}	0,59 ^{ns}	0,52 ^{ns}				
P	0,03 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,0 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-0,10 ^{ns}			
PACUM	0,36**	0,15 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,49 ^{ns}		
N	0,11 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,65**	0,44 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,65**	0,12 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	
NACUM	0,28 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,86**

^{ns} não significativo; *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$); e **significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), pelo teste *t*. ALT= altura, DIAM= diâmetro de colmo, NF= número de folhas, AF= área foliar, MSPA e MSR= massa seca parte aérea e das raízes, MST= massa seca total, R/PA= relação parte raiz/aérea, VR= volume de raízes, A= fotossíntese líquida, CAR= carotenoides, CLOR= clorofila total, N= teor de nitrogênio, N ACUM= nitrogênio acumulado, P= teor de fósforo e P ACUM= fósforo acumulado.

4. Discussão

A inoculação de sementes de milho com as bactérias UFRB FA72A2-1 e UFRB FA34C2-2 resultou em maior percentagem de emergência e índice de velocidade de emergência (Tabela 1), o que pode resultar em maior vigor das plântulas. Plântulas vigorosas poderão competir mais eficientemente, sobretudo em condições de estresse por luz, nutrientes e água, influenciando o estabelecimento da cultura. Esses resultados podem indicar que os isolados UFRB FA72A2-1 e UFRB FA34C2-2 possuem a capacidade de aumentar a concentração de solutos orgânicos e alterar o equilíbrio osmótico (Santos et al., 2014), favorecendo entrada de água nas sementes.

Os resultados relativos à inoculação de sementes com bactérias promotoras de crescimento de plantas são diversos. As inoculações com *Bacillus proteolyticus* aumentaram a germinação das sementes e o crescimento das plantas de milho e amendoim (Omeiri et al., 2022, Trinh et al., 2023); e com *Achromobacter spanius* aumentaram a germinação das sementes de *Vigna radiata* (Ahmad et al., 2006). A inoculação com *Azospirillum brasiliense* aumentou a porcentagem de emergência de sementes de milho (Barilli et al., 2011), enquanto, na inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* Z67, não foi observado efeito (Conceição et al., 2008). Porém, ambos os estudos revelaram aumento na massa fresca de raízes e parte aérea das plântulas.

O aumento das doses de substâncias húmicas até 3,0 L ha⁻¹ promoveu aumento nos teores de pigmentos fotossintéticos (Fig. 4 A-B), sendo a causa mais provável pelo aumento da taxa fotossintética nas doses de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ (Fig. 3), devido à maior capacidade de absorção luminosa. Corroborando esses resultados, a taxa fotossintética correlacionou-se positivamente com os teores de clorofila e carotenoides (Tabela 5). Em adição, os efeitos positivos das substâncias húmicas na fotossíntese não resultam apenas do aumento do teor de clorofila, mas de alterações na expressão gênica da planta e no conteúdo de compostos químicos envolvidos no processo fotossintético (Shah et al., 2018).

Nas plantas inoculadas com o isolado UFRB FA34C2-2 e a estirpe comercial, foi feito ajuste quadrático para o teor de clorofila total, devido ao aumento das doses de substâncias húmicas. Porém, para UFRB FA72A2-1, houve redução linear. Esses resultados indicam que, em plantas inoculadas com BPCV, os efeitos positivos das substâncias húmicas no teor de clorofila podem variar, dependendo da espécie. O aumento no teor de pigmentos até o nível de 3,0 L ha⁻¹, nas plantas inoculadas com UFRB

FA34C2-2 e na estirpe comercial, é atribuído à influência das substâncias húmicas na assimilação e metabolismo do nitrogênio, contribuindo para o aumento da síntese de moléculas de clorofila (Canellas e Oliveiras, 2014). A diminuição observada em doses mais elevadas demonstra um efeito dose-dependente, com dose ideal em níveis intermediários (Verlinden et al., 2009).

Monocotiledôneas, como o milho, podem suprir uma parte substancial da sua demanda de N por meio da associação com bactérias diazotróficas. Além de contribuir com N fixado, a inoculação com esses microrganismos está correlacionada com a melhor absorção de N do solo (Carvalho et al., 2014). Neste estudo, plantas de milho inoculadas com UFRB FA72A2-1 exibiram maior teor de N que UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial (Tabela 4), resultando em maiores teores de pigmentos fotossintéticos (Fig. 4), fotossíntese líquida, massa seca da parte aérea e número de folha (Tabela 4), além de uma tendência a maiores valores de altura, diâmetro de colmo (Fig. 1 A-B) e massa seca de raiz (Tabela 3), o que reforça a ideia de que o efeito das bactérias na promoção de crescimento está relacionado à aquisição de N₂.

O maior teor foliar de N e N acumulado nas plantas de milho, inoculadas com a bactéria UFRB FA72A2-1 (Tabela 4), pode estar relacionado a uma maior eficiência na fixação biológica de N e maior desenvolvimento do sistema radicular, mediado pela produção de fitorhônios relacionados ao crescimento, o que torna a planta mais eficiente na absorção de água e nutrientes (Pankievicz et al., 2021). Corroborando esses resultados, plantas inoculadas com UFRB FA72A2-1 apresentaram uma tendência a maiores valores de massa seca de raiz (Tabela 3), com consequente aumento da massa seca da parte aérea (Tabela 4).

O sucesso da interação entre bactérias diazotróficas e o hospedeiro pode envolver o controle do número de bactérias e/ou melhoria do desenvolvimento radicular (Vargas et al., 2012). Neste estudo, o melhor desempenho das plantas de milho sob inoculação com UFRB FA72A2-1, possivelmente, está relacionado a uma melhor interação deste isolado com as plantas, como evidenciado pelos valores de massa seca de raiz (Tabela 3) e teores de N (Tabela 4). O maior crescimento das plantas inoculadas com *Bacillus* se deve à sua capacidade de solubilizar fosfatos, produzir fitohormônios, fixar nitrogênio e atuar no biocontrole de fitopatógenos (Huang et al., 2015; Miljaković et al., 2020).

O menor desempenho das plantas inoculadas com o isolado UFRB FA34C2-2 e EC é atribuído ao fato de os mecanismos de promoção do crescimento variarem, dependendo da espécie de BPCV (Ahmad et al., 2006). Além disso, os isolados podem

diferir na sua contribuição para a fixação de nitrogênio. Os isolados de *Achromobacter spanius* têm a capacidade de solubilizar fosfato, produzir ácido indolacético, exopolissacarídeos e sideróforos, mas a capacidade de fixação de nitrogênio tem apresentado resultados variáveis, tanto positivos (Verma et al., 2019) quanto negativos (Ahmad et al., 2006; Samet et al., 2022).

Apesar dos resultados de UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial terem sido inferiores a UFRB FA72A2-1, nessas plantas, a adição de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas favoreceu o aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos (Fig. 4), altura (Fig. 1A), diâmetro de caule (Fig. 1B) e massa seca total para estirpe comercial (Fig. 2B). Dessa forma, a aplicação de substâncias húmicas até a dose de 3,0 L ha⁻¹, em combinação com bactérias menos eficientes no fornecimento de N, melhora seus efeitos sobre o crescimento de plantas de milho. Possivelmente, isso está relacionado a alterações químicas na rizosfera promovidas pelas substâncias húmicas, que ocasionam maior emergência de raízes laterais e aumento do número de sítios mitóticos, contribuindo para colonização das plantas por bactérias diazotróficas (Conceição et al., 2009; Da Silva Lima et al., 2014). Resultados positivos do uso conjunto de bactérias diazotróficas e ácidos húmicos em milho também foi relatado por De Oliveira Araújo et al. (2016) com aumento na altura da planta, no diâmetro do caule e no comprimento e volume da raiz. Neste estudo, aplicações isoladas de substâncias húmicas, nas doses de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹, também resultaram em maior massa seca da parte aérea das plantas de milho (Fig. 2A).

A interação entre bactérias promotoras de crescimento de plantas e substâncias húmicas também ocasiona mudanças químicas na rizosfera que podem resultar em maior crescimento radicular e absorção de nutrientes (Olivares et al., 2017). Substâncias húmicas melhoram a absorção de nutrientes pelas plantas por meio da ativação da enzima H⁺-ATPase que aumenta o gradiente eletroquímico de prótons e impulsiona o transporte de íons através das membranas celulares (Baldotto et al., 2009). Além disso, podem formar complexos com íons metálicos, o que aumenta a disponibilidade de nutrientes, como fósforo, zinco, manganês, cobre e ferro (García et al., 2016). Em nosso estudo, o uso das substâncias húmicas em plantas de milho inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas não resultou em maior desenvolvimento radicular (Tabela 3), e maior aquisição dos nutrientes P e N. Possivelmente, isso se deve ao fato de o efeito positivo das substâncias húmicas na absorção de nutrientes ocorrer principalmente quando esses nutrientes são limitados no solo. Neste estudo, as plantas foram supridas de acordo com a necessidade da cultura. Além disso, bactérias promotoras de crescimento

de plantas contribuem para o fornecimento de N às plantas e absorção de P (Glick, 2012).

Os resultados deste estudo reforçam a importância da realização de novas pesquisas em busca de tecnologias alternativas e/ou associação destas na promoção do crescimento vegetal. O objetivo é melhorar os processos fisiológicos das plantas e a aquisição de nutrientes, tornando os sistemas agrícolas mais sustentáveis e economicamente viáveis. Neste estudo, a aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas em plantas inoculadas com o isolado UFRB FA34C2-2 e a estirpe comercial resultou em efeitos aditivos, levando para melhorias no desenvolvimento do milho.

5. Conclusões

A inoculação com o isolado UFRB FA72A2-1 melhorou o crescimento das plantas, aliado ao elevado teor de nitrogênio foliar, clorofila total, carotenoides e taxa fotossintética. No caso das plantas inoculadas com UFRB FA34C2-2 e estirpe comercial, a aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resultou em aumento de pigmentos fotossintéticos e crescimento das plantas. Este estudo ressalta o potencial da utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas associadas com substâncias húmicas para melhorar o crescimento das plantas de milho. O efeito da aplicação, combinada de substâncias húmicas com bactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de milho, depende da dose da substância húmica e das espécies envolvidas. Mais investigações são necessárias para se obter uma compreensão mais abrangente dessa complexa relação.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não têm conflitos de interesses financeiros ou relações pessoais conhecidas que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Declaração de contribuição de autoria

Elismar Pereira de Oliveira: Redação do rascunho original, revisão de redação e edição, curadoria de dados, análise formal, investigação, metodologia; **Poliana Prates de Souza Soares:** Análise formal, revisão de redação e edição; **Andreza de Jesus Correia:** Curadoria de dados. **Robson Silva da Franca:** Análise formal. **Divino Levi Miguel:** Análise formal, visualização. **Rafaela Simão Abrahão Nóbrega:** Supervisão,

metodologia, revisão de redação e edição. **Patrícia Lopes Leal:** Supervisão, metodologia, revisão e edição de redação.

Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Rafaela Simão Abrahão Nobrega, pelo fornecimento dos isolados de bactérias utilizados neste estudo (UFRB BA72A2.1 e UFRB FA342.2); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pela concessão de bolsa a EPO; à *Koppert Biological Systems* e Agroindustria Ferrari, pelo fornecimento de seus produtos (Azokop® e Ecohumic®) usados no estudo; à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo apoio à pesquisa.

Referências

- Aguiar, N.D.O., Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Zandonadi, D.B., Olivares, F.L., Façanha, A.R., 2009. Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 33, 1613–1623. doi:10.1590/S0100-06832009000600010.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Aqil, F., Ahmed Wani, A., Sousche, Y.S., 2006. Plant growth promoting potential of free-living diazotrophs and other rhizobacteria isolated from Northern Indian soil. *Biotechnol. J.* 1 (10), 1112–1123. doi:10.1002/biot.200600132.
- Araújo, E.D.O., Mercante, F.M., Vitorino, A., Nunes, D., Paim, L., Mendes, D., 2013. Produtividade do milho em resposta a aplicação de nitrogênio e à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Embrapa Agropecuária Oeste- Artigo em Anais de Congresso (ALICE) Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, 34, 2013, Florianópolis. Ciência do solo: para quê e para quem: anais. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/966908/1/CBCSARAUIJOPRODUTIVIDADE.pdf> (Acessado 08 Fevereiro de 2023).
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24 (1). doi:10.1104/pp.24.1.1.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Giro, V.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R., 2009. Performance of ‘Victoria’ pineapple in response to humic acid application during acclimatization. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 33, 979–990. doi:10.1590/S0100-06832009000400022.
- Baldotto, M.A., DE Melo, R.O., Baldotto, L.B., 2019. Field corn yield in response to humic acids application in the absence or presence of liming and mineral fertilization. *Semin. Cienc. Agrar.* 40, 3299–3304. doi:10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3299.
- Barilli, D.R., Tsutsumi, C.Y., May, A., Miranda, A.M., Hachmann, T.L., Modonlon, T.A., 2011. Eficiência na inoculação do milho com *Azospirillum brasilense* em

- diferentes períodos antes da semeadura. *Cadern. Agroecol.* 6 (2), 1–5. <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/view/11724>.
- Batista, V.V., Adami, P.F., Ferreira, M.L., Giacomel, C.L., Silva, J.S., Oligini, K.F., 2018. Humic/fulvic acid and nitrogen in the corn crop yield. *Rev. Bras. Eng. Biosist.* 12, 257–267. doi:10.18011/bioeng2018v12n3p257-267.
- Borcioni, E., Mógor, Á.F., Pinto, F., 2016. Influence of the application of fulvic acid on seedling root growth and yield in lettuce. *Rev. Cienc. Agron.* 47, 509–515. doi:10.5935/1806-6690.20160061.
- Bowden, C.L., Evanylo, G.K., Zhang, X., Ervin, E.H., Seiler, J.R., 2010. Soil carbon and physiological responses of corn and soybean to organic amendments. *Compost Sci. Util. Emmaus* 18, 162–173. doi:10.1080/1065657X.2010.10736952.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Regras Para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Mapa/ACS, Brasília, DF, p. 399.
- Braulio, C.S., 2023. Microrganismos na Promoção de Crescimento de feijão-Caupi e Maracujazeiro e no Controle de Fusariose. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, p. 142.
- Burlakovs, J., Kļaviņš, M., Osinska, L., Purmalis, O., 2013. The impact of humic substances as remediation agents to the speciation forms of metal in soil. *APCBEE Procedia* 5, 192–196. doi:10.1016/j.apcbee.2013.05.034.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 1 (3). doi:10.1186/2196-5641-1-3.
- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R., 2010. Composição química e propriedades de bioatividade de frações granulométricas separadas de um vermicomposto ácido húmico. *Chemosphere* 78 (4), 457–466. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.018.
- Canellas, L.P., Santos, G.A., 2005. HUMOSFERA, tratado Preliminar Sobre a Química das Substâncias Húmicas. UENF.
- Carmo, C.D.S., De Araujo, W.S., Bernardi, A.D.C., Saldanha, M.F.C., 2000. Métodos de Análise de Tecidos Vegetais Utilizados na Embrapa Solos.
- Caron, V.C., Graças, J.P., Castro, P.R.C., 2015. Condicionadores do Solo: Ácidos Húmicos e Fúlvicos. ESALQ/USP, Piracicaba.
- Carvalho, T.L.G., Balsemão-Pires, E., Saraiva, R.M., Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., 2014. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J. Exp. Bot.* 65 (19), 5631–5642. doi:10.1093/jxb/eru319.
- Casaroli, D., Van Lier, Q.J., 2008. Critérios para determinação da capacidade de campo. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 32, 59–66. doi:10.1590/s0100-06832008000100007.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2022. Série Histórica Das Safras. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>. (Acessado 08 Novembro de 2022)
- Conceição, P.M., Vieira, H.D., Canellas, L.P., Marques-Júnior, R.B., Olivares, F.L., 2008. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesq. Agropec. Brasil.* 43 545-8 doi:10.1590/S0100-204x2008000400015.

- Conceição, P.M.D., Vieira, H.D., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Conceição, P.S.D., 2009. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. *Ciênc. Rural* 39 1880-188 doi:10.1590/S010384782009005000137.
- Da Silva Lima, L., Olivares, F.L., De Oliveira, R.R., Vega, M.R.G., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2014. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 23 (1). doi:10.1186/s40538-014-0023-z.
- Dartora, J., Guimarães, V.F., Marini, D., Sander, G., 2013. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.* 17, 1023–1029. doi:10.1590/S1415-43662013001000001.
- De Oliveira, A.É., Rocha, J.R., Gerola, J.G., Matte, L.C., 2016. Diazotrophic bacteria inoculation associates with acids and nitrogen in corn. *Afr. J. Plant Sci.* 10, 162–166. doi:10.5897/AJPS2016.1394.
- Demétrio, C.S., Fornasieri Filho, D., Cazetta, J.O., Cazetta, D.A., 2008. Desempenho de híbridos de milho submetidos a diferentes espaçamentos e densidades populacionais. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43, 1691–1697. doi:10.1590/S0100-204x2008001200008.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa SPI.
- Doornbos, R.F., Van Loon, L.C., Bakker, P.A., 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 227–243. doi:10.1007/s13593-011-0028-y.
- Dotto, A.P., Lana, M.D.C., Steiner, F., Frandoloso, J.F., 2010. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. *Rev. Bras. Cienc. Agrar.* 5, 376–382. <https://www.redalyc.org/pdf/1190/119016971016.pdf>.
- Duarte, J.O., Garcia, J.C., Miranda, R.A., 2011. Sistema de Produção: Cultivo do Milho. 7th ed. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_7ed/economia.htm (Accessed 4 January 2023).
- Edmond, J.B., Drapala, W.J., 1958. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 71, 428–434.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, 2011. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). p. 230 Manual de Métodos de Análise de Solo. Rio de Janeiro.
- Filho, J.F.D.C.L., Thomason, W.E., Evanylo, G.K., Zhang, X., Strickland, M.S., Chim, B.K., Bermand, C., Diatta, A., 2020. Corn response to an Integrated Plant Nutrition System (IPNS) with humic acid and biofertilizers. *J Agric Sci* 12, 25–41. doi:10.5539/jas.v12n8p25.
- Furbeck, S.M., Bourland, F.M., Watson, C.E., 1993. Relationship of seed and germination measurements with resistance to seed weathering cotton. *Seed Sci. Technol.* 21 (3), 505–512. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=4008726>.
- García, A.C., Santos, L.A., de Souza, L.G.A., Tavares, O.C.H., Zonta, E., Gomes, E.T.M., Garcia-Mina, J.M., Berbara, R.L.L., 2016. Vermicompost humic acids modulate the

- accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *J. Plant Physiol.* 192, 56–63. doi:10.1016/j.jplph.2016.01.008.
- Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 963401. doi:10.6064/2012/963401.
- Huang, X.-F., Zhou, D., Manter, D.K., Reardon, K.F., Vivanco, J.M., 2015. *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *J. Appl. Microbiol.* 118 (3), 672–684. doi:10.1111/jam.12720.
- Jian, L., Bai, X., Zhang, H., Song, X., Li, Z., 2019. Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* under copper and zinc stress. *PeerJ* 7, e6875. doi:10.7717/peerj.6875.
- Maguire, J.D., 1962. Speeds of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2 (2), 176–177.
- Miljaković, D., Marinković, J., Balešević-Tubić, S., 2020. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* 8 (7), 1037. doi:10.3390/microorganisms8071037.
- Moreira, F.M.S., Lima, A.S., Jesus, E.C., Silva, K.Da., Nóbrega, R.S.A., Florentino, L.A., 2013. Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que nodulam leguminosas. In: Moreira, F.M.S., Cares, J.E., Zanetti, R., Stürmer, S.L. (Eds.), *O ecossistema Solo: Componentes, Relações Ecológicas e Efeitos Na Produção Vegetal*. Ed. UFLA, Lavras, pp. 327–340.
- Naamala, J., Jaiswal, S.K., Dakora, F.D., 2016. Antibiotics resistance in rhizobium: type, process, mechanism and benefit for agriculture. *Curr. Microbiol.* 72, 804–816. doi:10.1007/s00284-016-1005-0.
- Nardi, S., Schiavon, M., e Francioso, O., 2021. A estrutura química e a atividade biológica das substâncias húmicas definem seu papel como promotores de crescimento vegetal. *Molecules* 26 (8), 2256. doi:10.3390/molecules26082256.
- Olivares, F.L., Busato, J.G., De Paula, A.M., Da Silva Lima, L., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2017. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 1–13. doi:10.1186/s40538-017-0112-x.
- Omeiri, M., Khnayzer, R., Yusef, H., Tokajian, S., Salloum, T., Mokh, S., 2022. *Bacillus* spp. isolated from soil in Lebanon can simultaneously degrade methomyl in contaminated soils and enhance plant growth. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 39, 102280. doi:10.1016/j.bcab.2022.102280.
- Pankiewicz, V.C.S., Do Amaral, F.P., Ané, J.M., Stacey, G., 2021. Diazotrophic bacteria and their mechanisms to interact and benefit cereals. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3 (5), 491–498. doi:10.1094/MPMI-11-20-0316-FI.
- Pereira, M.G., Santos, C.E., Freitas, A.D., Stamford, N.P., Rocha, G.S., Barbosa, A.T., 2013. Interações entre fungos micorrízicos arbusculares, rizóbios e actinomicetos na rizosfera de soja. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* 17 (12), 1249–1256. doi:10.1590/S1415-43662013001200001.
- Ribeiro, A.C., Guimaraes, P.T.G., Alvares, V.H., 1999. *Recomendações Para o Uso de Corretivos e Fertilizantes Em Minas Gerais: 5º Aproximação*. UFV, Viçosa-MG.
- Ribeiro, S.S., 2014. Cultura do milho no Brasil. *Rev. Científ. Semana Acad.* 49, 1–13.
- Rodrigues, L.A., Alves, C.Z., Rego, C.H.Q., Silva, T.R.B.D., Silva, J.B.D., 2017. Humic acid on germination and vigor of corn seeds. *Rev. Caatinga* 30, 149–154.

doi:10.1590/1983-21252017v30n116rc.

- Samet, M., Ghazala, I., Karray, F., Abid, C., Chiab, N., Nouri-Ellouz, O., Sayadi, S., Gargouri-Bouzid, R., 2022. Isolation of bacterial strains from compost teas and screening of their PGPR properties on potato plants. *Sci. Pollut. Res.* 29, 75365–75379. doi:10.1007/s11356-022-21046-8.
- Sangoi, L., Da Silva, L.M.M., Mota, M.R., Panison, F., Schmitt, A., De Souza, N.M., Giordani, W., Schenatto, D.E., 2015. Desempenho agronômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 39, 1141–1150. doi:10.1590/01000683rbcs20140736.
- Santos, J.F.D., Sacramento, B.L.D., Mota, K.N.A.B., Souza, J.T.D., Azevedo Neto, A.D.D., 2014. Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. *Pesq. Agropec. Trop.* 44, 142–150. doi:10.1590/S1983-40632014000200008.
- Shah, Z.H., Rehman, H.M., Akhtar, T., Alsamadany, H., Hamooh, B.T., Mujtaba, T., Daur, I., Zahrani, Y.A., Alzahrani, H.A.S., Ali, S., Yang, S.h., Chung, G., 2018. Humic substances: determining potential molecular regulatory processes in plants. *Front. Plant Sci.* 9, 263. doi:10.3389/fpls.2018.00263.
- Sousa, J.X., 2017. Promoção do Crescimento Vegetal por Bactérias Diazotróficas No Feijão-Caupi. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, p. 73 Dissertação (Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas).
- Trinh, L.L., Le Nguyen, A.M., Nguyen, H.H., 2023. Root-associated bacteria *Bacillus albus* and *Bacillus proteolyticus* promote the growth of peanut seedlings and protect them from the aflatoxigenic *Aspergillus flavus* CDP2. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 47, 102582. doi:10.1016/j.bcab.2022.102582.
- USDA - United States Department Of Agriculture, 2021. World Agricultural Production. <https://www.fiesp.com.br/arquivo-download/?id=273518> (Acessado 06 Setembro de 2022).
- Valiente-Banuet, A., Aizen, M.A., Alcántara, J.M., Arroyo, J., Cocucci, A., et al., 2015. Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Funct. Ecol.* 29 (3), 299–307. doi:10.1111/1365-2435.12356.
- Vargas, L., De Carvalho, T.L.G., Ferreira, P.C.G., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Hemerly, A.S., 2012. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. *Plant Soil* 356, 127–137. doi:10.1007/s11104-012-1274-8.
- Verlinden, D., Pycke, B., Mertens, J., Debersaques, F., Verheyen, K., Baert, G., Bries, J., Haesaert, G., 2009a. Application of humic substances results in consistent increases in crop yield and nutrient uptake. *J. Plant Nutr.* 32, 1407–1426. doi:10.1080/01904160903092630.
- Verma, P., Yadav, A.N., Khannam, K.S., Mishra, S., Kumar, S., Saxena, A.K., Suman, A., 2019. Appraisal of diversity and functional attributes of thermotolerant wheat associated bacteria from the peninsular zone of India. *Saudi J. Biol. Sci.* 26 (7), 1882–1895. doi:10.1016/j.sjbs.2016.01.042.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144 (3), 307–313. doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2.

ARTIGO II

Bactérias promotoras de crescimento vegetal e substâncias húmicas promovem alterações bioquímicas e de emergência em plantas de milho*

* **Situação:** Não submetido

Bactérias promotoras de crescimento vegetal e substâncias húmicas promovem alterações bioquímicas e de emergência em plantas de milho

Resumo

Antecedentes: Neste estudo, avaliou-se a emergência e características morfofisiológicas de plantas jovens de milho sob inoculação de diferentes bactérias promotoras de crescimento vegetal, aplicação de doses de substâncias húmicas e combinação bactéria + substâncias húmicas. O experimento foi desenvolvido em campo, utilizando-se tratamentos com a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (UFRB FA72A2-1 (*Bacillus proteolyticus*), UFRB FA34C2-2 (*Achromobacter spanius*), estirpe comercial e sem inoculação), em diferentes doses de substâncias húmicas (SH) (0,0; 1,5 e 3,0 L ha⁻¹), adicionalmente, utilizou-se uma testemunha com nitrogênio, resultando em 52 parcelas experimentais. Durante a fase de emergência das plântulas, avaliou-se a porcentagem de emergência, velocidade de emergência, índice de velocidade de emergência e coeficiente de velocidade de emergência. Após 25 dias de emergência, avaliou-se altura de planta, diâmetro de colmo, massa seca da parte aérea e teores de clorofila total, carotenoides, açúcares totais e redutores, amido e prolina.

Resultados: A inoculação com bactérias promotoras de crescimento não resultou em alterações significativas nas características de emergência comparada às plantas não inoculadas, exceto para velocidade de emergência, que foi maior sob inoculação com estirpe comercial. Efeito significativo da interação entre os fatores SH x BPCV foi observado sobre os teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, amido e prolina.

Conclusões: O uso de substâncias húmicas melhorou a porcentagem de emergência e os índices de velocidade de emergência. Plantas inoculadas com *Achromobacter spanius* e tratadas com 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas apresentaram maior teor de açúcares solúveis totais e redutores, respectivamente. Plantas inoculadas com *Azospirillum brasiliense* apresentaram maior teor de amido ao receber 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas.

Palavras-chave: *Bacillus* spp., *Achromobacter* spp., biofertilizantes, *Zea mays*.

Introdução

O solo desempenha um papel fundamental no ecossistema, regulando processos naturais e oferecendo funções essenciais para o habitat dos seres vivos que nele habitam (Greiner et al. 2017; Greiner et al. 2018). A qualidade do solo é crucial para garantir a sustentabilidade das culturas, influenciando diretamente na saúde das plantas, animais e, consequentemente, dos seres humanos (Melo et al. 2017).

A diversidade e quantidade de microrganismos no solo são vastas, além de desempenharem um papel fundamental nos processos microbiológicos e bioquímicos, sendo essencial para os ciclos biogeoquímicos e para o funcionamento dos ecossistemas (Bell et al. 2005). Os organismos mais abundantes e os mais versáteis são as bactérias, cuja população varia de 10^6 a 10^9 por grama de solo (Mattos 2016).

Muitas dessas bactérias estão presentes na rizosfera, possuem a capacidade de promover o crescimento das plantas e, por isso, são chamadas de bactérias promotoras de crescimento vegetal ou BPCV. Além dos organismos que habitam a rizosfera, as BPCV também englobam diversas cepas de rizóbios, que formam nódulos nas raízes de plantas específicas, como as leguminosas e endófitos, que podem existir nos tecidos internos de uma planta (Santoyo et al. 2016); sendo, portanto, encontradas em associação com grande número de espécies de cereais e gramíneas forrageiras, com uma grande quantidade de gêneros descritos, incluindo *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (Hungria et al. 2010; Videira et al. 2012; Liu et al. 2017; Duarte et al. 2020).

Existem trabalhos relacionados a efeitos diretos e indiretos na promoção do crescimento das plantas, causados por *Bacillus proteolyticus*, por meio da solubilização de fosfato no solo, produção de sideróforos, tolerância significativa ao estresse de temperatura, seca e salinidade, além de melhorar a germinação de *Phaseolus vulgaris* L. (Meza et al. 2022), maior emergência, maior crescimento, associado ao maior teor foliar de N, maiores teores de pigmentos fotossintéticos e fotossíntese líquida em plantas de milho (De Oliveira et al. 2024); e por *Achromobacter spanius* com aumento no número de perfilhos, germinação de sementes, altura de planta e número de folhas em plantas de sorgo (Sudana et al. 2020) e maior emergência de plântulas de milho (De Oliveira et al. 2024).

Além desses microrganismos, o solo pode ser enriquecido por substâncias resultantes da decomposição da matéria orgânica, tais como as substâncias húmicas, que

contribuem significativamente para as características biológicas, de fertilidade e estruturação do solo e também das plantas. No entanto, seus efeitos variam entre as espécies vegetais, que respondem de forma diferente, quanto à dose e ao método de aplicação, em cada fase de desenvolvimento (Canellas et al. 2010; Nardi et al. 2021; De Oliveira 2023). Dessa forma, a compreensão do mecanismo pelo qual o ácido húmico promove o crescimento vegetal ainda não é bem elucidada, e os efeitos benéficos nas plantas são desafiadores, devido à sua complexidade química (Muscolo et al. 2007).

Diante da importância desses componentes do solo, compreender sua interação e influência no crescimento das plantas torna-se essencial para a eventual utilização e comercialização em larga escala, como bioinsumos, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de sistemas agrícolas mais sustentáveis, ou seja, garantir a eficiência de uso da terra e diminuir a dependência de fertilizantes sintéticos nas culturas agrícolas, como a do milho, incrementando a sua produção e produtividade, aliado à melhoria progressiva da qualidade do solo.

Neste estudo, considerou-se as hipóteses de que: a combinação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e substâncias húmicas tem um efeito sinérgico sobre características morfofisiológicas das plantas de milho com aumento significativo nos parâmetros de emergência de plântulas, crescimento, fisiológicos e bioquímicos em comparação com os tratamentos individuais e com a testemunha. Dessa forma, o estudo objetivou avaliar a emergência e características morfofisiológicas e bioquímicas de plantas jovens de milho sob utilização de diferentes bactérias promotoras de crescimento vegetal, doses de substâncias húmicas e combinação bactéria + substâncias húmicas.

Material e métodos

Caracterização da área experimental

O estudo foi realizado em condições de campo, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, *campus* de Vitória da Conquista [latitude (14°88'63"S) e longitude (40°80'13"W)], no período de 29 de maio a 29 de junho de 2023. Durante a condução do experimento, a temperatura oscilou entre 10,1 °C (mínima) a 27,7 °C (máxima) e apresentou uma precipitação acumulada de 6,4 mm (Fig. 1), com insolação média de 5,9 h dia⁻¹ e umidade média de 91,2%.

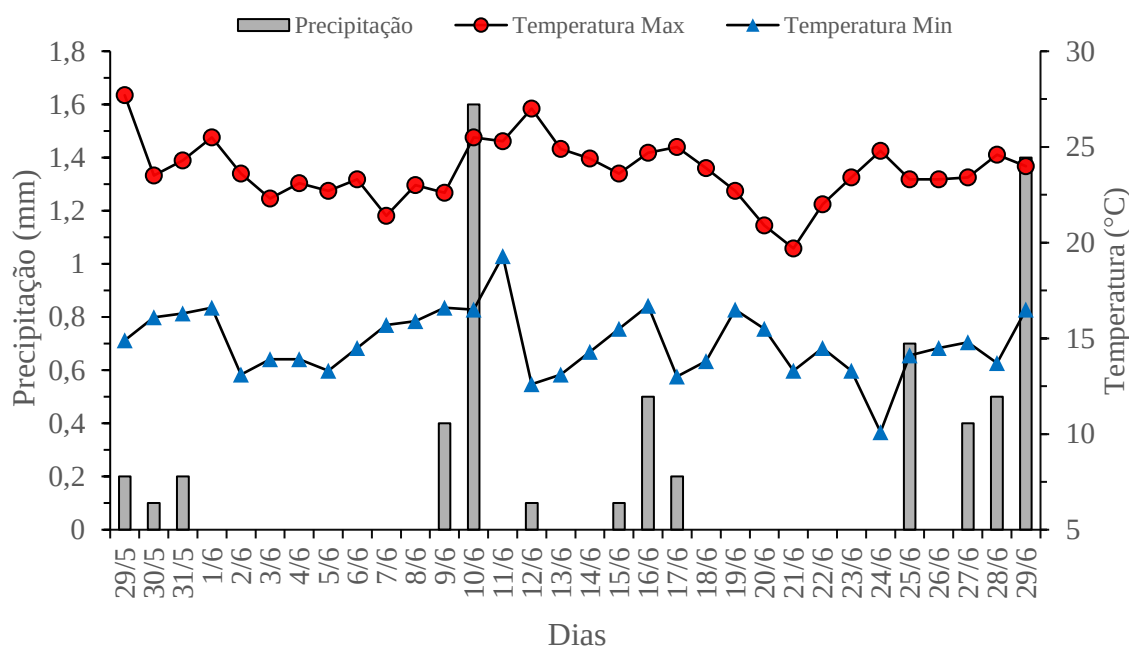


Fig. 1 - Condições climáticas no período de condução do experimento (maio/junho de 2023).

Características físicas e químicas do solo

O experimento foi conduzido em uma área com histórico de cultivo de milho. Amostras de solo foram coletadas em profundidade de 0,0 – 0,20 m, secas ao ar e peneiradas em malhas de 2 mm, e uma porção de 400 g foi retirada para análises físicas e químicas, as quais foram efetuadas de acordo com as metodologias adotadas por Teixeira et al. (2017), com resultados descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química e física do solo da área experimental

Análise química do solo													
pH	mg dm ⁻³	----- cmol _c dm ⁻³ de solo -----								%		g dm ⁻³	g Kg ⁻¹
(H ₂ O)	*P	*K ⁺	**Ca ²⁺	**Mg ²⁺	**Al ³⁺	***H ⁺	SB	t	T	V	m	MO	COT
5,4	31	0,09	2,0	0,5	0,2	3,2	2,6	2,8	6,0	43	7	16	9,28
Análise física do solo													
Frações		Composição Granulométrica (g Kg ⁻¹ de TFSA)										Classe textural	
totais da amostra %													
Terra fina < 2 mm		Areia grossa 2-0,20 mm		Areia fina 0,20-0,05 mm		Silte 0,05-0,002 mm		Argila < 0,002 mm					
100		550		170		20		260		Argilo-arenoso			

*Extrator Mehlich I; ** Extrator KCl 1N; ***CaCl₂ 0,01M; SB = Soma de base; t = CTC efetiva; T = CTC a pH 7; V = Saturação de base; m = Saturação por alumínio; MO = Matéria orgânica; COT = Carbono orgânico total; e TFSA = terra fina seca ao ar.

Preparo da área experimental

O preparo do solo foi constituído por uma aração e duas gradagens. Os sulcos de plantio foram abertos a uma profundidade de aproximadamente 0,20 m, com espaçamento de 0,80 m entre linhas, 0,90 m entre as parcelas e 1,60 m entre blocos. Cada parcela foi composta por seis linhas de plantio de 3,20 m de comprimento. O sistema de irrigação foi montado mediante a instalação de fitas gotejadoras de 0,20 m de espaçamento e vazão de 2 L h⁻¹.

Preparo do inoculante bacteriano

As bactérias utilizadas foram a UFRB FA72A2-1 (*Bacillus proteolyticus*) e UFRB FA34C2-2 (*Achromobacter spanius*), isoladas de solo com histórico de despejo de manuseio fresca, caracterizadas e identificadas (Sousa 2017; Braulio 2023) e testadas previamente em plantas de milho, em condições de casa de vegetação. Os isolados bacterianos foram multiplicados em meio 79 líquido com manitol (Döbereiner et al. 1999), à temperatura de 28 °C, até 90h. Aliquotas de 5 mL do meio foram retiradas para determinação de densidade celular e do valor de pH. Os métodos utilizados para quantificar a densidade celular (UFC.mL⁻¹) foi o de diluição seriada, seguido de espalhamento em placas contendo meio 79 sólido e por leitura da absorbância (565 nm) do meio, utilizando um espectrofotômetro marca Hitachi, modelo U-2001 UV/Vis.

A partir dos dados obtidos, foi construída uma curva de crescimento bacteriano, na qual identificou-se o pico máximo da fase exponencial de crescimento de *B. proteolyticus* e *A. spanius*, às 48h e 86h de tempo de incubação, respectivamente. A produção do inoculante bacteriano foi conduzida em meio 79 líquido com manitol. Além dessas bactérias, foi utilizado também o inóculo comercial Azokop[®], composto com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 de *Azospirillum brasiliense* e recomendado para a cultura do milho.

Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial 4 x 3, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto por tratamentos com a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (*B. proteolyticus*, *A. spanius*),

inóculo comercial e sem inoculação; e o segundo fator, por diferentes doses de substâncias húmicas - Ecohumic® (0,0; 1,5 e 3,0 L ha⁻¹) e uma testemunha com nitrogênio, resultando, assim, em 52 parcelas experimentais. As doses de substâncias húmicas adotadas foram baseadas em resultados preliminares obtidos em experimento com milho em vasos, em casa de vegetação.

Plantio e adubação

Para o plantio, foram utilizadas sementes do milho híbrido AG 1051, de ciclo semiprecoce com maturação fisiológica de 133-139 dias, com potencial produtivo para silagem, milho verde e produção de grãos. As sementes destinadas aos tratamentos bacterianos foram tratadas antes da semeadura, com solução inoculante (densidade celular de 10⁸ UFC.mL⁻¹) e deixadas secar à sombra. O inoculante comercial foi aplicado nas sementes, usando-se 100 mL para 60.000 sementes, conforme as recomendações do fabricante. A aplicação das bactérias *B. proteolyticus* e *A. spanius* foi realizada adotando-se as recomendações do inóculo comercial.

Dez sementes foram semeadas por m⁻¹ linear a uma profundidade de aproximadamente 0,03 m. As diferentes doses de substâncias húmicas foram diluídas em 4 L de água e aplicadas sobre as sementes no sulco de plantio, com o auxílio de um pulverizador costal, nos respectivos tratamentos. O composto húmico utilizado continha 10% de Carbono Orgânico Total, 13% de Ácido Húmico, 17% Ácido Fúlvico, 0% de Humina, 10 gL⁻¹ nitrato de potássio, 7,0 gL⁻¹ de sulfato de cobre, 7,0 gL⁻¹ de ácido bórico e 0,5 gL⁻¹ de espessante.

A adubação foi realizada utilizando-se 20 Kg ha⁻¹ de N no plantio, aplicada apenas no tratamento testemunha de N, tendo como fonte o nitrato de cálcio. O fornecimento de P foi de 30 Kg ha⁻¹, sendo aplicado e incorporado no sulco de todas as parcelas antes do plantio. A fonte utilizada foi o superfosfato simples. As adubações foram realizadas conforme a análise de solo e a recomendação para a cultura, visando uma produtividade de 4 a 6 t ha⁻¹ (Ribeiro et al. 1999).

Características avaliadas da cultura do milho

A primeira avaliação iniciou-se a partir do sétimo dia de implantação do experimento, que correspondeu ao primeiro dia de emergência das plântulas, e estendeu-se até o 16º dia, após a semeadura (estabilização de emergência das plântulas). Nesse período, foram avaliadas a porcentagem de emergência, velocidade de emergência

(Edmond e Drapala 1958), índice de velocidade de emergência (Maguire 1962) e coeficiente de velocidade de emergência (Furbeck et al. 1993). Considerou-se como plântulas emergidas as que apresentaram coleóptilo acima do solo. Os resultados foram expressos em porcentagem média, conforme os critérios estabelecidos pelo Regulamento de Análise de Sementes (Brasil 2009).

O crescimento das plantas foi avaliado aos 25 dias após a emergência (estádio fenológico entre V4 e V5), sendo levada em consideração a altura obtida pela medição de 12 plantas selecionadas aleatoriamente dentro das quatro linhas centrais de cada parcela, quando foi considerada a base no nível do solo até a altura máxima da planta, mensurada com o auxílio de uma régua graduada em centímetros e o diâmetro de colmo mensurado na parte basal da planta, com o auxílio de um paquímetro digital com valores expressos em mm.

Para avaliar a produção de massa seca da parte aérea, foram coletadas 10 plantas de forma aleatória dentro de cada parcela, e separadas a parte aérea das raízes. A parte aérea das plantas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C, até atingirem peso constante. Os valores de massa seca foram obtidos pesando-se o material vegetal seco em balança digital de precisão.

A determinação dos teores dos pigmentos fotossintéticos foi realizada a partir da coleta de quatro discos foliares (7 mm de diâmetro) e colocados em um tubo contendo 5 mL de acetona (80%), por 48h, em ambiente escuro, para extração dos pigmentos (Arnon 1949). Posteriormente, foram determinados em espectrofotômetro os valores de clorofila *a*, *b* e carotenoides (Wellburn 1994).

Os teores de açúcares solúveis totais e redutores, amido e prolina foram quantificados a partir de extratos obtidos da parte aérea das plantas, previamente secas e moídas em moinho de facas com peneiras de 1 mm. Os teores de açúcares solúveis totais foram quantificados pelo método da antrona (Yemm e Willis 1954). Para a quantificação dos teores de açúcares redutores, utilizou-se o método proposto por Miller (1959). O teor de amido foi determinado pelo método especificado na Instrução Normativa nº 20 (Brasil 1999) e de prolina pelo método recomendado por Bates et al. (1973).

Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Lilliefors) e homogeneidade (Cochran e Bartlett) e, em seguida, realizada a análise de variância (F a 0,05), sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey, a 5% de

probabilidade, usando-se o *software* R, versão 4.0.2 (R *Foundation for Statistical Computing*, Áustria).

Resultados

Os tratamentos experimentais envolvendo o uso de substâncias húmicas (SH) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), em diferentes doses de aplicações, exerceram efeitos significativos e isolados sobre as variáveis atribuídas à germinação das plântulas de milho: velocidade de emergência, índice de velocidade de emergência e coeficiente de velocidade de emergência (Tabela S1). Por outro lado, a porcentagem de emergência foi influenciada ($p < 0,05$) apenas pelo uso das substâncias húmicas (Tabela S1).

Efeito significativo da interação entre os fatores SH x BPCV foi observado sobre os teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, amido e prolina. Já para as variáveis altura de planta, diâmetro de colmo, massa seca da parte aérea, clorofila total e carotenoides, nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) dos tratamentos foi observado (Tabela S1).

O tratamento adicional, considerada testemunha N, apresentou interação ($p < 0,05$) com o fatorial SH x BPCV para as variáveis velocidade de emergência, índice de velocidade de emergência, coeficiente de velocidade de emergência, açúcares solúveis totais e açúcares redutores (Tabela S1).

A inoculação de BPCV, de forma isolada, exerceu efeitos distintos sobre algumas variáveis relacionadas ao desenvolvimento das plântulas de milho (Fig. 2). Por exemplo, se para porcentagem de emergência nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) tenha sido observada (Fig. 2A), para velocidade de emergência das plantas foi verificado maior valor (12,08), quando inoculadas com a estirpe comercial, comparada ao tratamento sem inoculação, semelhantemente ao tratamento envolvendo inoculação das plantas com as bactérias *B. proteolyticus* e *A. spanius* (12,04 e 12,06, respectivamente) (Fig. 2B). Por outro lado, tratamentos sem inoculação proporcionaram maior índice de velocidade de emergência (95,27) e coeficiente de velocidade de emergência (9,73), quando comparados aos tratamentos que incluíram o uso da estirpe comercial, semelhantes àqueles que utilizaram bactérias *B. proteolyticus* e *A. spanius* (Fig. 2C-D).

Plantas de milho que receberam aplicação de 1,5 L e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas apresentaram maiores médias de porcentagem de emergência, índice de

velocidade de emergência e coeficiente de velocidade de emergência, quando comparadas àquelas sem aplicação de SH ($0,0 \text{ L ha}^{-1}$) (Fig. 2A-C e D). As doses de SH, equivalentes a $1,5$ e $3,0 \text{ L ha}^{-1}$, possibilitaram percentuais de emergência de plântulas de $94,38\%$ e $96,09\%$, respectivamente, enquanto que a não aplicação das substâncias húmicas resultou em $92,87\%$ (Fig 2A). Por outro lado, a velocidade de emergência das plantas apresentou efeito contrário, uma vez que a não aplicação de SH resultou em valor superior aos tratamentos que receberam doses de substâncias húmicas (Fig. 2B).

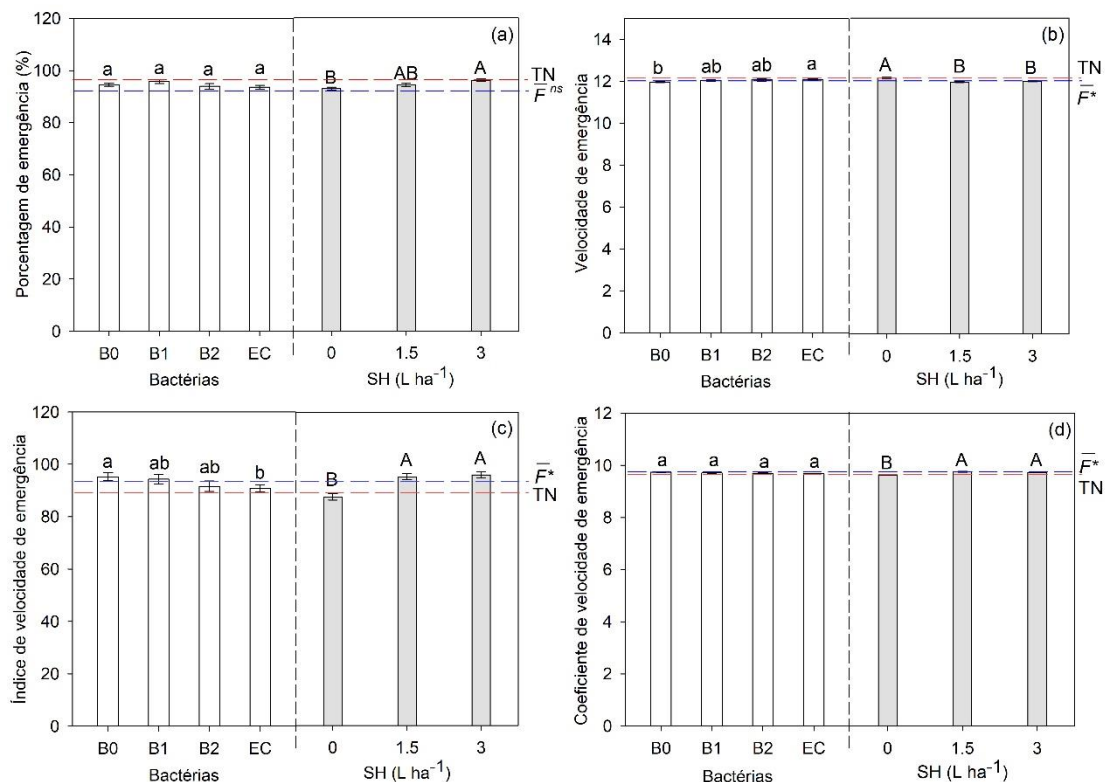


Fig. 2. Porcentagem de emergência (A), velocidade de emergência (B), índice de velocidade de emergência (C) e coeficiente de velocidade de emergência (D) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com *B. proteolyticus* (B1), *A. spanius* (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH). ns = não significativo e * significativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste F, para as médias do fatorial ($\bar{F}$) em relação à testemunha N (TN). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para S.H. $n = 16$).

Nenhum efeito significativo dos tratamentos SH e BPCV foram observados em relação às variáveis altura de planta, diâmetro de colmo, massa seca da parte aérea,

clorofila total e carotenoides (Fig. 3).

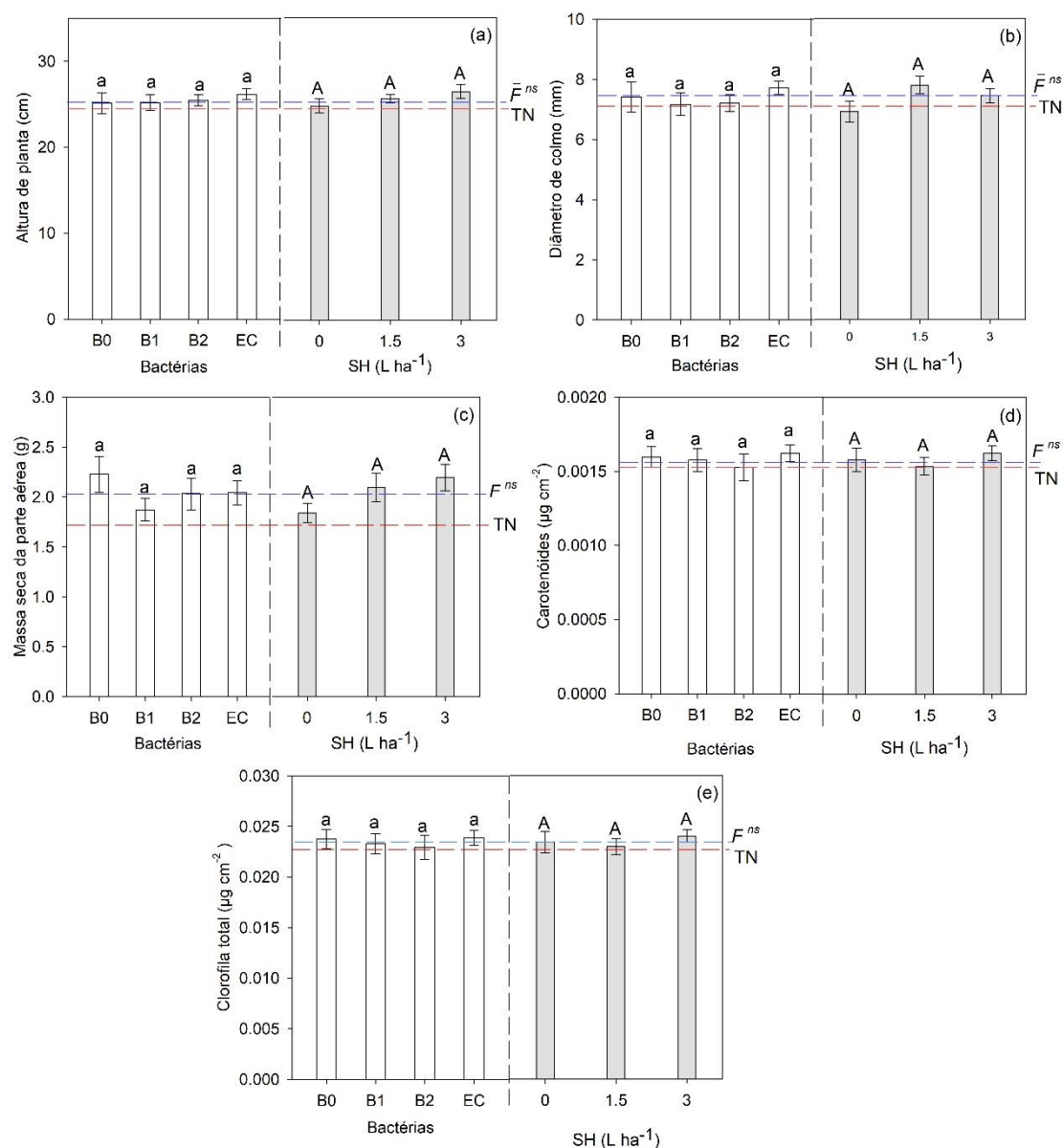


Fig. 3. Altura de planta (A), diâmetro de colmo (B), massa seca da parte aérea (C), carotenoides (D) e clorofila total (E) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com *B. proteolyticus* (B1), *A. spanius* (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH ns = não significativo e * significativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste F, para as médias do fatorial ($\bar{F}$) em relação à testemunha N (TN). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para S.H. $n = 16$).

Plantas de milho não inoculadas e submetidas à aplicação de SH igual a 3,0 L ha⁻¹ apresentaram maior teor de açúcares solúveis totais (1,27 mmol g MS⁻¹). Este valor foi estatisticamente semelhante ao encontrado no tratamento que recebeu a dose de SH igual a 1,5 L ha⁻¹ (1,06 mmol g MS⁻¹), ou seja 25,2% superior ao tratamento sem aplicação de SH (Fig. 4A). Em relação ao teor de açúcares redutores, o menor valor foi registrado para o tratamento com menor dose de aplicação de SH (1,5 L ha⁻¹) (Fig. 4B). Em plantas inoculadas com *B. proteolyticus*, o teor de açúcares solúveis totais foi menor sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas e não houve nenhum efeito significativo para o teor de açúcares redutores (Fig. 4A-B).

Plantas inoculadas com *A. spanius* e submetidas à aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas apresentaram maior teor de açúcares solúveis totais (1,60 mmol g MS⁻¹), quando comparadas às aplicações de SH em doses de 0,0 L ha⁻¹ (1,15 mmol g MS⁻¹) e 3,0 L ha⁻¹ (1,02 mmol g MS⁻¹), correspondendo ao aumento, respectivamente, de 28,12% e 36,25% de açúcares solúveis totais (Fig. 4A). Quando aplicado 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, verificou-se o teor médio de açúcares redutores (0,18633 mmol g MS⁻¹) semelhantemente ao encontrado para o tratamento com dose de 1,5 L ha⁻¹ (0,17765 mmol g MS⁻¹) e superior àquele sem aplicação de SH (0,16231 mmol g MS⁻¹). Essa diferença correspondeu a 12,89% para a dose de 3,0 L ha⁻¹ e 8,63% para a dose de 1,5 L ha⁻¹ (Fig. 4B). Para a testemunha N, verificou-se valores de 1,55 mmol g MS⁻¹ de açúcares solúveis totais e 0,18488 mmol g MS⁻¹ de açúcares redutores (Fig. 4A-B).

Para o tratamento que incluiu a inoculação da estirpe comercial (*A. brasiliense*), a aplicação das substâncias húmicas não influenciou o teor de açúcares solúveis totais e redutores, mas exerceu efeitos distintos sobre o conteúdo de amido nas plantas de milho (Fig. 4C). Doses de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de SH proporcionaram, respectivamente, concentrações de 21,57 e 26,42 mg g MS⁻¹ de amido nas plantas, enquanto a dose de SH, a nível 0,0 L ha⁻¹, resultou em 11,90 42 mg g MS⁻¹. Ou seja, o uso de 3,0 L ha⁻¹ de SH proporcionou 54,96% a mais quanto ao teor de amido nas plantas em relação àquelas que não receberam aplicação de substâncias húmicas (Fig. 4C). Tratamentos que consistiram em plantas não inoculadas, o teor de amido foi menor com a aplicação das substâncias húmicas, o que também ocorreu em plantas inoculadas com *B. proteolyticus* e *A. spanius*, especificamente para aplicação de 3,0 L ha⁻¹ de SH (Fig. 4C).

Maior teor de prolina (0,00549 mmol g MS) foi observado em plantas não inoculadas com BPCV e sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, enquanto menor teor (0,0033 mmol g MS) foi registrado em plantas inoculadas com estirpe

comercial e sob a mesma dose de SH (Fig. 4D). Não houve efeito da aplicação de substâncias húmicas, independentemente das doses, sobre o teor de prolina em plantas inoculadas com *B. proteolyticus* e *A. spanius* (Fig. 4D).

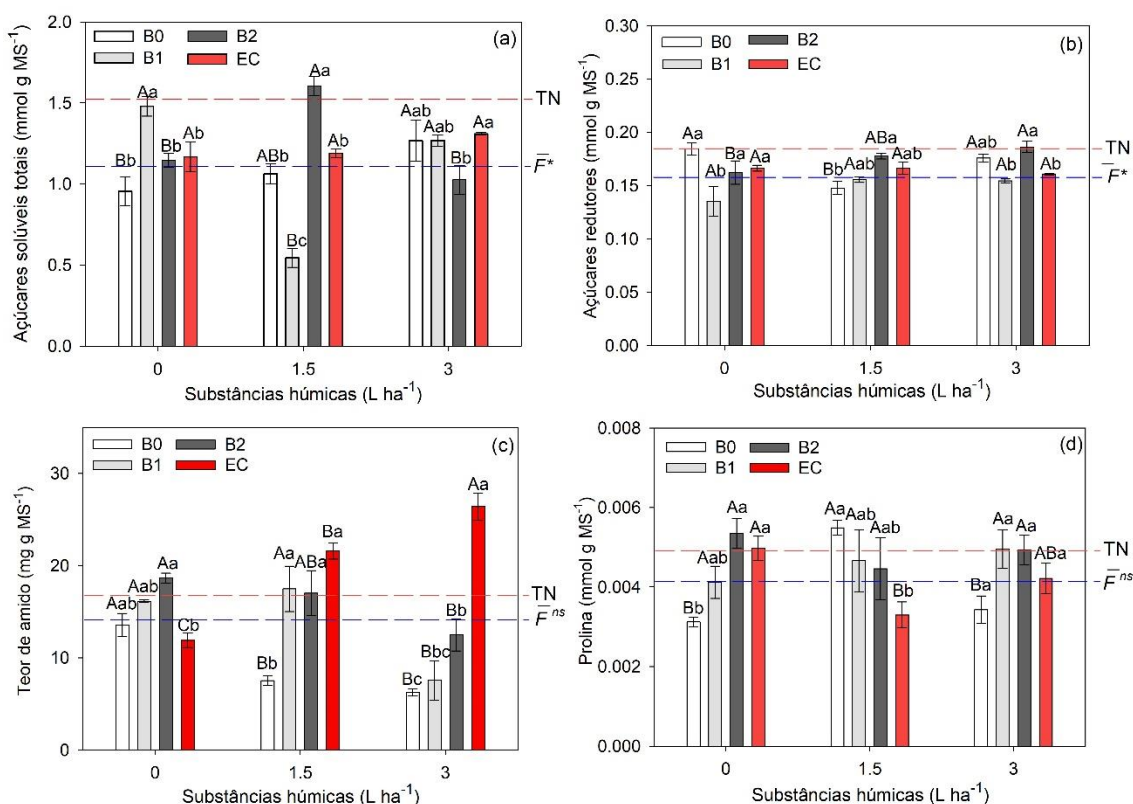


Fig. 4. Açúcares solúveis totais (A), açúcares redutores (B), teor de amido (C) e prolina (D) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com *B. proteolyticus* (B1), *A. spanius* (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas. ns = não significativo e * significativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste F, para as médias do fatorial ($\bar{F}$) em relação à testemunha N (TN). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre as doses de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio ($n = 4$).

Considerando os tratamentos com ou sem inoculação de BPCV, alinhados às diferentes doses de SH (0,0; 1,5 e 3,0 L ha⁻¹), foi possível reconhecer efeitos peculiares sobre os teores de açúcares solúveis totais (Fig 4A). Tratamentos sem aplicação de SH detiveram maiores valores de teores de açúcares solúveis totais em plantas inoculadas com *B. proteolyticus* e estirpe comercial (1,478 e 1,167 mmol g MS⁻¹, respectivamente) (Fig 4A). Diferentemente, quando aplicada a dose de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas,

a inoculação das plantas com *B. proteolyticus* não refletiu em ganhos no teor de açúcares solúveis totais (Fig 4A). Em contrapartida, a aplicação de SH, equivalente à dose de 3,0 L ha⁻¹, indicou que apenas as plantas de milho inoculadas com *A. spanius* se diferenciaram, dentre os tratamentos com inoculação bacteriana, apresentando o menor teor de açúcares solúveis totais (1,025 mmol g MS⁻¹) (Fig. 4A).

Plantas que receberam aplicação de SH nas doses de 0,0 e 3,0 L ha⁻¹ apresentaram teores de açúcares redutores iguais ou superiores, quando inoculadas com *A. spanius*. Contudo, sob a aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de SH, os teores de açúcares redutores foram maiores em plantas não inoculadas. Independentemente das doses de SH, plantas inoculadas como a estirpe comercial não se diferenciaram (p>0,05) das não inoculadas, quanto ao teor de açúcares redutores (Fig. 4B).

Tratamentos que envolveram aplicação de SH nas doses de 0,0; 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ e inoculação com *A. proteolyticus* e *A. spanius* apresentaram teores de amido superiores ou iguais às plantas não inoculadas (Fig. 4C). Já sob a aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas e inoculação da estirpe comercial, o teor de amido foi igual às demais bactérias e superior ao tratamento sem inoculação; e no nível de 3,0 L ha⁻¹, esse valor foi superior aos demais tratamentos (Fig. 4C).

Para os teores de prolina, nas doses 0,0; 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, verificou-se que não houve diferença entre os valores médios de cada tratamento bacteriano, no entanto, é importante observar que, sob o nível 0,0 de substâncias húmicas, as plantas inoculadas obtiveram valores de prolina superiores às plantas não inoculadas (Fig. 4D).

Quando comparada à média da testemunha N com a média do fatorial SH x BPCV, notou-se ausência de diferença significativa para as variáveis porcentagem de emergência: $\bar{F}$ = 94,45% – TN= 95,51% (Fig. 2A); altura de planta: $\bar{F}$ = 25,48 cm – TN= 23,84 cm, diâmetro de colmo: $\bar{F}$ = 7,37 mm – TN= 6,94 mm, massa seca da parte aérea: $\bar{F}$ = 1,94 g planta⁻¹ – TN= 1,70 g planta⁻¹, clorofila total: $\bar{F}$ = 0,02346 µg cm⁻² – TN= 0,02277 µg cm⁻², carotenoides: $\bar{F}$ = 0,00157 µg cm⁻² – TN= 0,00153 µg cm⁻² (Fig. 3); amido: $\bar{F}$ = 14,70863 mg g MS⁻¹ – TN= 16,65303 mg g MS⁻¹ e prolina: $\bar{F}$ = 0,00442 mmol g MS – TN= 0,00472 mmol g MS (Fig. 4C-D). Contudo, o valor médio da testemunha N foi superior para as variáveis velocidade de emergência: $\bar{F}$ = 12,04 – TN=12,18 (Fig. 2B), açúcares solúveis totais: $\bar{F}$ = 1,1680 mmol gMS⁻¹ – TN=1,5489 mmol gMS⁻¹ e açúcares redutores: $\bar{F}$ = 0,16445 mmol gMS⁻¹ – TN= 0,18488 mmol gMS⁻¹ (Fig. 4^a-B); e inferior

para índice de velocidade de emergência: $\bar{F}$ = 93,00 – TN = 89,21 e coeficiente de velocidade de emergência: $\bar{F}$ = 9,70 – TN = 9,61 (Fig. 3C-D).

Discussão

A relação entre bactérias promotoras de crescimento vegetal e plantas é altamente complexa e depende de uma série de variáveis, incluindo espécie vegetal, estirpe bacteriana, condições ambientais e práticas agrícolas (Matsumura et al. 2015). Os resultados do índice de velocidade de emergência, coeficiente de velocidade de emergência, e até mesmo os resultados da velocidade de emergência, observados neste estudo nas plântulas não inoculadas e nas inoculadas com *B. proteolyticus* e *A. spanius*, são considerados positivos, visto que, conforme Edmond e Drapala (1958), quanto menor o valor obtido pela fórmula de velocidade de emergência tem-se lotes de sementes com maior potencial fisiológico.

Considerando que a velocidade de emergência se baseia no princípio de que quanto mais rápida a germinação da semente, maior é o seu vigor, nossos resultados sugerem que a inoculação com as bactérias *B. proteolyticus* e *A. spanius* conservaram as condições de solo, as quais foram favoráveis para maior vigor das plântulas durante a emergência.

A variação de resultados da inoculação pode ocorrer devido a associações simbióticas específicas e individualizadas, podendo resultar em melhora, piora ou neutralidade, separadas por uma linha tênue em função do genótipo utilizado e da espécie do microrganismo (Da Silva et al. 2019). Isso justifica a estirpe comercial ter apresentado efeitos negativos sobre as variáveis de emergência avaliadas neste estudo.

Os efeitos positivos da aplicação de substâncias húmicas sobre porcentagem de emergência, velocidade de emergência, índice de velocidade de emergência e coeficiente de velocidade de emergência são similares aos relatados para sementes de culturas anuais como o sorgo (Vendruscolo et al. 2014) e milho (Rodrigues et al. 2017, De Oliveira et al. 2024). Isso tem sido atribuído à capacidade das substâncias húmicas de estimular a síntese de hormônios vegetais, como a auxina e atividade de enzimas que favorecem à germinação, florescimento e crescimento da parte aérea das plantas (Caron et al. 2015). Além disso, os ácidos húmicos presentes nas SH levam ao aumento da síntese de H⁺-ATPase de membrana vegetal, que favorece a ativação das bombas de prótons, sendo estas responsáveis pelo surgimento de raízes laterais (Canellas e Façanha 2004; Aguiar et al.

2013; Zandonadi et al. 2016) e, conseqüentemente, pode ter favorecido as variáveis de germinação avaliadas neste trabalho.

Esses resultados são importantes para a cultura do milho, visto que uma germinação rápida e uniforme contribui para a formação de um estande mais homogêneo; proporciona uma vantagem competitiva sobre as plantas daninhas, ajudando a reduzir a competição por recursos, como água, luz e nutrientes; promove a tolerância a condições ambientais desfavoráveis, como períodos curtos de disponibilidade de água no solo, aumentando suas chances de sobrevivência, além de permitir que as plantas completem seu ciclo produtivo dentro de prazos desejáveis, o que é especialmente importante em regiões com estações climáticas bem definidas.

O fato dos tratamentos com inoculação e aplicação de substâncias húmicas não terem influenciado as características altura de planta, diâmetro de colmo, massa seca da parte aérea pode ser relacionado ao curto período de tempo entre a aplicação dos tratamentos e avaliação. Em geral, as bactérias promotoras de crescimento requerem um determinado tempo para se estabelecerem na rizosfera e aumentarem sua população antes de ocasionar benefícios significativos às plantas (Phatania et al. 2020). No entanto, as alterações proporcionadas pelos tratamentos sobre os teores de açúcares, amido e prolina podem resultar, a longo prazo, em maior crescimento das plantas. Neste estudo, verificamos que plantas jovens de milho apresentam respostas bioquímicas variadas em função da inoculação com bactérias promotoras de crescimento combinada com a aplicação de substâncias húmicas, com efeito sinérgico dependente da estirpe bacteriana.

As SH podem alterar o teor e a distribuição de açúcares em folhas de milho (Canellas e Olivares 2014). A redução do teor de açúcares solúveis totais em plantas inoculadas com *B. proteolyticus*, sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, pode indicar que esses metabólitos estão sendo convertidos a carboidratos mais complexos (Dhawi et al. 2018), uma vez que, para esse mesmo tratamento, não houve redução no teor de amido. Por outro lado, o aumento no teor de açúcares solúveis totais em plantas inoculadas com *A. spanius*, sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, pode ser relacionado ao efeito das SH sobre a atividade da glicólise, ocasionando um maior desdobramento da sacarose a açúcares mais simples (Canellas et al. 2013).

Em plantas sem aplicação de substâncias húmicas (0,0 L ha⁻¹) e inoculadas com *B. proteolyticus*, teores maiores de açúcares totais e menores de açúcares redutores em plantas evidenciam um metabolismo acentuado de carboidratos, que pode favorecer o crescimento das plantas.

Em plantas não inoculadas com BPCV, a redução nos teores de amido com aplicação de substâncias húmicas pode estar relacionada ao seu efeito na intensificação de vários processos metabólicos, o que resulta em uma maior demanda por carboidratos (Canellas et al. 2013; Conselvan et al. 2018). Enquanto que, em plantas inoculadas com a estirpe comercial, houve um efeito inverso, havendo aumento no teor de amido, evidenciando que a bactéria contribuiu para atender às demandas energéticas sem a necessidade de utilizar as reservas da planta.

Os efeitos das SH sobre o teor de prolina em plantas não inoculadas e inoculadas com estirpe comercial podem estar relacionados, respectivamente, aos efeitos das SH sobre o aumento da assimilação de nitrogênio (Ertani et al. 2011; Canellas et al. 2013) e pelo fato da acentuação da atividade metabólica e crescimento das plantas aumentar a demanda por aminoácidos para produção de proteínas. Maior acúmulo de proteína foi relatado em plantas de grão de bico inoculadas com as bactérias *B. subtilis*, *B. thuringiensis* e *B. megaterium* (Khan et al. 2019).

Conclusão

A inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal não alterou significativamente a emergência e o crescimento inicial das plantas de milho.

O uso de substâncias húmicas aumentou a porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência e coeficiente de velocidade de emergência.

Plantas inoculadas com *Achromobacter spanius* e sob aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resultou em maior teor de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, respectivamente.

Plantas inoculadas com estirpe comercial (Ab-v5 e Ab-v6 de *Azospirillum brasiliense*) apresentaram maior teor de amido ao receber 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas.

Aprovação ética e consentimento para participação: Não aplicável.

Consentimento para publicação: Não aplicável.

Disponibilidade de dados e materiais: Os conjuntos de dados gerados e/ou analisados durante o presente estudo estão disponíveis com o autor correspondente, mediante solicitação razoável.

Conflitos de interesses: Não aplicável.

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com apoio do Programa de Pós-Graduação em Agronomia e da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

Contribuições dos autores:

Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Rafaela Simão Abrahão Nobrega, pelo fornecimento dos isolados de bactérias utilizados neste estudo (UFRB BA72A2.1 e UFRB FA342.2); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pela concessão de bolsa a EPO; à *Koppert Biological Systems* e Agroindustria Ferrari, pelo fornecimento de seus produtos (Azokop® e Ecohumic®) usados no estudo; à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo apoio à pesquisa.

Referências

Aguiar NO, Olivares FL, Novotny EH, Dobbss LB, Balmori DM, Santos-Júnior LG, Chagas JG, Façanha AR, Canellas LP. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil*, 2013, 362:161–174.

Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 1949, 24(1). <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 1973,39:205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.

Bell T, Newman JA, Silverman BW, Turner SI, Liley AK. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature*, 2005,436:1157-60.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras Para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Mapa/ACS, Brasília, DF, 2009, 399.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 20, de 21 de jul. de 1999. Oficializa os métodos analíticos físicoquímicos, para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. Diário oficial da União. Brasília, DF, 1999.

Braulio CS. Microrganismos na Promoção de Crescimento de feijão-Caupi e Maracujazeiro e no Controle de Fusariose. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2023, 142.

Canellas LP, Façanha AR. Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 2004, 39(3):233-240.

Canellas LP, Piccolo A, Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, Façanha AR. Composição química e propriedades de bioatividade de frações granulométricas separadas de um vermicomposto ácido húmico. Chemosphere, 2010, 78(4):457–466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.018>.

Canellas LP, Balmori DM, Medici LO, Aguiar NO, Campostrini E, Rosa RCC, Facanha AR, Olivares FL. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea Mays* L.) Plant Soil, 2013, 366:119–132. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1382-5>.

Canellas LP, Olivares FL. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2014 1(3). <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>.

Caron VC, Graças JP, Castro PRC. Condicionadores do solo: ácidos húmicos e fúlvicos. Piracicaba: ESALQ/USP, 2015.

Conselvan GB, Fuentes D, Merchant A, Peggion C, Francioso O, Carletti P. Effects of humic substances and indole-3-acetic acid on *Arabidopsis* sugar and amino acid metabolic profile. Plant and soil, 2018, 426:17-32.

Da Silva MECF, De Melo IS, Nascimento RDS, Rossi P, Ramos N. Germinação e vigor de girassol com uso de bactérias promotoras de crescimento. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., 2019, Campinas. Anais... Campinas: Instituto Agrônômico, 2019. Artigo 19406.

De Oliveira EP, de Souza Soares PP, de Jesus Correia A, da França RS, Miguel DL, Nóbrega RSA, Leal PL. Humic substances and plant growth-promoting bacteria enhance corn (*Zea mays* L.) development. South African Journal of Botany, 2024, 166:539-549. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.01.031>

Dhawi F, Datta R, Ramakrishna W. Metabolomics, biomass and lignocellulosic total sugars analysis in foxtail millet (*Setaria italica*) inoculated with different combinations of plant growth promoting bacteria and mycorrhiza. Communications in Plant Sciences, 2018,8:8-14. <http://dx.doi.org/10.26814/cps2018002>.

Döbereiner J, Andrade V, De O, Baldani VLD. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110), 1999:38.

Duarte CFD, Cecato U, Biserra TT, Mamédio D, Galbeiro S. *Azospirillum* spp. in grasses and forages. Review. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 2020,11(1). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>.

Edmond JB, Drapala WJ. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. Journal of the American Societ for Horticultural Science, 1958, 71:428–434.

Furbeck SM, Bourland FM, Watson CE. Relationship of seed and germination measurements with resistance to seed weathering cotton. Seed Science Technology, 1993, 21 (3): 505–512. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=4008726>.

Greiner L, Keller A, Grêt-regamey A, Papritz A. Soil function assessment: review of methods for quantifying the contributions of soils to ecosystem services. *Land Use Policy*, 2017,69:224–237, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2017.06.025>.

Greiner L, Nussbaum M, Papritz A, Fraefel M, Zimmermann S. Assessment of soil multifunctionality to support the sustainable use of soil resources on the Swiss Plateau. *Geoderma Regional*, 2018, (14). <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2018.e00181>.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 2010, 331:413-425. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

Khan N, Bano A, Babar MA. Metabolic and physiological changes induced by plant growth regulators and plant growth promoting rhizobacteria and their impact on drought tolerance in *Cicer arietinum* L. *PLoS ONE*, 2019, 14(3):e0213040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213040>.

Liu H, Zhang L, Meng A, Zhang J, Xie M, Qin Y, Faulk DC, Zhang B, Yang S, Qiu L. Isolation and molecular identification of endophytic diazotrophs from seeds and stems of three cereal crops. *PLoS One*, 2017, 12 (10), e0187383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187383>.

Maguire JD. Speeds of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 1962, 2(2):176–177.

Matsumura EE, Secco VA, Moreira RS, Santos OJP, Hungria M, Oliveira ALM. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Annals of Microbiology*, 2015:1-14. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-015-1059-4>.

Mattos MLT. Microbiologia do Solo. In: NUNES RR, REZENDE MOO. (org.). *Recurso Solo: Propriedades e Usos*. São Carlos-SP: Editora Cubo, 2016, 1. Ed.

Melo VF, Silva DT, Evald A, Rocha PRR. Chemical and biological quality of the soil in different systems of use in the savanna environment. *Revista Agro@mbiente on-line*. 2017,11(2):101-10.

Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31:426. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

Meza C, Valenzuela F, Echeverría-Vega A, Gomez A, Sarkar S, Cabeza RA, Arencibia AD, Quiroz K, Carrasco B and Banerjee A. Plant-growth-promoting bacteria from rhizosphere of Chilean common bean ecotype (*Phaseolus vulgaris* L.) supporting seed germination and growth against salinity stress. *Frontiers Plant Science*, 2022,13:1052263. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1052263>.

Muscolo A, Sidari M, Attinà E, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal*, 2007,71(1):75-85.

Nardi S, Schiavon M, Francioso O. A estrutura química e a atividade biológica das substâncias húmicas definem seu papel como promotores de crescimento vegetal. *Molecules*, 2021,26(8): 2256. <https://doi.org/10.3390/molecules26082256>.

Pathania P, Rajta A, Singh PC, Bhatia R. Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020,30:101842.

Ribeiro AC, Guimaraes PTG, Alvares VH. *Recomendações Para o Uso de Corretivos e Fertilizantes Em Minas Gerais: 5º Aproximação*. UFV, Viçosa-MG, 1999.

Rodrigues LA, Alves CZ, Rego CHQ, SILVA TRBD, SILVA JBD. Humic acid on germination and vigor of corn seeds1. *Revista Caatinga*, 2017, 30:149-154.

Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 2016,183:92–99.

Sousa J. *Promoção do Crescimento Vegetal por Bactérias Diazotróficas No Feijão-Caupi*.

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, Dissertação (Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas), 2017:73.

Teixeira PC, Donagemma GK, Fontana A, Teixeira WG. Manual de métodos de análise de solo, 2017.

Vendruscolo EP, Santos OF, Alves CZ. Substâncias húmicas na qualidade fisiológica de sementes de sorgo. Journal of Agronomic Sciences, Umuarama, 2014, 3(2):169-177.

Videira SS, Oliveira DM, Moraes RF, Borges WL, Baldani VLD, Baldani JI. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. Plant and Soil, 2012, 356, 51-66. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-1082-6>.

Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J. Plant Physiology, 1994,144 (3):307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).

Yemm EW, Willis A. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical Journal, 1954, 57(3):508. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>.

Zandonadi DB, Santos MP, Caixeta LS, Marinho EB, Peres LEP, Façanha AR. Plant proton pumps as markers of biostimulant action. Scientia Agricola, 2016, 73(1):24-28.

ARTIGO III

Sinergia de substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal no desenvolvimento e produtividade do milho*

* **Situação:** Não submetido

Sinergia de substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal no desenvolvimento e produtividade do milho

Resumo – O presente estudo avaliou o desenvolvimento, a produtividade e o estado nutricional de plantas de milho sob utilização de diferentes bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), níveis de substâncias húmicas (SH) e combinação bactéria + substâncias húmicas. O experimento foi conduzido em campo, em arranjo fatorial $4 \times 3 + 2$, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto por tratamentos com a inoculação de BPCV (*Bacillus proteolyticus*, *Achromobacter spanius*, estirpe comercial - *Azospirillum brasilense* e sem inoculação), e o segundo fator por diferentes doses de SH - Ecohumic® (0,0 - 1,5 e 3,0 L ha⁻¹) e dois tratamentos testemunhas (testemunha zero e com nitrogênio), culminando, assim, em um total de 56 parcelas experimentais. Aos 85 dias após a emergência, foram avaliados: altura da folha bandeira, altura de inserção da primeira espiga, diâmetro de colmo, área foliar, massa seca da parte aérea, clorofila total, carotenoides e teores de nitrogênio e fósforo foliar. Após completar a fase de maturidade fisiológica, avaliou-se, também, o diâmetro e comprimento de espiga, número de fileiras de grãos por espigas, número de grãos por fileira, peso de 1000 grãos e a produtividade estimada por hectare. O efeito da aplicação de SH sobre o crescimento e a produtividade das plantas de milho é dependente da estirpe bacteriana utilizada. Em plantas de milho inoculadas com *Achromobacter spanius*, a aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resulta em maior massa seca da parte aérea e diâmetro do colmo e, nas inoculadas com *Bacillus proteolyticus*, a aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas proporciona maior peso de mil grãos. Sob inoculação da estirpe comercial de *Azospirillum brasilense*, as doses de 0,0 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resultam em maior teor de nitrogênio foliar para as plantas de milho, quando comparadas à dose de 1,5 L ha⁻¹.

Palavras-chave: *Achromobacter spanius*, *Bacillus proteolyticus*, conservação do solo, produção sustentável, *Zea mays*.

1 Introdução

A conservação e uso sustentável do solo é uma demanda mundial, reconhecida inclusive pela Agenda 2030, que tem entre suas metas e objetivos garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas que aumentem a produtividade e a produção, mantendo os ecossistemas e a capacidade de adaptação às mudanças do clima, melhorando progressivamente a qualidade de vida na Terra (Brasil 2020).

No entanto, a produção agrícola ainda é notadamente dependente de insumos químicos para suprir as condições ideais de fertilidade do solo (Reetz 2017) e, consequentemente, garantir a produtividade de culturas de importância econômica. Esse cenário torna-se mais agravante em países tropicais, cujo solo apresenta, geralmente, elevada acidez e, por conseguinte, retenção de P, o indisponibilizando para as plantas (Veloso et al. 2020). Dentre essas diversas culturas de importância econômica, destaca-

se o milho, por ser a cultura mais plantada no mundo (FAO 2024), e seu cultivo vem alcançando, cada vez mais, novas regiões.

Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e de substâncias húmicas (SH) tornam-se alternativas promissoras para reduzir a utilização demasiada de insumos químicos, oferecendo uma abordagem mais sustentável e eficaz para potencializar a produtividade do milho e outras culturas.

A interação positiva entre essas BPCV e o milho tem sido demonstrada por vários estudos, nos quais a inoculação com estirpes específicas de *A. brasiliense* tem mostrado resultados significativos, principalmente sobre o rendimento de grãos, chegando a 30%. Além da produção de grãos, estudos evidenciaram que estirpes da espécie *A. brasiliense* pode influenciar na fisiologia, no desenvolvimento e no rendimento da cultura do milho, aumentando em torno de 54% a 86% a matéria seca das raízes e de 23% a 64% a massa seca da parte aérea (Valer et al. 2017). No entanto, de acordo com Matsumura et al. (2015), a resposta da inoculação pode variar de acordo com o genótipo da planta, estirpe bacteriana, condições ambientais, práticas agrícolas, bem como com a quantidade e qualidade das células de BPCV, utilizadas como inoculante. Além disso, torna-se necessária a identificação das melhores associações entre bactérias e genótipos de milho, objetivando-se alcançar o maior incremento no crescimento e produtividade das plantas e o maior aproveitamento dos nutrientes em condições ambientais peculiares.

O uso de substâncias húmicas na agricultura também se torna interessante, pelo fato de serem relativamente recalcitrantes à degradação de bactérias e influenciar o enraizamento, envolvendo a indução da formação da raiz lateral e o surgimento de pelos radiculares. As mudanças anatômicas e fisiológicas podem favorecer o ajuste da interação mutualística, aumentando a população da rizosfera e quimiotaxia, fixação e sobrevivência de bactérias na superfície da planta, bem como a colonização endofítica (Olivares et al. 2017).

Além disso, a associação de SH com bactérias leva a modificações fisiológicas, as quais se baseiam na liberação de compostos de ação semelhantes às auxinas, aumento de quantidade e diversidade de compostos exsudados, ativação da membrana plasmática H⁺-ATPase, e absorção de nutrientes como N, P, K, Ca e Mg (Canellas et al. 2013; Da Silva Lima et al. 2014; Ramos et al. 2015), o que pode resultar no aumento do desenvolvimento e produtividade da cultura.

Assim, a otimização da utilização de nutrientes, por meio de adaptações ou combinações das exigências das plantas às condições do solo, representa um ponto

fundamental na busca de alternativas mais sustentáveis que visem superar as limitações dos solos de forma mais eficaz do que a aplicação, por vezes inadequada, de fertilizantes e corretivos.

Neste estudo, considerou-se as hipóteses de que: a aplicação combinada de substâncias húmicas, em doses pré-definidas, e inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal é mais promissora ao desenvolvimento, nutrição e produtividade do milho, comparada às aplicações isoladas de ambos. Nesse sentido, o estudo objetivou avaliar o desenvolvimento, produtividade e estado nutricional de plantas de milho sob utilização de diferentes bactérias promotoras de crescimento vegetal, doses de substâncias húmicas e combinação bactéria + substâncias húmicas.

2 Material e métodos

2.1 Período e caracterização do local do experimento

O estudo foi realizado em condições de campo, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, *campus* de Vitória da Conquista [latitude (14°88'63"S) e longitude (40°80'13"W)], no período de 29 de maio (semeadura) a 20 de outubro de 2023 (maturidade fisiológica). Durante a condução do experimento, a temperatura oscilou entre 8,5 °C (mínima) a 33,5 °C (máxima) e uma precipitação acumulada de 55,1 mm (Fig. 1), com insolação média de 6,7 h dia⁻¹ e umidade média de 82,32%.

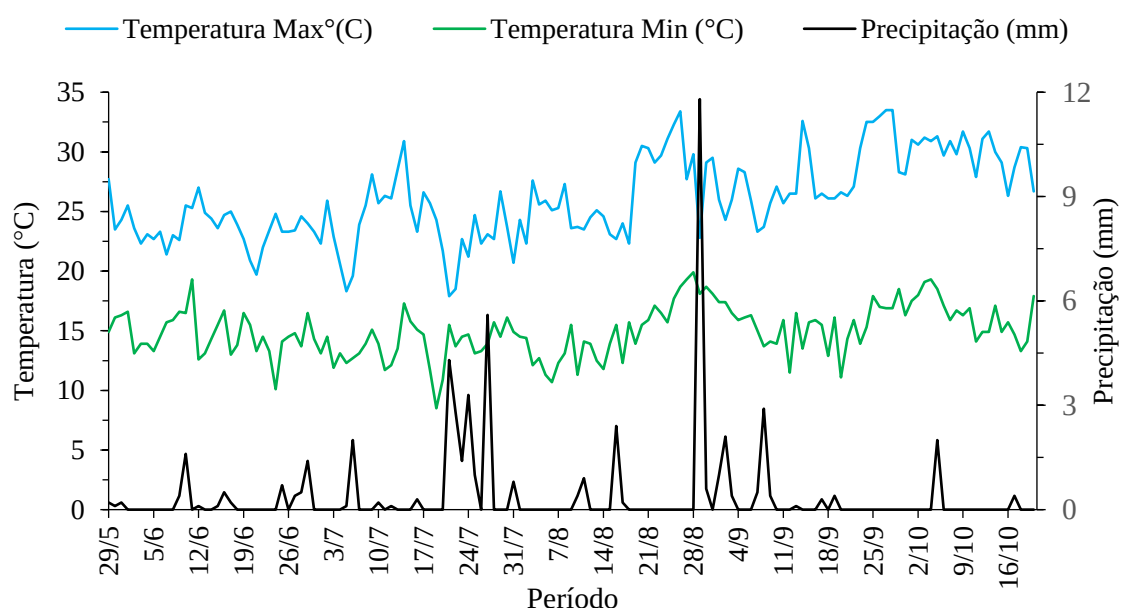


Fig. 1 - Dados diários de temperaturas máximas e mínimas e de precipitação pluvial durante o período de condução do experimento (maio/outubro de 2023).

2.2 Características físicas e químicas do solo e preparo da área

Para o estudo do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, foi conduzido um experimento em campo em uma área com histórico de cultivo de milho. Antes do preparo da área, amostras de solo foram coletadas em profundidade de 0,0 – 0,20 m, secas ao ar e peneiradas em malhas de 2 mm e uma porção de 400 g; e encaminhadas para análises físicas e químicas, as quais foram efetuadas de acordo com as metodologias adotadas por Teixeira et al. (2017), com resultados descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química e física do solo da área experimental

Análise química do solo													
pH	mg dm ⁻³	----- Cmol _c dm ⁻³ de solo -----							%	g dm ⁻³		g Kg ⁻¹	
(H ₂ O)	*P	*K ⁺	**Ca ²⁺	**Mg ²⁺	**Al ³⁺	***H ⁺	SB	t	T	V	m	MO	COT
5,4	31	0,09	2,0	0,5	0,2	3,2	2,6	2,8	6,0	43	7	16	9,28
Análise física do solo													
Frações													
totais da													
amostra %													
Composição Granulométrica (g Kg ⁻¹ de TFSA)													
Classe textural													
Terra fina < 2 mm		Areia grossa 2-0,20 mm		Areia fina 0,20-0,05 mm		Silte 0,05-0,002 mm		Argila < 0,002 mm					
100		550		170		20		260		Argilo-arenoso			

*Extrator Mehlich I; ** Extrator KCl 1N; ***CaCl₂ 0,01M; SB = Soma de base; t = CTC efetiva; T = CTC a pH 7; V = Saturação de base; m = Saturação por alumínio; MO = Matéria orgânica; COT = Carbono orgânico total; e TFSA = terra fina seca ao ar.

O preparado do solo foi realizado por meio de uma aração e duas gradagens. A abertura dos sulcos de plantio foi realizada a uma profundidade de aproximadamente 0,20 m, com espaçamento de 0,80 m entre linhas, 0,90 m entre as parcelas e 1,60 m entre blocos. Cada parcela foi composta por seis linhas de plantio de 3,20 m de comprimento, sendo duas dessas linhas consideradas bordaduras. O sistema de irrigação foi instalado com o uso de fitas gotejadoras de 0,20 m de espaçamento e vazão de 2 L h⁻¹.

2.3 Preparo do inoculante bacteriano

As bactérias utilizadas foram a UFRB FA72A2-1 (*Bacillus proteolyticus*) e UFRB FA34C2-2 (*Achromobacter spanius*), isoladas de solo com histórico de despejo de manipueira fresca, caracterizadas e identificadas (Sousa 2017; Braulio 2023). Os isolados bacterianos foram multiplicados em meio 79 líquido com manitol (Döbereiner et al.

1999), à temperatura de 28 °C. O tempo de crescimento das bactérias *B. proteolyticus* e *A. spanius* no meio foi de 48 e 86h, respectivamente. O número de células viáveis foi determinado pelo método da diluição seriada em placas contendo o meio 79 sólido. Além dessas bactérias, foi utilizado também o inóculo comercial Azokop[®], composto com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 de *Azospirillum brasiliense* e recomendado para a cultura do milho.

2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em arranjo fatorial 4 x 3 + 2, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto por tratamentos com a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (*B. proteolyticus*, *A. spanius*, estirpe comercial e sem inoculação), e o segundo fator, por diferentes doses de substâncias húmicas - Ecohumic[®] (0,0; 1,5 e 3,0 L ha⁻¹) e dois adicionais (Testemunha zero e com nitrogênio), culminando, assim, em 56 parcelas experimentais. As doses de substâncias húmicas adotadas foram baseadas em resultados preliminares obtidos em experimento com milho em vasos, em casa de vegetação.

2.5 Plantio e adubação

Para o plantio, foram utilizadas sementes do milho híbrido AG 1051, um híbrido de ciclo semiprecoce e maturação fisiológica de 133-139 dias. As sementes destinadas aos tratamentos bacterianos foram tratadas antes da semeadura, com solução inoculante, com uma população estabelecida de 10⁸ células bacterianas e deixadas secar a sombra. O inoculante comercial foi aplicado nas sementes usando-se 100 mL para 60.000 sementes, conforme as recomendações do fabricante. A aplicação das bactérias *B. proteolyticus* e *A. spanius* foi realizada adotando-se as recomendações do inóculo comercial.

Dez sementes foram semeadas por m⁻¹ linear, a uma profundidade de aproximadamente 0,03 m, totalizando, assim, 192 plantas em cada parcela. As diferentes doses de substâncias húmicas foram diluídas em 4 L de água e aplicadas sobre as sementes no sulco de plantio com o auxílio de um pulverizador costal, nos respectivos tratamentos. O composto húmico utilizado continha 10% de Carbono Orgânico Total, 13% de Ácido Húmico, 17% Ácido Fúlvico, 0% de Humina, 10 gL⁻¹ nitrato de potássio, 7,0 gL⁻¹ de sulfato de cobre, 7,0 gL⁻¹ de ácido bórico, 0,5 gL⁻¹ de espessante.

O desbaste das plantas foi realizado 25 dias após a emergência (DAE), deixando-se cinco plantas m⁻¹ linear e reduzindo-se o número de plantas por parcela para 96. A irrigação foi realizada regularmente para garantir umidade do solo em condições próximo à capacidade de campo.

A adubação foi realizada utilizando-se 80 Kg ha⁻¹ de N, sendo considerada 20 Kg ha⁻¹ como adubação de plantio, realizada apenas no tratamento testemunha de N total com a aplicação de 210 g parcela⁻¹ de nitrato de cálcio; e 60 Kg ha⁻¹ como adubação de cobertura, realizada em todos os tratamentos, usando-se 614,4 g parcela⁻¹ de nitrato de cálcio. O fornecimento de P foi de 30 Kg ha⁻¹, sendo aplicado 258 g parcela⁻¹ e incorporado no sulco antes do plantio. Todos os tratamentos, com exceção da testemunha zero, receberam adubação potássica de cobertura por meio do uso 50 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio (132,48 g de KCl parcela⁻¹). Todas as adubações de cobertura foram realizadas quando as plantas apresentavam de seis a oito folhas bem desenvolvidas (32 DAE). As adubações foram realizadas conforme a análise de solo e a recomendação para a cultura, visando uma produtividade de 4 a 6 t ha⁻¹ (Ribeiro et al. 1999).

2.6 Análises realizadas na cultura do milho

O experimento foi conduzido até o fim da fase de maturidade fisiológica, e foram realizadas análises morfológicas, fisiológicas, de nutrientes foliares e parâmetros de produção.

2.6.1 Características morfológicas

O crescimento das plantas foi avaliado aos 85 dias após a emergência (início da fase reprodutiva), sendo levada em consideração altura da folha bandeira – distância entre a superfície do solo e a primeira folha abaixo da inflorescência masculina; altura de inserção da primeira espiga – distância entre a superfície do solo e a inserção da espiga superior, medidas com auxílio de uma régua graduada em cm; e o diâmetro de colmo – determinado no primeiro entrenó acima do colo da planta com auxílio de um paquímetro digital com valores expressos em mm. As características altura da folha bandeira e diâmetro de colmo foram determinadas com base em uma amostragem de quatro plantas, coletadas uma em cada linha na área útil de cada parcela. A altura de inserção da primeira espiga foi determinada a partir de uma amostragem de 12 plantas, coletadas três em cada linha na área útil de cada parcela.

As quatro plantas avaliadas foram coletadas para a quantificação da massa seca e área foliar. As folhas foram separadas do colmo para obtenção da área foliar, que foi mensurada através do medidor de área foliar, marca LI 3100C. Area meter com resolução de 0,1 mm² e os resultados expressos em cm². As partes das plantas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C, até atingirem pesos constantes. A produção de massa seca parte aérea foi obtida pesando-se os materiais vegetais secos em uma balança digital de precisão.

2.6.2 Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram obtidos através da coleta de quatro discos foliares (7 mm de diâmetro), realizada no terço médio da primeira folha abaixo e oposta a primeira espiga. A coleta foi realizada em quatro plantas, uma em cada linha na área útil de cada parcela aos 85 dias após a emergência. Os discos foram colocados em tubos contendo 5 mL de acetona (80%) (Arnon 1949), por 48h, em ambiente escuro, para extração dos pigmentos. Posteriormente foram determinados em espectrofotômetro os valores de clorofila *a*, *b* e carotenoides (Wellburn 1994).

2.6.3 Teor foliar de nitrogênio e fósforo

As amostras para análise foliar foram obtidas pela coleta de 20 folhas, abaixo e oposta das espigas, na área útil de cada unidade experimental. A coleta foi realizada quando as plantas apresentavam inflorescência feminina (85 DAE) e foi utilizada o terço (20 cm) das folhas sem a nervura central.

O material foliar foi seco em estufa, triturado em moinho de facas com peneiras de 1 mm, acondicionados em sacos plásticos identificados e, posteriormente, determinados os teores de nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar. O teor de N foi determinado através da solubilização sulfúrica, seguida do método semimicro Kjeldahl (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997). O P foi determinado por digestão via úmida com solubilização nítrico perclórica, com espectrometria empregando o amarelo de vanadato; as leituras foram realizadas em 420 nm, conforme Carmo et al. (2000).

Com os valores de N e P encontrados, foi calculada a quantidade de N e P acumulado (N ACUM e P ACUM) na área foliar. Os níveis de cada nutriente foram multiplicados pela massa seca da folha (Jian et al. 2019).

2.6.4 Parâmetros de produção

O experimento foi conduzido até o fim da maturidade fisiológica (138 DAE). Foram colhidas manualmente todas as espigas da área útil de cada parcela. Amostras de 12 espigas em cada parcela foram coletadas para a realização das seguintes avaliações: diâmetro de espigas, realizado com paquímetro digital com valores em mm; comprimento de espiga utilizando régua graduada em cm; número de fileiras de grãos por espigas; número de grãos por fileira e peso de 1000 grãos, obtido em balança analítica. Todas as espigas colhidas em cada parcela foram debulhadas e pesadas em balança digital para determinar a produtividade estimada por hectare, que foi obtida pela estimativa de plantas por hectare. Todas as avaliações que envolveram pesagem de grãos foram corrigidas para 13% de umidade.

2.7 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Lilliefors) e homogeneidade de variâncias (Cochran e Bartlett) e, em seguida, realizada a análise de variância (F a 0,05). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade, usando-se o *software* R, versão 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Áustria).

3 Resultados

Os tratamentos experimentais envolvendo o uso de substâncias húmicas (SH) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), aplicados em diferentes níveis, exerceram efeitos significativos e isolados sobre as variáveis atribuídas ao desenvolvimento do milho. O teor de P foliar e o comprimento de espigas foram significativamente influenciados pelo uso das SH, enquanto que a clorofila total, o número de fileiras de grãos por espiga e o número de grãos por fileira foram influenciados ($p < 0,05$) pela inoculação das BPCV (Tabela S1).

Para diâmetro de colmo, altura da primeira espiga, massa seca da parte aérea, teor de N foliar e peso de mil grãos, houve interação significativa entre os fatores SH x BPCV. Já as variáveis altura da folha bandeira, área foliar, carotenoides, N acumulado e P acumulado nos tecidos foliares, diâmetro de espiga e produtividade estimada não apresentaram efeitos ($p > 0,05$) (Tabela S1).

Os tratamentos adicionais, testemunha zero e testemunha N, apresentaram interação significativa com o fatorial níveis de SH x BPCV para todas as características

avaliadas (Tabela S1), sendo, também, estes tratamentos adicionais significativos entre si para tais características, com exceção do número de fileiras de grãos por espigas (Tabela S1).

O uso de SH e inoculação de BPCV exerceu efeitos distintos sobre algumas variáveis morfológicas das plantas de milho (Fig. 2), visto que os valores médios de altura da folha bandeira e área foliar não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), tanto para as plantas que receberam unicamente os tratamentos com SH, quanto para tratamentos que envolveram apenas inoculação com BPCV (Fig. 2A-B). Por outro lado, o uso combinado dos tratamentos (SH + BPCV) promoveu efeitos positivos ($p < 0,05$) sobre os valores médios de diâmetro de colmo e massa seca da parte aérea do milho (Fig. 2C-D).

Plantas de milho inoculadas com *A. spanius* e submetidas à aplicação de substâncias húmicas, nas doses de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹, apresentaram maior valor médio, respectivamente, para as variáveis diâmetro de colmo (23,11 mm planta⁻¹) e massa seca da parte aérea (164,15 g planta⁻¹). Tais condições proporcionaram um aumento de 9,04% no diâmetro de colmo e 13,10% de massa seca da parte aérea das plantas, comparadas àquelas que não receberam adição de substâncias húmicas (Fig. 2C-D). Para as plantas inoculadas com *B. proteolyticus*, observou-se maior valor médio de massa seca da parte aérea (171,838 g planta⁻¹) sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas (Fig. 2D), ou seja, incremento de 7,64% em relação ao tratamento sem SH (0,0 L ha⁻¹).

Plantas não inoculadas com BPCV e sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas apresentaram menor valor médio de diâmetro do colmo e, para massa seca da parte aérea, diferenciaram-se ($p < 0,05$) apenas do tratamento com inoculação de *B. proteolyticus* (Fig. 2C-D). Não houve efeito da aplicação de substâncias húmicas, independentemente das doses, sobre o diâmetro do colmo e massa seca da parte aérea em plantas inoculadas com estirpe comercial (Fig. 2C-D).

Em relação à altura de inserção da primeira espiga nas plantas de milho, não foram observados efeitos aditivos da aplicação de SH, independentemente dos tratamentos de inoculação (Fig. 2E). Para essa mesma variável, foram registrados menores valores médios em plantas inoculadas com a estirpe comercial e 1,5 L ha⁻¹ de SH aplicado (1,39 m) e em plantas não inoculadas com aplicação de 3,0 L ha⁻¹ de SH (1,32 m) (Fig. 2E).

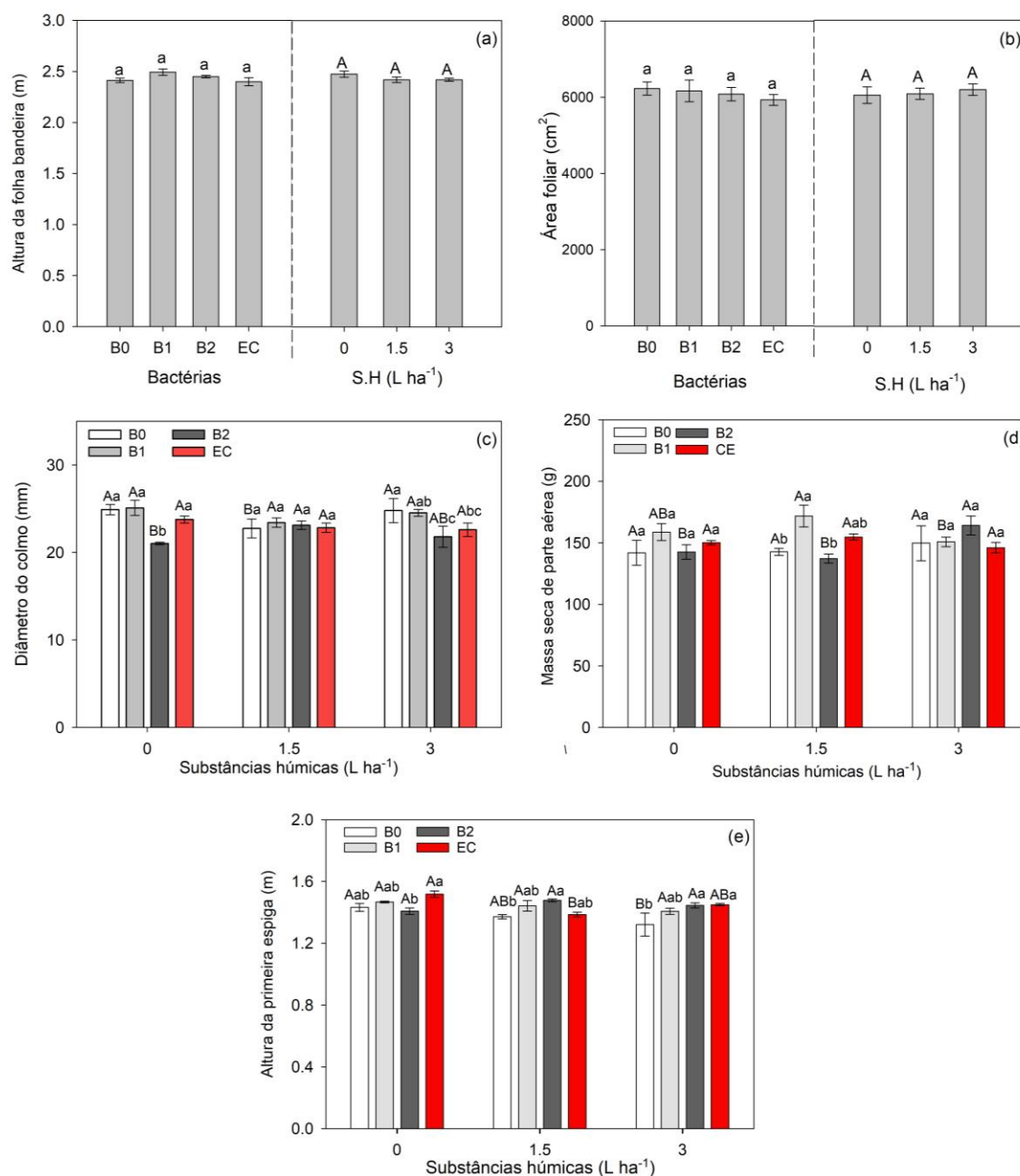


Fig. 2. Altura de folha bandeira (A), área foliar (B), diâmetro de colmo (C), massa seca da parte aérea (D) e altura de inserção da primeira espiga (E) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com *B. proteolyticus* (B1), *A. spanius* (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre os níveis de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para SH $n = 16$, para fatorial $n = 4$).

Efeitos distintos nos valores médios do diâmetro do colmo das plantas de milho foram notados ao analisar os tratamentos sem ou com inoculação das plantas de milho, com BPCV, juntamente com as diferentes doses de SH aplicados (Fig. 2C). Plantas na ausência ou na dose máxima de aplicação de SH ($3,0 \text{ L ha}^{-1}$) apresentaram menores valores de diâmetro de colmo (21,79 e 21,02 mm, respectivamente) sob a inoculação com *A. spanius* (Fig 2C).

Tratamentos envolvendo os níveis 0,0 e $1,5 \text{ L ha}^{-1}$ de substâncias húmicas aplicadas tendenciaram ao menor incremento de massa seca da parte aérea das plantas, quando inoculadas com *A. spanius* (Fig 2D). Contudo, vale ressaltar que, independentemente da dose de SH, os tratamentos com ou sem inoculação das plantas com BPCV não se diferenciaram entre si, exceto para a condição de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$ de SH, especialmente quando as plantas foram inoculadas com *B. proteolyticus* ($171,838 \text{ g planta}^{-1}$). Neste caso, o incremento de massa seca da parte aérea das plantas foi de 16,96% em relação às plantas não inoculadas (Fig. 2D).

Quanto à altura de inserção da primeira espiga, é interessante observar a influência distinta da ausência de aplicação de SH e inoculação com *A. spanius* (1,41 m) e quando aplicada a dose de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$ de substâncias húmicas (1,48 m). Além disso, destaca-se que o tratamento com aplicação de $3,0 \text{ L ha}^{-1}$ de SH e sem a inoculação de BPCV resultou no menor valor (1,32 m), quanto à altura de inserção da primeira espiga das plantas (Fig. 2E).

Os valores médios de altura da folha bandeira e área foliar (Tab. 2), diâmetro de colmo, massa seca da parte aérea e altura de inserção da primeira espiga foram maiores em plantas testemunha com N, comparadas às plantas testemunha zero (Tab. 3). Para as características altura da folha bandeira e área foliar, os tratamentos inoculação *B. proteolyticus* e aplicação de $3,0 \text{ L ha}^{-1}$ de substâncias húmicas resultaram em aumento de 4,18 e 0,97%; e 1,25 e 1,27%, respectivamente, em relação à testemunha N (Tab. 2).

Tabela 2. Altura da folha bandeira (AFB) e área foliar (AF) em função de diferentes doses de substâncias húmicas, inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero

Tratamento	AFB (m)	$\Delta T0$ (%)	ΔTN (%)	AF (cm ²)	$\Delta T0$ (%)	ΔTN (%)
B0	2,41	+31,69	+0,84	6227,692	+45,11	+1,99
B1	2,49	+36,10	+4,18	6165,152	+43,66	+0,97
B2	2,45	+33,88	+2,51	6079,473	+41,66	-0,43
EC	2,40	+31,15	+0,42	5928,615	+38,14	-2,90
0,0 L ha ⁻¹	2,47	+34,97	+3,35	6042,172	+40,79	-1,04
1,5 L ha ⁻¹	2,42	+32,24	+1,25	6074,908	+41,55	-0,51
3,0 L ha ⁻¹	2,42	+32,24	+1,25	6183,619	+44,09	+1,27
T0	1,83 b	-	-	4291,594 b	-	-
TN	2,39 a	-	-	6105,919 a	-	-

B0: sem inocular; B1: *B. proteolyticus*; B2: *A. spanius*; EC: estirpe comercial; T0: testemunha zero; TN: testemunha nitrogênio; $\Delta T0$ e ΔTN : aumento (+) ou diminuição (-) em relação à testemunha zero e a testemunha nitrogênio, respectivamente. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si.

O diâmetro de colmo de plantas inoculadas com *B. proteolyticus* sem a aplicação de substâncias húmicas ou com 3,0 L ha⁻¹ foram 9,27 e 6,79% maiores em relação à testemunha N. Enquanto que em plantas não inoculadas e com aplicação de 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas o aumento foi de 7,92% (Tab. 3). Para as características massa seca da parte aérea e altura de inserção da primeira espiga, os tratamentos sem aplicação de substâncias húmicas e inoculadas com *B. proteolyticus* e estirpe comercial, tratamentos com aplicação 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas e inoculadas com *B. proteolyticus* e estirpe comercial se destacaram dos demais. Os ganhos foram de 22,36 e 15,81% e de 32,48 e 19,32%, respectivamente, para massa seca da parte aérea e de 9,70 e 13,43% na altura de inserção da primeira espiga em relação à testemunha N (Tab. 3). Plantas inoculadas com *A. spanius* e sob aplicação de 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas obtiveram aumento de 26,56% na massa seca da parte aérea e 7,46% na altura de inserção da primeira espiga e, quando aplicado 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas, este ganho foi de 10,45% em comparação à testemunha N (Tab. 3).

Tabela 3. Diâmetro de colmo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e altura de inserção da primeira espiga (APE) de plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero

BPCV	SH								
	0,0 L ha ⁻¹	Δ T0	Δ TN	1,5 L ha ⁻¹	Δ T0	Δ TN	3,0 L ha ⁻¹	Δ T0	Δ TN
DC (mm)									
B0	24,90	+18,74%	+8,40%	22,74	+8,44%	-1,00%	24,79	+18,22%	+7,92%
B1	25,10	+19,69%	+9,27%	23,40	+11,59%	+1,87%	24,53	+16,98%	+6,79%
B2	21,02	+0,24%	-8,49%	23,11	+10,21%	+0,61%	21,79	+3,91%	-5,13%
EC	23,76	+13,30%	+3,44%	22,82	+8,82%	-0,65%	22,59	+7,72%	-1,65%
T0	20,97 b	-	-	-	-	-	-	-	-
TN	22,97 a	-	-	-	-	-	-	-	-
MSPA(g)									
B0	142,021	+55,78%	+9,49%	142,694	+56,53%	+10,01%	149,732	+64,25%	+15,44%
B1	158,702	+74,10%	+22,36%	171,838	+88,50%	+32,48%	150,836	+65,47%	+16,29%
B2	142,647	+56,48%	+9,98%	137,247	+50,56%	+5,81%	164,158	+80,08%	+26,56%
EC	150,207	+64,78%	+15,81%	154,769	+69,78%	+19,32%	146,085	+60,25%	+12,63%
T0	91,158 b	-	-	-	-	-	-	-	-
TN	129,704 a	-	-	-	-	-	-	-	-
APE (m)									
B0	1,43	+38,83%	+6,72%	1,37	+33,01%	2,24%	1,32	+28,15%	-1,49%
B1	1,47	+42,72%	+9,70%	1,44	+39,80%	+7,46%	1,41	+36,89%	+5,22%
B2	1,41	+36,89%	+5,22%	1,48	+43,69%	+10,45%	1,44	+39,80%	+7,46%
EC	1,52	+47,57%	+13,43%	1,39	+34,95%	+3,71%	1,45	+40,78%	+8,21%
T0	1,03 b	-	-	-	-	-	-	-	-
TN	1,34 a	-	-	-	-	-	-	-	-

B0: sem inocular; B1: *B. proteolyticus*; B2: *A. spanius*; EC: estirpe comercial; T0: testemunha zero; TN: testemunha nitrogênio; Δ T0 e Δ TN: aumento (+) ou diminuição (-) em relação à testemunha zero e a testemunha nitrogênio, respectivamente. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si.

Os tratamentos envolvendo o uso de SH e inoculação de BPCV exerceram efeitos distintos sobre as características fisiológicas e nutricionais das plantas de milho (Fig. 3). Todavia, os teores de carotenoides e clorofila total das plantas não foram influenciados pela aplicação de SH, assim como pela inoculação com BPCV (Fig. 3A-B). No entanto, para o teor de clorofila total, notou-se que plantas inoculadas com a estirpe comercial (*A. brasiliense*) apresentaram maior média ($0,03613 \mu\text{g cm}^{-2}$), valor estatisticamente igual aos obtidos em plantas não inoculadas ($0,03582 \mu\text{g cm}^{-2}$) e superiores aos de plantas inoculadas com *B. proteolyticus* e *A. spanius* ($0,03339$ e $0,03160 \mu\text{g cm}^{-2}$, respectivamente) (Fig. 3A-B).

A aplicação combinada de SH e BPCV exerceu efeitos significativos sobre os teores médios de N foliar das plantas de milho (Fig. 3C). Menores média de teores de N foliar foram registrados para plantas inoculadas com a estirpe comercial (*A. brasiliense*) ($2,56 \text{ g kg}^{-1}$) e *B. proteolyticus* ($2,43 \text{ g kg}^{-1}$), sob a aplicação de $1,5$ e $3,0 \text{ L ha}^{-1}$ de SH, respectivamente. Para os demais tratamentos, não houve alterações significativas no teor de N foliar em função dos níveis de substâncias húmicas utilizadas (Fig. 3C). Contudo, quando comparadas às plantas não inoculadas, maiores incrementos de teores de N foliar foram registrados nos tratamentos sem aplicação de SH e com inoculação da estirpe comercial (*A. brasiliense*) ($8,49\%$) ou submetidas à dose de $3,0 \text{ L ha}^{-1}$ de substâncias húmicas + estirpe comercial (*A. brasiliense*) ($8,30\%$) (Fig. 3C). Sob a aplicação de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$, não foi observado efeito significativo das médias de teor de N foliar entre os tratamentos (Fig. 3C).

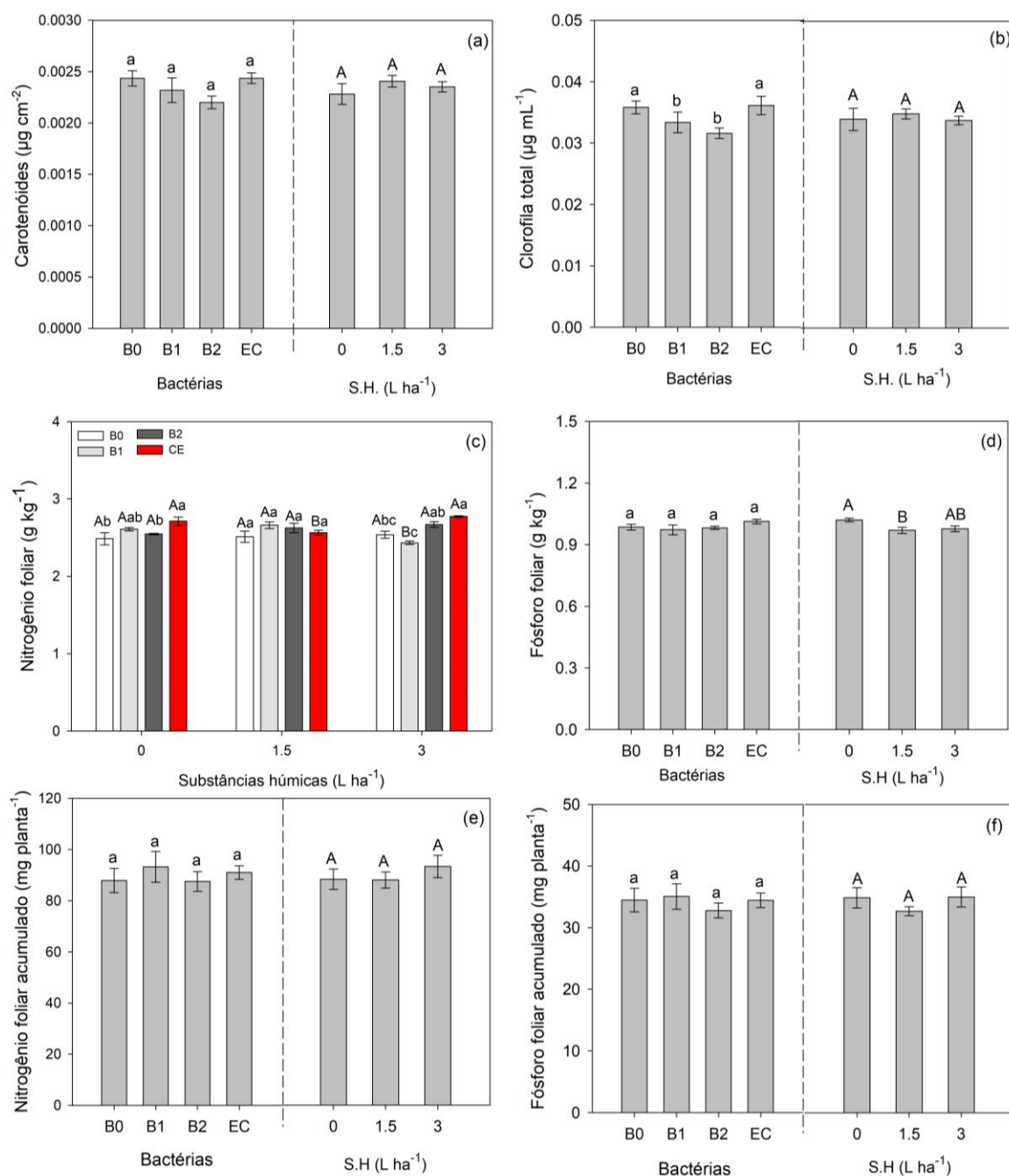


Fig. 3. Teor de carotenóides (A), clorofila total (B), teor de N foliar (C), teor de P foliar (D), N acumulado (E) e P acumulado (F) em plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com *B. proteolyticus* (B1), *A. spanius* (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre os níveis de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para S.H. $n = 16$, para fatorial $n = 4$).

O teor de P foliar não se diferenciou entre as plantas inoculadas ou não com BPCV (Fig. 3D). No entanto, sob a aplicação de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$ de SH, o teor médio de P foi menor

(0,97 g Kg⁻¹), comparado às plantas que não receberam aplicação de SH (1,02 g Kg⁻¹) (Fig 3D). Quanto aos teores de N e P acumulados nas plantas de milho, nenhum efeito significativo foi observado, tanto para os tratamentos com aplicação de substâncias húmicas quanto para aqueles com inoculação de BCPV (Fig. 3E-F).

Considerando os tratamentos adicionais empregados neste estudo, plantas denominadas testemunha N apresentaram os maiores valores médios para o teor de nitrogênio foliar (Tab. 4), carotenoides, clorofila total, fósforo, nitrogênio acumulado e fósforo acumulado nos tecidos foliar, em relação às plantas denominadas como testemunha zero (Tab. 5). A partir dos valores médios obtidos, é possível observar que plantas que receberam a aplicação de 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas e inoculadas com estirpe comercial tiveram um incremento de 58,29% no teor de nitrogênio foliar, em relação à testemunha zero, e 2,97% em comparação à testemunha N (Tab. 4).

Tabela 4. Teor de nitrogênio foliar – N (g kg⁻¹) em plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero

BPCV	SH								
	0,0 L ha ⁻¹	ΔT0	ΔTN	1,5 L ha ⁻¹	ΔT0	ΔTN	3,0 L ha ⁻¹	ΔT0	ΔTN
B0	2,48	+41,71	-7,81	2,51	+43,43	-6,69	2,54	+45,14	-5,58
B1	2,61	+49,14	-2,97	2,66	+52,00	-1,12	2,43	+38,86	-9,67
B2	2,55	+45,71	-5,20	2,62	+49,71	-2,60	2,66	+52,00	-1,12
EC	2,71	+54,86	+0,74	2,56	+46,29	-4,83	2,77	+58,29	+2,97
T0	1,75 b	-	-	-	-	-	-	-	-
TN	2,69 a	-	-	-	-	-	-	-	-

B0: sem inocular; B1: *B. proteolyticus*; B2: *A. spanius*; EC: estirpe comercial; T0: testemunha zero; TN: testemunha nitrogênio; ΔT0 e ΔTN: aumento (+) ou diminuição (-) em relação à testemunha zero e a testemunha nitrogênio, respectivamente. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si.

Plantas inoculadas com a estirpe comercial também apresentaram desempenho superior à testemunha N, para as características: teor de carotenoides, teor de clorofila total e teor de P foliar, com incrementos de 6,11%, 6,77% e 2,02%, respectivamente (Tab. 5). Para as plantas inoculadas com *B. proteolyticus*, os incrementos foram de: 6,65%, para N acumulado; e 8,95%, para P acumulado. Em relação às doses de substâncias húmicas, destacaram-se as doses de 1,5 L ha⁻¹, com 5,24% no teor de carotenoides e 3,10% no teor de clorofila total; e de 3,0 L ha⁻¹, com 6,61% para N acumulado e 8,77% para P acumulado (Tab. 5).

Tabela 5. Teor de carotenoides (CAR), teor de clorofila total (CLOR), quantidade de nitrogênio acumulado nos tecidos foliar (N ACUM), teor de fósforo foliar (P) e P acumulado nos tecidos foliar (P ACUM) em plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero

Tratamento	CAR ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	ΔT0 (%)	ΔTN (%)	CLOR ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	ΔT0 (%)	ΔTN (%)	P (g kg^{-1})	ΔT0 (%)	ΔTN (%)	N ACUM (mg)	ΔT0 (%)	ΔTN (%)	P ACUM (mg)	ΔT0 (%)	ΔTN (%)
B0	0,00243	+50,93	+6,11	0,03582	+52,62	+5,85	0,98	+19,51	-1,01	87,87	+120,95	+0,54	34,47	+86,83	+7,15
B1	0,00232	+44,10	+1,31	0,03339	+42,27	-1,33	0,97	+18,29	-2,02	93,21	+134,37	+6,65	35,05	+89,97	+8,95
B2	0,00220	+36,65	-3,93	0,03160	+34,64	-6,62	0,98	+19,51	-1,01	87,53	+120,09	+0,15	32,79	+77,72	+1,93
EC	0,00243	+50,93	+6,11	0,03613	+53,94	+6,77	1,01	+23,17	+2,02	91,01	+128,84	+4,13	34,43	+86,61	+7,03
0,0 L ha ⁻¹	0,00228	+41,61	-0,44	0,03400	+44,87	+0,47	1,02	+24,39	+3,03	88,34	+122,13	+1,08	34,88	+89,05	+8,42
1,5 L ha ⁻¹	0,00241	+49,69	+5,24	0,03489	+48,66	+3,10	0,97	+18,29	-2,02	88,03	+121,35	+0,72	32,70	+77,24	+1,65
3,0 L ha ⁻¹	0,00235	+45,96	+2,62	0,03382	+44,10	-0,06	0,98	+19,51	-1,01	93,35	+134,72	+6,81	34,99	+89,65	+8,77
T0	0,00161b	-	-	0,02347b	-	-	0,82 b	-	-	39,77 b	-	-	18,45 b	-	-
TN	0,00229a	-	-	0,03384a	-	-	0,99 a	-	-	87,40 a	-	-	32,17 a	-	-

B0: sem inocular; B1: *B. proteolyticus*; B2: *A. spanius*; EC: estirpe comercial T0: testemunha zero; TN: testemunha nitrogênio; ΔT0 e ΔTN : aumento (+) ou diminuição (-) em relação à testemunha zero e a testemunha nitrogênio, respectivamente. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si.

A aplicação de SH e BPCV, de forma isolada ou combinada, exerceu efeitos distintos sobre os parâmetros de produção do milho, avaliados neste estudo (Fig. 4). Plantas inoculadas com BPCV não resultaram em aumentos significativos quanto ao diâmetro e comprimento de espiga, e produtividade estimada (Fig. 4A, B e E). Por outro lado, efeitos significativos das variáveis número de fileiras de grãos por espiga e número de grãos por fileiras foram observadas (Fig. 4C - D).

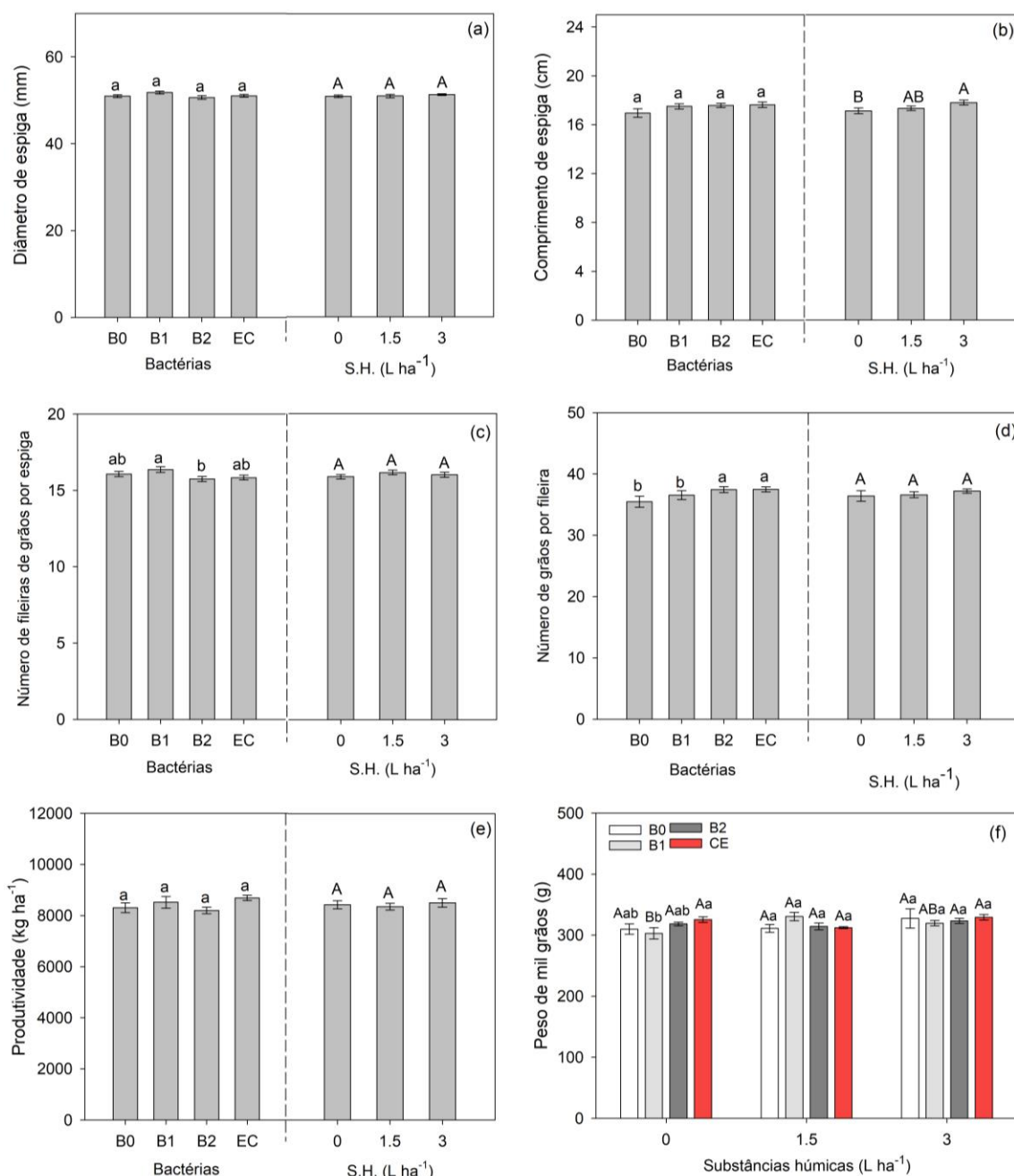


Fig. 4. Diâmetro de espiga (A), comprimento de espiga (B), número de fileiras de grãos por espiga (C) número de grãos por fileira (D), produtividade estimada (E) e peso de 1000

grãos (F) de plantas de milho sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento (B0), inoculadas com *B. proteolyticus* (B1), *A. spanius* (B2), estirpe comercial (EC) e diferentes doses de substâncias húmicas (SH). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre os níveis de substâncias húmicas e letras minúsculas iguais não diferem entre bactérias (teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras de erro mostram o erro padrão médio (para bactérias $n = 12$, para SH $n = 16$, para fatorial $n = 4$).

O número de fileiras de grãos por espiga foi maior (16,36) em plantas inoculadas com *B. proteolyticus*, em comparação ao tratamento com inoculação de *A. spanius* (15,75), semelhantemente aos tratamentos envolvendo inoculação das plantas com estirpe comercial (*A. brasiliense*) e sem inoculação (15,83 e 17,07, respectivamente) (Fig. 4C). Por outro lado, número de grãos por fileiras foi maior nos tratamentos que incluíram o uso da bactéria *A. spanius* (37,44) e estirpe comercial (*A. brasiliense*) (37,48), quando comparados aos tratamentos que utilizaram bactérias *B. proteolyticus* e sem inoculação (36,53 e 35,47, respectivamente), conforme figura 4 D.

A aplicação de SH não resultou em aumentos significativos para as variáveis diâmetro de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileiras e de produtividade estimada das plantas de milho (Fig. 4A, C, D e E). Efeitos significativos foram observados apenas sobre o comprimento de espiga, que foi maior nos tratamentos que incluíram a aplicação de SH equivalente a $3,0 \text{ L ha}^{-1}$ (17,80 cm), quando comparados aos tratamentos que não receberam SH (17,12 cm) e semelhante àqueles com aplicação de SH igual a $1,5 \text{ L ha}^{-1}$ (17,33 cm), conforme figura 4B.

A aplicação combinada de SH e BPCV exerceu efeitos significativos sobre peso de 1000 grãos de milho (Fig. 4F). Plantas inoculadas com a bactéria *B. proteolyticus* apresentaram incremento de 8,34% no peso de 1000 grãos sob a aplicação de $1,5 \text{ L ha}^{-1}$ de SH (330,453 g) e uma leve redução (319,696 g), quando o nível de aplicação de SH foi equivalente a $3,0 \text{ L ha}^{-1}$ (Fig. 4F). Os demais tratamentos não sofreram alterações significativas para essa variável, independentemente dos níveis de substâncias húmicas utilizadas (Fig. 4F). Plantas de milho, sem a aplicação de SH, apresentaram maior valor médio do peso de 1000 grãos (325,588 g), quando inoculadas com a estirpe comercial (*A. brasiliense*), cujo valor foi superior aos encontrados em plantas inoculadas com *B. proteolyticus* (302,966 g) e estatisticamente semelhante aos tratamentos com *A. spanius* (318,352 g) e sem inoculação (309,957 g), conforme figura 4F. Sob a aplicação de $1,5 \text{ L}$

ha⁻¹ e 3,0 L ha⁻¹ de SH, não foi observada diferença significativa entre as médias dos tratamentos de inoculação com BPCV (Fig. 4F).

Para todas as características de produção do milho, com exceção do número de fileiras de grãos por espiga, foram verificadas maiores médias para plantas testemunha N total em relação à testemunha zero (Tab. 6 e 7). Considerando os valores médios dos tratamentos do fatorial (BPCV x SH) em relação à testemunha N, houve incrementos sobre o peso de 1000 grãos: 9,93%, em plantas com aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de SH e inoculadas com *B. proteolyticus*; e de 8,31 e 9,55%, em plantas com aplicação de 0,0 e 3,0 L ha⁻¹ de SH e inoculadas com a estirpe comercial, respectivamente (Tab. 6).

Tabela 6. Peso de 1000 grãos – PMG (g) de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero

BPCV	SH								
	0,0 L ha ⁻¹	ΔT0	ΔTN	1,5 L ha ⁻¹	ΔT0	ΔTN	3,0 L ha ⁻¹	ΔT0	ΔTN
B0	309,957	+14,57	+3,11	311,086	+14,99	+3,48	327,323	+20,99	+8,89
B1	302,966	+11,99	+0,78	330,453	+22,15	+9,93	319,696	+18,17	+6,35
B2	318,352	+17,67	+5,90	314,388	+16,21	+4,58	323,361	+19,52	+7,57
EC	325,588	+20,35	+8,31	312,258	+15,42	+3,87	329,314	+21,72	+9,55
T0	270,541b	-	-	-	-	-	-	-	-
TN	300,611a	-	-	-	-	-	-	-	-

B0:sem inocular; B1: *B. proteolyticus*; B2: *A. spanius*; EC: estirpe comercial; T0: testemunha zero; TN: testemunha nitrogênio; $\Delta T0$ e ΔTN : aumento (+) ou diminuição (-) em relação à testemunha zero e a testemunha nitrogênio, respectivamente. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si.

Plantas inoculadas com *B. proteolyticus* também apresentaram maiores valores médios que a testemunha N, para as características: diâmetro de espiga, número de fileiras de grãos por espiga e produtividade estimada, com incrementos de 4,76%, 5,28% e 11,51%, respectivamente (Tab. 7). Para as plantas inoculadas com a estirpe comercial, os incrementos foram de: 5,28%, para comprimento de espiga; 7,55%, para número de grãos por fileiras; e de 13,77%, para produtividade estimada. Em relação ao efeito das doses de substâncias húmicas comparado à testemunha N, destacaram-se as doses de 1,5 L ha⁻¹, com 3,36% para número de fileiras de grãos por espiga; e a dose de 3,0 L ha⁻¹, com 3,89% para diâmetro de espiga, 6,84% para comprimento de espiga, 6,77% para o número de grãos por fileiras e de 11,33% para produtividade estimada (Tab. 7).

Tabela 7. Diâmetro de espiga (DE) comprimento de espiga (CE), número de fileiras de grãos por espiga (NFGE), número de grãos por fileiras (NGF) e produtividade estimada (PE) de plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas, inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e tratamentos adicionais: testemunha com nitrogênio total e testemunha zero

Tratamento	DE (mm)	$\Delta T0$ (%)	ΔTN (%)	CE (cm)	$\Delta T0$ (%)	ΔTN (%)	NFGE	$\Delta T0$ (%)	ΔTN (%)	NGF	$\Delta T0$ (%)	ΔTN (%)	PE (kg ha ⁻¹)	$\Delta T0$ (%)	ΔTN (%)
B0	50,94	+14,63	+3,08	16,95	+29,49	+1,74	16,07	+3,68	+3,41	35,47	+44,66	+1,78	8303,371	+124,11	+8,70
B1	51,77	+16,49	+4,76	17,51	+33,77	+5,10	16,36	+5,55	+5,28	36,53	+48,98	+4,82	8517,788	+129,90	+11,51
B2	50,63	+13,93	+2,45	17,58	+34,30	+5,52	15,75	+1,61	+1,35	37,44	+52,69	+7,43	8200,607	+121,33	+7,36
EC	51,02	+14,81	+3,24	17,63	+34,68	+5,82	15,83	+2,13	+1,87	37,48	+52,85	+7,55	8690,055	+134,54	+13,77
0,0 L ha ⁻¹	50,93	+14,60	+3,06	17,12	+30,79	+2,76	15,87	+2,39	+2,12	36,39	+48,41	+4,42	8425,454	+127,40	+10,30
1,5 L ha ⁻¹	51,01	+14,78	+3,22	17,33	+32,39	+4,02	16,14	+4,13	+3,86	36,59	+49,23	+4,99	8354,199	+125,48	+9,37
3,0 L ha ⁻¹	51,34	+15,53	+3,89	17,80	+35,98	+6,84	15,99	+3,16	+2,90	37,21	+51,75	+6,77	8504,213	+129,53	+11,33
T0	44,44 b	-	-	13,09 b	-	-	15,50 a	-	-	24,52 b	-	-	3705,075b	-	-
TN	49,42 a	-	-	16,66 a	-	-	15,54 a	-	-	34,85 a	-	-	7638,545 a	-	-

B0: sem inocular; B1: *B. proteolyticus*; B2: *A. spanius*; EC: estirpe comercial T0: testemunha zero; TN: testemunha nitrogênio; $\Delta T0$ e ΔTN : aumento (+) ou diminuição (-) em relação à testemunha zero e a testemunha nitrogênio, respectivamente. Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si.

4 Discussão

O uso de substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal na agricultura tem despertado interesse crescente, devido ao seu potencial para melhorar a qualidade do solo, aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas e promover o crescimento saudável das culturas. No entanto, os resultados do uso desses recursos são dependentes de diversos fatores, tais como condições edafoclimáticas, a espécie vegetal cultivada, a dose e forma de aplicação dos insumos, bem como da qualidade e origem das substâncias húmicas e das bactérias promotoras de crescimento (Canellas et al. 2010; Matsumura et al. 2015; Nardi et al. 2021).

No presente estudo, por exemplo, plantas inoculadas com *A. spanius* apresentaram maior diâmetro do colmo, sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de SH, e maior massa seca da parte aérea sob aplicação de 3,0 L ha⁻¹, em comparação à dose 0,0 L ha⁻¹ de SH. Isso evidencia que, a depender da identidade da bactéria, o uso combinado com SH pode resultar em efeitos aditivos e promover o crescimento das plantas. O maior diâmetro de colmo em plantas inoculadas com *A. spanius* pode ter contribuído para os maiores valores médios de altura de inserção da primeira espiga e de número de grãos/fileira observados para este tratamento. Vale ressaltar que o diâmetro do colmo possui função importante para as plantas de milho, pois atua, principalmente, no armazenamento de sólidos solúveis que serão utilizados posteriormente na formação dos grãos (Souza et al. 2016).

A altura de inserção da primeira espiga foi maior em plantas tratadas com doses de 1,5 e 3, 0 L ha⁻¹ de SH e inoculadas com *A. spanius* em comparação às plantas não inoculadas. Esses resultados podem ser atribuídos a efeitos sinérgicos entre a referida bactéria e as respectivas doses de SH, as quais proporcionaram à planta maior capacidade de absorção de água e nutrientes, contribuindo, assim, para melhor crescimento.

Para o milho híbrido AG1051, a altura de inserção da primeira espiga de aproximadamente 1,13 m conferiu um bom equilíbrio da planta, não se observando quebra de colmos (De Moraes et al. 2010). Para adoção de cultivo consorciado com o milho, a altura de inserção da espiga deve ser de, no mínimo, 1,0 m (Marchão et al 2005), facilitando a colheita mecanizada sem danos às culturas intercalares (Costa e Silva 2008), devido à maior altura da plataforma de corte, reduzindo a possibilidade de embuchamento da máquina (Brambilla et al. 2009).

Neste estudo, não houve efeito significativo dos fatores bactérias promotoras de crescimento vegetal e substâncias húmicas sobre a altura de folha bandeira. No entanto,

as médias do fatorial foram maiores para as características altura de folha bandeira e diâmetro de colmo em comparação às médias observadas nas testemunhas (sem N e com N). Esses resultados são satisfatórios, pois plantas maiores e com colmos mais grossos podem conferir maior produtividade sem resultar em acamamento e quebra dos colmos (Pinto et al. 2019).

Bactérias do gênero *Bacillus* são classificadas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) que colonizam raízes de plantas e induzem um aumento significativo no crescimento vegetal. Isso pôde ser observado em nosso estudo, uma vez que plantas inoculadas com *B. proteolyticus*, sob aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de SH, apresentaram maior média de massa seca da parte aérea, comparadas às plantas não inoculadas. Tais efeitos se devem, possivelmente, à capacidade de bactérias desse gênero de colonizar a rizosfera, promover o crescimento vegetal, além de possuir papel na reciclagem de nutrientes e potencial como biofertilizantes para o incremento da produtividade, o que pode beneficiar a planta durante períodos de estresses (Chagas Junior et al. 2022).

Outra espécie de BPCV apontada na literatura como promissora pela sua ação como biofertilizante é a *A. brasiliense*, que se destaca por incrementar o desenvolvimento e a produtividade das plantas por meio da fixação biológica de nitrogênio com aumento na atividade da redutase do nitrato (Dartora et al 2016; Müller et al 2016; Galindo et al 2019; Lopes e Knies 2019; Skonieski et al. 2019). Esta foi a espécie comercial empregada em nosso estudo, que proporcionou às plantas de milho maior teor de N foliar, tanto na ausência das substâncias húmicas, quanto sob a aplicação de 3,0 L ha⁻¹.

A variável produtividade é influenciada pelo número de grãos por espiga e massa de mil grãos, sendo esses caracteres denominados componentes primários da produção, portanto, os que mais influenciam a produtividade do milho (Pinto et al. 2019). No presente estudo, verificou-se que, na ausência de aplicação de SH, plantas inoculadas com *B. proteolyticus* apresentaram menor peso de mil grãos em relação àquelas inoculadas com a estirpe comercial e não se diferiram de plantas não inoculadas. No entanto, a aplicação de SH em plantas inoculadas com *B. proteolyticus* resultou em maior peso mil grãos. Esses resultados evidenciam que as SH podem favorecer a interação bactéria-planta, resultando em efeito superior à inoculação isolada de BCPV. Por outro lado, ainda que a inoculação da bactéria *B. proteolyticus* não tenha resultado em aumento do número de grãos/fileira, foi observado maior número de fileiras de grãos/espiga para esse tratamento, o que pode aumentar o número de grãos por espiga e, consequentemente, a

produtividade, deixando-o igual aos outros tratamentos. Além disso, o uso combinado de substâncias húmicas e inoculação com *B. proteolyticus* resultou em maior peso de mil grãos, possibilitando que o potencial produtivo se igualasse aos dos demais tratamentos. Esses dados corroboram os verificados por Souza et al. (2014), os quais observaram que a massa de mil grãos exerceu o maior efeito sobre a produtividade do milho.

Embora os tratamentos não tenham influenciado a produtividade estimada de grãos, os fatores (SH + BPCV) avaliados apresentaram uma produtividade média satisfatória (8.428 kg ha^{-1}) e superior à média nacional, que foi de aproximadamente 3.406 kg ha^{-1} , na safra 2022/2023 (CONAB 2024). Os resultados obtidos podem ser atribuídos ao nível tecnológico aplicado durante a condução do experimento, ao uso de um híbrido de alto potencial produtivo e à ausência de restrição hídrica para a cultura. Os valores superiores das características morfológicas, teores de N e P e das relacionadas à produtividade para a média do fatorial bactérias promotoras de crescimento vegetal x substâncias húmicas, em comparação à média das testemunhas (N e zero), evidenciam que é possível adotar estratégias nutricionais sustentáveis aliadas à manutenção da produtividade da cultura.

A falta de efeitos significativos para a maioria das características avaliadas, em função da inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal e/ou substâncias húmicas, pode ser relacionada às complexidades das condições ambientais em campo, corroborada pelo efeito significativo para o fator blocos. Em estudo similar, conduzido em casa de vegetação, a inoculação com o isolado de *B. proteolyticus* promoveu o crescimento das plantas, associado ao aumento do teor de nitrogênio nas folhas, clorofila total, carotenoides e taxa fotossintética. Para plantas inoculadas com *A. spanius* e estirpe comercial, a aplicação de substâncias húmicas resultou no aumento dos pigmentos fotossintéticos e crescimento das plantas (De Oliveira et al. 2024). Esses resultados divergentes podem estar relacionados ao fato dos efeitos da inoculação com BPCV, em termos de potencial agrônomo, fixação de N ou promoção do crescimento de plantas de milho serem dependentes da comunidade microbiológica do solo e disponibilidade de N (Hungria 2011).

5 Conclusões

O crescimento das plantas de milho pode ser beneficiado pela aplicação de substâncias húmicas, a depender da bactéria utilizada. Em plantas inoculadas com

Achromobacter spanius, a aplicação de 1,5 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resulta em maior massa seca da parte aérea e diâmetro do colmo e, nas inoculadas com *Bacillus proteolyticus*, a aplicação de 1,5 L ha⁻¹ de substâncias húmicas proporciona maior peso de mil grãos. Sob inoculação da estirpe comercial de *Azospirillum brasilense*, as doses de 0,0 e 3,0 L ha⁻¹ de substâncias húmicas resultam em maior teor de nitrogênio foliar para as plantas de milho, quando comparadas à dose de 1,5 L ha⁻¹.

Conflitos de interesses: Não aplicável.

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com apoio do Programa de Pós-Graduação em Agronomia e da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

Contribuições dos autores:

Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Rafaela Simão Abrahão Nobrega, pelo fornecimento dos isolados de bactérias utilizados neste estudo (UFRB BA72A2.1 e UFRB FA342.2); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pela concessão de bolsa a EPO; à *Koppert Biological Systems* e Agroindustria Ferrari, pelo fornecimento de seus produtos (Azokop® e Ecohumic®) usados no estudo; à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo apoio à pesquisa.

Referências

- Arnon DI., (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24 (1). doi:10.1104/pp.24.1.1.
- Brambilla JA, Lange A, Buchelt AC, Massaroto JA (2009). Produtividade de milho safrinha no sistema de integração lavoura-pecuária, na região de Sorriso, Mato Grosso. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, 8(03).
- Brasil (2020). Programas Integrantes do PPA 2020 – 2023. Disponível em https://antigo.inpa.gov.br/arquivos/portalfilepublisher/arquivosportalfilepublisher/IV_PA_siop_espeelho_programas.pdf. Acessado em 20 de maio de 2024
- Braulio CS (2023). Microrganismos na Promoção de Crescimento de feijão-Caupi e Maracujazeiro e no Controle de Fusariose. Tese, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.
- Canellas LP, Piccolo A, Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, Façanha

AR (2010). Composição química e propriedades de bioatividade de frações granulométricas separadas de um vermicomposto ácido húmico. *Chemosphere* 78 (4), 457–466. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.018.

Canellas LP, Balmori DM, Médici LO, Aguiar NO, Campostrini E, Rosa RC, Façanha AR, Olivares FL (2013). A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and soil*, v. 366, p. 119-132.

Carmo CDS, De Araujo WS, Bernardi ADC, Saldanha MFC (2000). Métodos de Análise de Tecidos Vegetais Utilizados Na Embrapa Solos.

Chagas Junior AF, Braga Junior GMBJ, Lima CAL, Martins ALLM, Souza MCS, Chagas LFBC (2022). *Bacillus subtilis* como inoculante promotor de crescimento vegetal em soja. *Diversitas Journal*, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 0001–0016. DOI: <https://doi.org/10.48017/dj.v7i1.2071>.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2024). Milho. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/910-Milho> Acessado em 22 junho 2024.

Costa ASV, Silva MB (2008). Sistemas de consórcio milho-feijão para a região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras-MG, v. 32, n. 2, p. 663-667.

Dartora J, Guimarães VF, Menezes CRJ, Freiburger MB, Castoldi G, Gonçalves EDV (2016). Maize response to inoculation with strains of plant growth-promoting bacteria. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 20, n. 7, p. 606-611.

Da Silva Lima L, Olivares FL, De Oliveira RR, Vega MRG, Aguiar NO, Canellas LP (2014). Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 1, 23.

De Moraes ARA, Junior EUR, Gallo PB, Paterniani MEAGZ, Sawasaki E, Duarte AP, Guimarães PDS (2010). Desempenho de oito cultivares de milho verde na safrinha, no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 9, n. 01, p. 79-91.

De Oliveira EP, de Souza Soares PP, de Jesus Correia A, da França RS, Miguel DL, Nóbrega RSA, Leal PL (2024). Humic substances and plant growth-promoting bacteria enhance corn (*Zea mays* L.) development. *South African Journal of Botany*, 166, 539-549.

Döbereiner J, Andrade VO, Baldani VLD (1998). Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

FAO - Food and Agriculture Organization, 2024. Disponível em <https://www.fao.org/faostat/en/#data> Acessado em 20 de maio de 2024.

Galindo FS, Marcelo CM, Teixeira F, Buzetti S, Pagliari PH, Santini JMK, Alves KJ. Megda MM, Nogueira TAR, Andreotti M, Arf O (2019). Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with *Azospirillum brasilense*. *Agronomy Journal*, v. 111, n. 4, p. 1985–1997.

Hungria M (2011). Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 36p.

- Lopes PT; Knies AE (2019). Desempenho agrônômico de milho crioulo e híbrido com a inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. IX SIEPEX-IX Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão. 2019. Disponível em <http://conferencia.uergs.edu.br/index.php/IXSIEPEX/IXSIEPEX/paper/viewFile/3646/755> . Acessado em 03 de junho de 2024.
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA (1997). Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Potafos, 201p.
- Matsumura EE, Secco VA, Moreira RS, Santos OJP, Hungria M, Oliveira ALM (2015). Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. Annals of Microbiology, First published online: April 01, 2015, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-015-1059-4>.
- Marchão RL, Brasil EM, Duarte JB, Guimarães CM, Gomes JÁ (2005). Densidade de plantas e características agrônômicas de híbridos de milho sob espaçamento reduzido entre linhas. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia-GO, v. 35, n. 2, p. 93-101.
- Müller TM, Sandini IE, Rodrigues JD, Novakowski JH, Kaminski SBTH (2016). Combinação de métodos de inoculação de *Azospirillum brasiliense* com adubação nitrogenada de cobertura aumenta produtividade de milho. Ciência Rural, v. 46, n. 2, p. 210– 215.
- Nardi S, Schiavon M, Francioso O (2021). A estrutura química e a atividade biológica das substâncias húmicas definem seu papel como promotores de crescimento vegetal. Molecules 26 (8), 2256. doi:10.3390/molecules26082256.
- Olivares FL, Busato JG, De Paula AM, Da Silva Lima L, Aguiar NO, Canellas LP (2017). Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. Chemical and biological technologies in agriculture, v. 4, p. 1-13.
- Pinto DA, Krenski A, Meert L, Chitolina MP, Borghi WA (2019). Características agrônômicas de milho em função de diferentes espaçamentos entre linhas de semeadura. Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia, Guarapuava-PR, v.12, n.1, p.79-85. DOI: 10.5935/PAeT.V12.N1.08
- Ramos AC, Dobbss, LB, Santos LA, Fernandes MS, Olivares FL, Aguiar NO, Canellas LP (2015). Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, v. 2, p. 1-12.
- Reetz HF (2017). Fertilizantes e o seu uso eficiente. São Paulo: ANDA, v. 178.
- Ribeiro AC, Guimaraes PTG, Alvares VH (1999). Recomendações Para o Uso de Corretivos e Fertilizantes Em Minas Gerais: 5º Aproximação. UFV, Viçosa-MG.
- Skonieski FR, Viégas J, Martin TN, Mingotti CCA, Naetzold S, Tonin TJ, Dotto LR, Meinerz GR (2019). Effect of nitrogen topdressing fertilization and inoculation of seeds with *Azospirillum brasilense* on corn yield and agronomic characteristics. Agronomy, v. 9, n. 12, p. 1–11.
- Souza TV, Ribeiro CM, Scalon JD, Guedes FL (2014). Relações entre componentes de rendimento e características morfológicas de milho. Magistra, V. 26, n. 4, p. 495 – 506.
- Teixeira PC, Donagemma GK, Fontana A, Teixeira WG (2017). Manual de métodos de análise de solo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inoculação com bactérias promotoras de crescimento, combinada com a aplicação de substâncias húmicas, mostrou-se promissora para melhorar o crescimento e características fisiológicas de plantas de milho em casa de vegetação, destacando-se o potencial dessa abordagem para o aumento da produtividade agrícola.

Em condições de campo, a inoculação com bactérias promotoras de crescimento não resultou em alterações significativas no crescimento de plantas de milho em fase inicial de desenvolvimento, mas a adição de substâncias húmicas resultou em maior teor de açúcares e amido, indicando uma possível interação benéfica entre os dois tratamentos.

A escolha da bactéria promotora de crescimento e a dose adequada de substâncias húmicas são cruciais para otimizar o crescimento e a produtividade das plantas de milho, ressaltando a importância de mais pesquisas para a melhor compreensão dessa relação.

APÊNDICES

TABELAS SUPLEMENTARES – ARTIGO I

Tabela S1 - Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para as características porcentagem de emergência (EM), velocidade de emergência (VE), índice de velocidade de emergência (IVE) e coeficiente de velocidade de emergência (CVE) de plântulas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (N), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (B) e tratamentos adicionais (ADC), com nitrogênio em cobertura (ADC.1) e total (ADC.2)

Fonte de variação	GL	Valores de <i>P</i>			
		EM (%)	VE	IVE	CVE
Nível (N)	4	ns	ns	ns	ns
BACTERIA (B)	2	*	ns	*	ns
N X B	8	ns	ns	ns	ns
N X B vs ADC.	1	ns	ns	ns	ns
ADC.1 vs ADC.2	1	ns	ns	ns	ns
BLOCOS	3	ns	ns	ns	*
CV (%)		19,26	7,92	20,63	7,5

* = significativo ns = não significativo pelo teste F a 5% de significância.

Tabela S2 - Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para as características: altura (ALT) (cm planta⁻¹), diâmetro (DIAM) (mm planta⁻¹), número de folhas (NF) (planta⁻¹), área foliar (AF) (cm² planta⁻¹), massa seca da parte aérea (MSPA) (g planta⁻¹), massa seca da raiz (MSR) (g planta⁻¹), massa seca total (MST) (g planta⁻¹), relação raiz/parte aérea (R/PA) e volume de raiz (VR) (cm³ planta⁻¹) de plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (N), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (B) e tratamentos adicionais (ADC), com nitrogênio em cobertura (ADC.1) e total (ADC.2)

Fonte de variação	GL	Valores de <i>P</i>								
		ALT	DIAM	NF	AF	MSPA	MSR	MST	R/PA	VR
Nível (N)	4	**	**	**	ns	**	ns	**	**	**
BACTERIA (B)	2	**	**	**	ns	**	**	**	ns	**
N X B	8	**	**	ns	**	ns	**	**	**	**
N X B vs ADC.	1	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	**	**
ADC.1 vs ADC.2	1	**	*	ns	ns	ns	*	*	ns	*
BLOCOS	3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)		3,5	4,0	4,96	8,53	7,65	10,08	6,29	12,12	11,56

* = significativo a 5%; ** = significativo a 1%; ns = não significativo pelo teste F.

Tabela S3 - Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para as características: fotossíntese líquida (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), transpiração (E) ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), condutância estomática (g_s) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), clorofila total (CLOR) ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ planta}^{-1}$) e carotenoides (CAR) ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ planta}^{-1}$) de plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (N), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (B) e tratamentos adicionais (ADC), com nitrogênio em cobertura (ADC.1) e total (ADC.2)

Fonte de variação	GL	Valores de P				
		A	E	g_s	CLOR	CAR
Nível (N)	4	**	ns	ns	**	**
BACTERIA (B)	2	**	ns	ns	**	**
N X B	8	ns	ns	ns	**	**
N X B vs ADC.	1	ns	ns	ns	**	**
ADC.1 vs ADC.2	1	ns	ns	ns	**	**
BLOCOS	3	*	**	**	ns	ns
CV (%)		8,81	21,34	19,07	13,09	7,43

* = significativo a 5%; ** = significativo a 1%; ns = não significativo pelo teste F.

Tabela S4 - Resumo da análise de variância e coeficiente de variação para as características: teor de nitrogênio foliar (N) ($\text{g kg}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), nitrogênio foliar acumulado (N ACUM) (mg planta^{-1}), fósforo foliar (P) ($\text{g kg}^{-1} \text{ planta}^{-1}$) e fósforo acumulado foliar (P ACUM) (mg planta^{-1}) de plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (N), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (B) e tratamentos adicionais (ADC), com nitrogênio em cobertura (ADC.1) e total (ADC.2)

Fonte de variação	GL	P Values			
		N	N ACUM	P	P ACUM
Nível (N)	4	ns	ns	ns	ns
BACTERIA (B)	2	**	**	ns	ns
N X B	8	ns	ns	*	ns
N X B vs ADC.	1	**	**	ns	ns
ADC.1 vs ADC.2	1	**	**	*	**
BLOCOS	3	ns	ns	ns	ns
CV (%)		14,73	21,36	5,76	13,78

* = significativo a 5%; ** = significativo a 1%; ns = não significativo pelo teste F.

Tabela S5 - Porcentagem de emergência (EM) (%), velocidade de emergência (VE), índice de velocidade de emergência (IVE), coeficiente de velocidade de emergência (CVE), transpiração (E) ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$) e condutância estomática (g_s) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$), teor de nitrogênio foliar (N) ($\text{g kg}^{-1} \text{ planta}^{-1}$) e nitrogênio foliar acumulado (N ACUM) (mg planta^{-1}) do milho plantas em função da aplicação de doses de substâncias húmicas e testemunhas com cobertura de nitrogênio (TNC) e total (TNT)

Tratamento	EM (%)	VE	IVE	CVE	E	g_s	N	N ACUM
0,0 L ha ⁻¹	91,67 ^{4,16}	8,27 ^{0,21}	0,339 ^{0,016}	12,17 ^{0,28}	2,05 ^{0,14}	0,07 ^{0,005}	1,98 ^{0,15}	66,50 ^{4,85}
1,5 L ha ⁻¹	83,33 ^{6,21}	8,04 ^{0,20}	0,316 ^{0,023}	12,53 ^{0,31}	2,33 ^{0,18}	0,08 ^{0,002}	2,00 ^{0,14}	71,66 ^{4,33}
3,0 L ha ⁻¹	88,89 ^{6,0}	7,72 ^{0,12}	0,347 ^{0,022}	12,99 ^{0,21}	2,25 ^{0,20}	0,07 ^{0,004}	1,98 ^{0,13}	74,14 ^{6,28}
4,5 L ha ⁻¹	92,31 ^{4,16}	7,92 ^{0,14}	0,355 ^{0,018}	12,66 ^{0,21}	1,96 ^{0,20}	0,07 ^{0,006}	1,86 ^{0,18}	63,68 ^{7,15}
6,0 L ha ⁻¹	90,91 ^{4,16}	8,13 ^{0,18}	0,342 ^{0,019}	12,36 ^{0,30}	2,34 ^{0,12}	0,08 ^{0,005}	1,92 ^{0,11}	69,95 ^{3,75}
TNT	100,00 ^{0,0}	7,83 ^{0,17}	0,383 ^{0,010}	12,78 ^{0,26}	2,12 ^{0,21}	0,07 ^{0,010}	2,66 ^{0,23}	102,89 ^{10,78}
TNC	91,67 ^{8,33}	8,17 ^{0,29}	0,345 ^{0,040}	12,29 ^{0,41}	2,47 ^{0,30}	0,08 ^{0,010}	1,84 ^{0,08}	65,48 ^{2,29}
CV (%)	19,26	7,92	20,63	7,5	21,34	19,07	14,73	21,36

TABELA SUPLEMENTAR – ARTIGO II

Tabela S1 - Análise de variância das características morfofisiológicas de plantas de milho em função de diferentes concentrações de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (B) e tratamento adicional com nitrogênio (TN)

FV	GL	Efeitos de Significância												
		EM	VE	IVE	CVE	ALT	DIAM	MSPA	CLOR	CAR	AST	AR	AM	PRO
SH	2	**	**	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
B	3	ns	*	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	**	ns
SH X B	6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**	**
SH X B vs TN	1	ns	**	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	ns
BLOCOS	3	ns	**	**	**	*	ns	*	**	**	ns	ns	ns	ns
CV (%)		2,53	0,73	3,75	0,51	10,88	15,74	20,65	12,51	13,95	12,34	7,49	18,75	20,45

FV= fonte de variação; GL= graus de liberdade; CV= coeficiente de variação; EM= porcentagem de emergência; VE= velocidade de emergência; IVE= índice de velocidade de emergência; CVE= coeficiente de velocidade de emergência; ALT= altura; DIAM= diâmetro de colmo; MSPA= massa seca da parte aérea; CLOR= clorofila total; CAR= carotenoides; AST= açúcares solúveis totais; AMI= amido; e PRO= prolina. ns = não significativo; ** e * = significativo a 0,01 e a 0,05 de probabilidade pelo teste F.

TABELA SUPLEMENTAR – ARTIGO III

Tabela S1 - Análise de variância das características morfofisiológicas de plantas de milho em função de diferentes doses de substâncias húmicas (SH), inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (B) e tratamentos adicional: Testemunha com nitrogênio total (TN) e testemunha zero (T0)

FV	GL	Efeitos de Significância																
		AFB	DC	APE	MSPA	AF	CAR	CLOR	N	N ACUM	P	P ACUM	DE	CE	NFGE	NGF	PMG	PE
SH	2	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns
B	3	ns	**	**	*	ns	ns	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
SH X B	6	ns	**	**	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns
TEST	1	**	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	ns	**	**	**
SH X B vs TEST	1	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**	**
BLOCOS	3	*	**	ns	*	**	ns	ns	ns	**	ns	**	**	*	ns	**	ns	*
CV (%)		3,70	4,85	3,75	7,77	9,39	11,94	12,93	3,27	14,83	5,69	13,76	2,13	4,60	3,47	5,31	3,28	6,76

FV= fonte de variação; GL= graus de liberdade; CV= coeficiente de variação; TEST= testemunhas; AFB= altura da folha bandeira; DC= diâmetro de colmo; MSPA= massa seca da parte aérea; AF= área foliar; CAR= carotenoides; CLOR= clorofila total; N= teor de nitrogênio; N ACUM= nitrogênio acumulado; P= teor de fósforo; P ACUM= fósforo acumulado; DE= diâmetro de espiga; CE= comprimento de espiga; NFGE= número de fileiras de grãos por espiga; NGF= número de grãos por fileiras; PMG= peso de mil grãos; e PE= produtividade estimada. ns = não significativo; ** e * = significativo a 0,01 e a 0,05 de probabilidade pelo teste F.

FIGURA SUPLEMENTAR

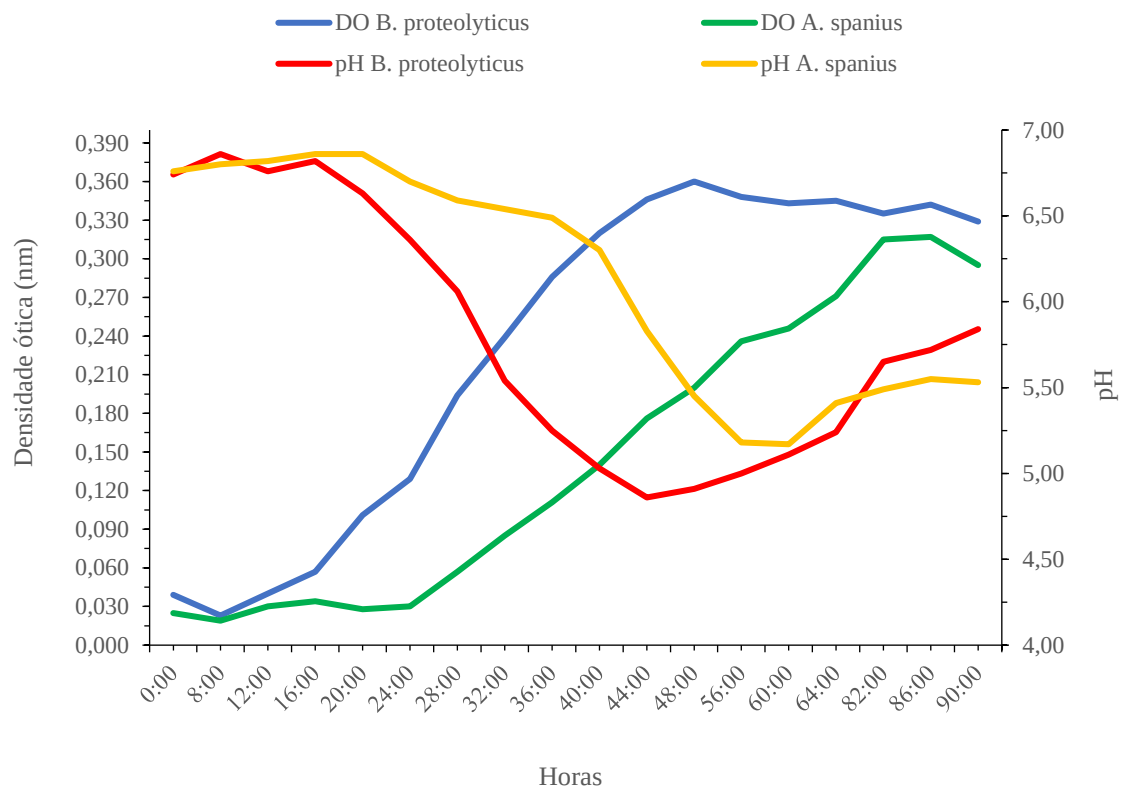


Fig. S1 – Curva de crescimento com densidade ótica (DO) e pH das bactérias *B. proteolyticus* e *A. spanius* em meio 79.

FOTOS EXPERIMENTO I – CASA DE VEGETAÇÃO



Figura 1. Local de realização do experimento.



Figura 2. Obtenção do inoculante: multiplicação do inóculo e preparo do inoculante. Meio de cultura 79 (A), estirpe *Bacillus proteolyticus* (UFRB FA72A2-1) (B), estirpe *Achromobacter spanius* (UFRB FA34C2-2) (C), estirpe comercial (*Azospirillum brasiliense* - Abv5 e Abv6) (D) e inoculação das sementes (E).

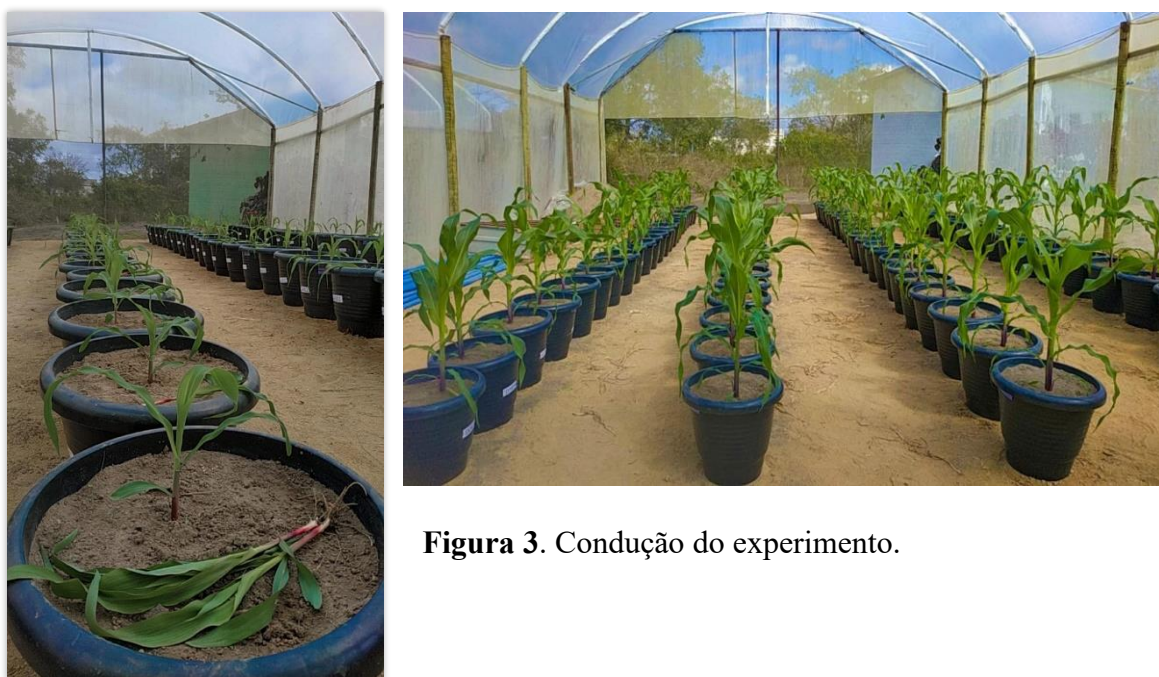


Figura 3. Condução do experimento.



Figura 4. Adubação de plantio e de cobertura.

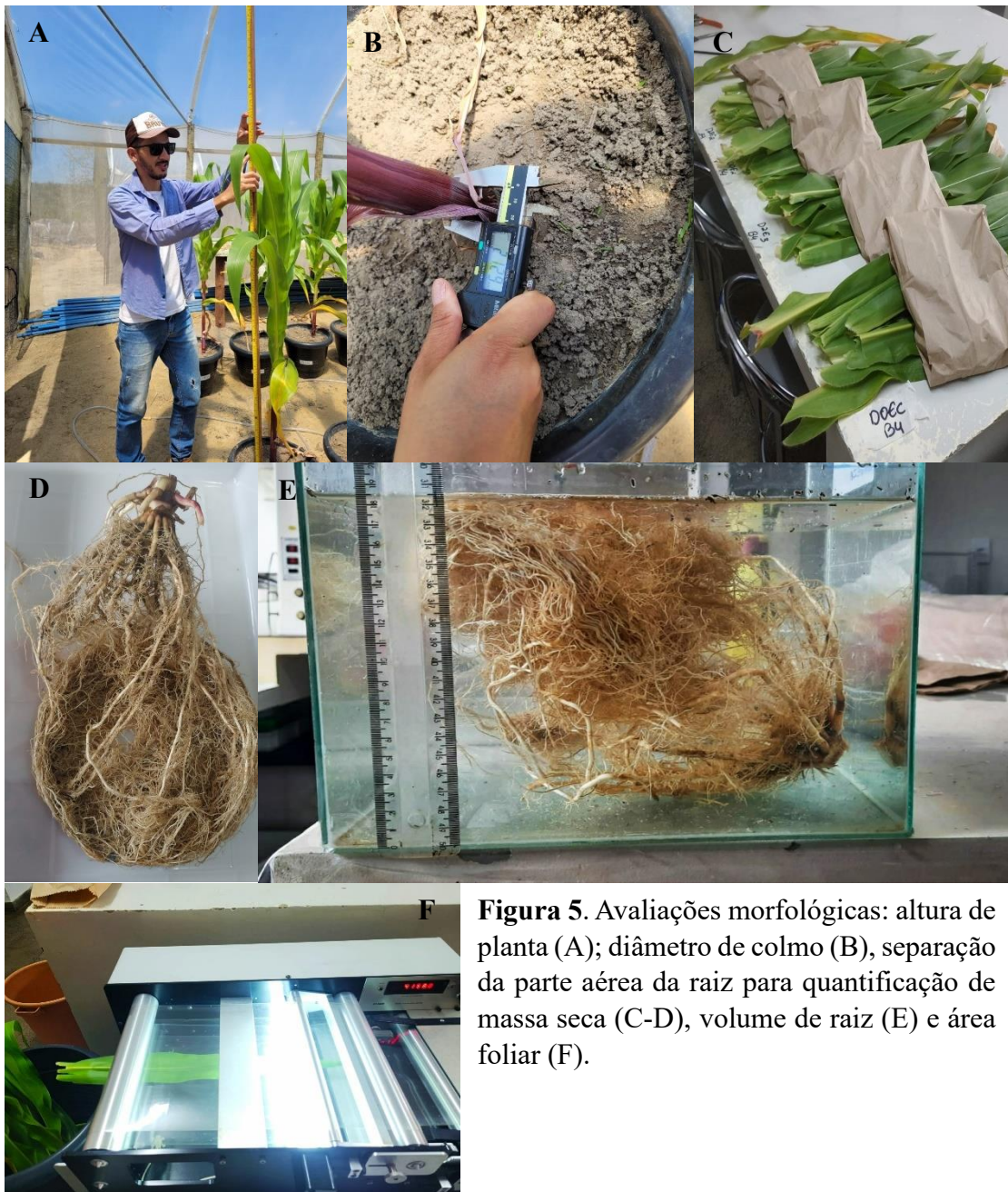


Figura 5. Avaliações morfológicas: altura de planta (A); diâmetro de colmo (B), separação da parte aérea da raiz para quantificação de massa seca (C-D), volume de raiz (E) e área foliar (F).



Figura 6. Avaliações fisiológicas e nutricionais: trocas gasosas (A-B); pigmentos fotossintéticos (C-D), teor de nitrogênio foliar (E-F-G), teor de fósforo foliar (H-I).

FOTOS DO EXPERIMENTO II e III – CAMPO



Figura 7. Área experimental (A); plantio (B), preparo da substância húmica (C-D) e aplicação das substâncias húmicas em suas respectivas doses sobre as sementes no sulco de plantio (E).



Figura 8. Avaliação da emergência de plântulas sete dias após o plantio (A) e estabilização da emergência das plântulas (B).



Figura 9. Desbaste aos 25 após a emergência (A) e adubação de cobertura 32 dias após a emergência (B).



Figura 10. Avaliação de diâmetro (A), coleta de folhas para análises nutricionais (B-C), maturação fisiológica (D) e colheita e secagem das espigas (E).

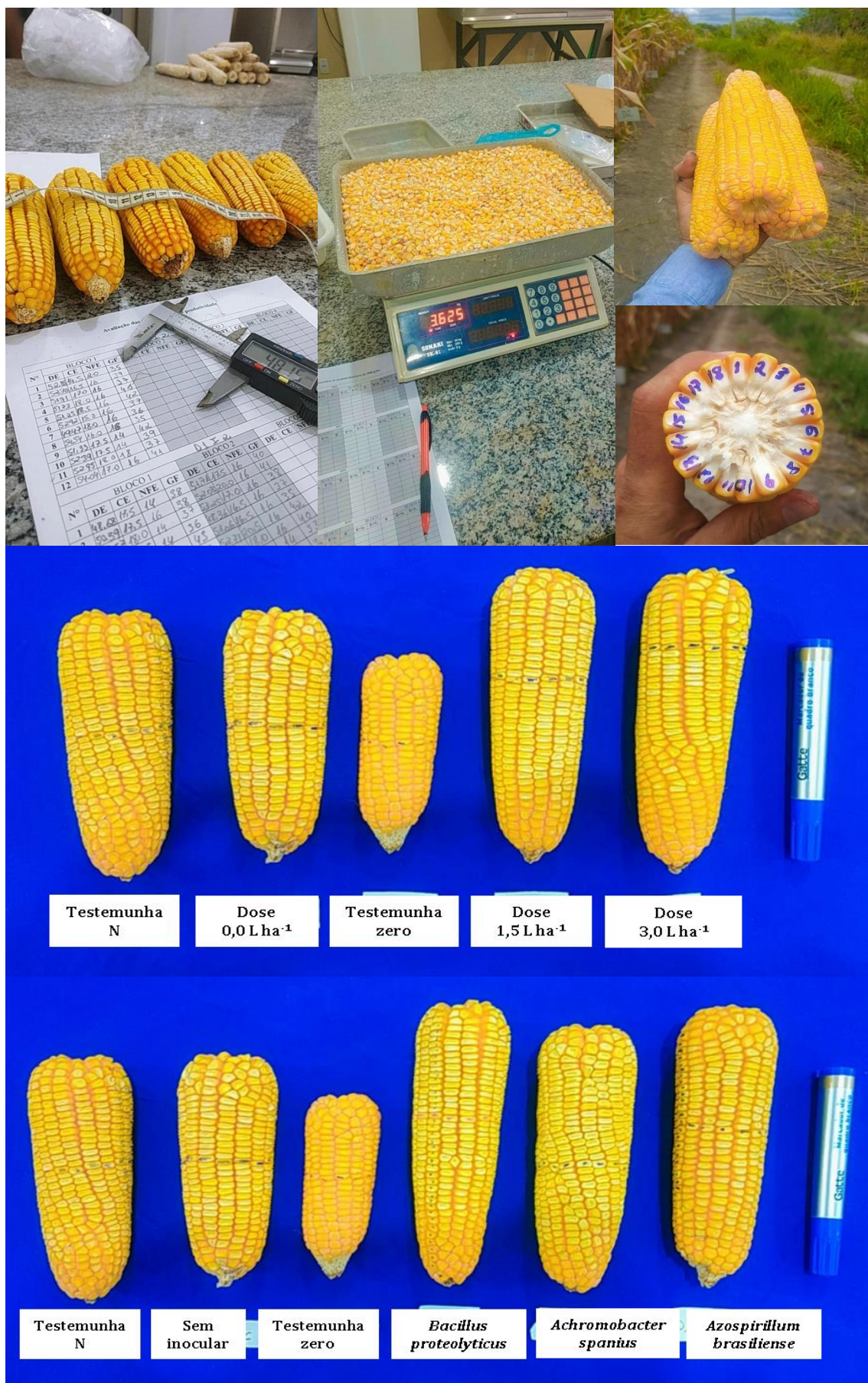


Figura 11. Avaliação dos parâmetros de produção.



Humic substances and plant growth-promoting bacteria enhance corn (*Zea mays* L.) development

Elismar Pereira de Oliveira^{a,*}, Poliana Prates de Souza Soares^b, Andreza de Jesus Correia^c,
Robson Silva da França^d, Divino Levi Miguel^a, Rafaela Simão Abrahão Nóbrega^c,
Patrícia Lopes Leal^{a,e}

^a Departamento de Engenharia Agrícola e Solos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Vitória da Conquista/BA, Brazil

^b Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Vitória da Conquista/BA, Brazil

^c Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – Programa de pós graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas/BA, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina/PI, Brazil

^e Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista/BA, Brazil



ARTICLE INFO

Article History:

Received 8 May 2023

Revised 15 November 2023

Accepted 16 January 2024

Available online xxx

Edited by: Dr Q. Kritzing

Keywords:

Fulvic acids

Humic acids

Corn

Diazotrophic bacteria

ABSTRACT

This study investigates the morphophysiological traits and nutritional status of corn plants subjected to varying levels of humic substances, plant growth-promoting bacteria, and conventional fertilization. A controlled greenhouse experiment was conducted, involving the administration of diverse humic substance concentrations (0.0, 1.5, 3.0, 4.5, and 6.0 L ha⁻¹), distinct bacterial strains (isolates UFRB FA72A2-1 + nitrogen supplementation, UFRB FA34C2-2 + nitrogen supplementation, and a commercial strain + nitrogen supplementation), alongside two control treatments (total nitrogen and cover), totaling 68 experimental plots. The evaluation encompassed parameters such as emergence percentage, emergence speed, emergence speed index, and emergence speed coefficient during the seedling emergence phase. Subsequently, the assessment extended to plant height, stem diameter, leaf count, leaf area, shoot biomass, root biomass, total dry mass, root volume, net photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, as well as the quantification of total chlorophyll, carotenoids, nitrogen, and phosphorus content. Corn plants inoculated with the UFRB FA72A2-1 isolate exhibited superior growth, marked by elevated leaf nitrogen content, enhanced photosynthetic pigment concentration, and increased net photosynthesis. As for the UFRB FA34C2-2 and the commercial strain, the combined application of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances elevated the concentration of photosynthetic pigments and resulted in heightened stem height and diameter. Moreover, this combination contributed to an augmented total dry mass in the case of the commercial strain. Application of humic substances in isolation at these specified concentrations yielded a significant enhancement in net photosynthesis and shoot dry mass for corn plants. This study underscores the potential synergy between plant growth-promoting bacteria and humic substances in stimulating corn plant growth. The effect of the combined application of humic substances with plant growth-promoting bacteria depends on the dose of the humic substance and the species involved.

© 2024 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Corn (*Zea mays* L.) presently stands as one of the foremost agricultural commodities within the Brazilian economic landscape. Brazil holds the distinction of being the third-largest producer of corn globally, with a bounteous yield of 102 million tons in the 2020/2021 harvest (USDA, 2021). This crop plays a pivotal role in generating employment and income across Brazil. Its versatile applications, spanning from fresh consumption to a wide array of industrial uses

for both human and animal consumption (Demétrio et al., 2008; Duarte et al., 2011), underscore its profound economic and societal significance for agribusiness and family farming.

Over the last four decades, Brazilian corn production has experienced remarkable growth. The harvest, initially yielding less than 20 million tons in the 1976/77 season (CONAB, 2022), burgeoned to the zenith of 102 million tons in the 2020/2021 season (USDA, 2021). However, achieving such high yields demands a considerable technological investment, entailing the intensive use of inputs often procured externally, consequently elevating the overall production costs. Notably, one of the crucial constraints in corn production is nutrient availability. The preeminent nutrient requirements

* Corresponding author.

E-mail address: elismarpdi@hotmail.com (E. Pereira de Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.01.031>

0254-6299/© 2024 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

encompass nitrogen and potassium, closely followed by calcium, magnesium, and phosphorus (Ribeiro, 2014).

Hence, there exists an imperative within the corn production sector to explore alternatives that mitigate the reliance on fertilizers without compromising productivity, thereby advancing the sustainability of agricultural production systems. In this context, the use of diazotrophic bacteria and humic substances emerges as promising avenues for enhancing corn crops.

Diazotrophic bacteria reside in the soil, the rhizosphere, and various plant parts. They can convert atmospheric nitrogen into forms assimilable by plants (Moreira et al., 2013). Beyond nitrogen fixation, these bacteria contribute significantly to various essential processes, including phosphate solubilization, hormone synthesis, pathogen antagonism, root growth induction, and enhanced water and nutrient uptake by plants (Doornbos et al., 2012; Moreira et al., 2013). Consequently, they are recognized as plant growth-promoting bacteria (PGPB).

Humic substances result from the chemical and biological degradation of plant and animal residues and microbial activities (Burlakovs et al., 2013). Their chemical, microbiological, and physical properties confer a heightened productivity due to the manifold advantages they bestow upon the physical, chemical, and microbiological structure of soil and plant metabolism (Caron et al., 2015). They serve as reservoirs for essential nutrients such as nitrogen, phosphorus, sulfur, and micronutrients, thus facilitating the enlargement of the root system, the development of root hairs and root cells, and the expansion of the contact surface with the soil solution (Canellas and Santos, 2005; Aguiar et al., 2009; Borcioni et al., 2016).

Several studies have been conducted on corn involving the inoculation of N₂-fixing bacteria (Sangoi et al., 2015; Dartora et al., 2013; Araújo et al., 2013; Dotto et al., 2010) and the application of humic substances (Filho et al., 2020; Baldotto et al., 2019; Batista et al., 2018; Rodrigues et al., 2017; Bowden et al., 2010; Verlinden et al., 2009). Nonetheless, these studies have yielded divergent outcomes, with scant information available on the responses resulting from the concurrent application of these biostimulants in corn crops.

The contrasting results in plants inoculated with PGPB can be attributed to the presence of indigenous soil microbiota, which generally tend to be competitive and well-adapted, thereby potentially mitigating the benefits of symbiosis (Pereira et al., 2013). Additionally, various environmental factors can influence the competitive dynamics of these microorganisms within the soil (Valiente-Banuet et al., 2015; Naamala et al., 2016). The effects of humic substances on plant growth are contingent on parameters such as the mode of application, the content of bioactive molecules, the source, dosage, and molecular weight of the humic fraction, in addition to the specific plant species (Canellas et al., 2010; Nardi et al., 2021).

In this study, we postulate that the combined application of pre-defined levels of humic substances and the inoculation with plant growth-promoting bacteria strains will promote corn development and enhance the supply of essential nitrogen and phosphorus. Accordingly, this study aims to evaluate the morphophysiological traits and nutritional status of corn plants exposed to various concentrations of humic substances, plant growth-promoting bacteria, and conventional fertilization.

2. Material and methods

2.1. Experimental site

The study was conducted in a greenhouse from July 11 (sowing) to September 15, 2022, at the Campus of the State University of Southwest Bahia (UESB) in Vitória da Conquista, situated at an altitude of 880 m, with geographical coordinates of 14°53'08" S and 40°48'02" W. Throughout the experiment, the temperature exhibited an average fluctuation ranging from 12.35 °C (minimum) to 24.12 °C

(maximum), accompanied by an average solar radiation of 2.30 MJ m⁻² and an average relative humidity spanning 80.53 % to 86.24 %.

2.2. Inoculant acquisition and preparation

Two isolates of plant growth-promoting bacteria were acquired from the Soil Biology Department of the Federal University of Recôncavo da Bahia (UFRB). The isolates, UFRB FA72A2-1 and UFRB FA34C2-2, were isolated by Sousa (2017), characterized and identified by Braulio (2023) as *Bacillus proteolyticus* and *Achromobacter spanius*, respectively. These isolates were cultivated in liquid YMA medium (Yeast, Mannitol, Agar) (Döbereiner et al., 1995) at 28 °C, under continuous agitation at 110 rpm, for a duration of 72 h. Subsequently, 5 mL aliquots were extracted to assess optical density and pH levels. Optical density measurements were conducted using a Hitachi spectrophotometer, model U-2001 UV/Vis, with absorbance recorded at 560 nm. The quantification of viable cells was ascertained through serial dilution, with inoculated plates employing the respective solid media. Additionally, a commercial inoculant recommended for corn crops, comprising the Abv5 and Abv6 strains of *Azospirillum brasiliense*, was also incorporated.

2.3. Soil characteristics

To investigate vegetative development, the experiment was conducted in a greenhouse, employing 21-liter plastic pots filled with 20 dm³ of soil retrieved from a depth of 0–0.20 m in an area historically designated for corn crops. Soil samples were collected, subjected to air-drying, and sifted through a 2 mm mesh. A 400 g portion was extracted for subsequent physical and chemical analysis, which were performed according to the methodologies prescribed by Embrapa (2011), with the results outlined in Table 1.

2.4. Experimental design

The experimental design was structured as randomized blocks within a 5 × 3 factorial arrangement. The first factor encompassed varying levels of humic substances (HS) – specifically Ecohumic® (0.0, 1.5, 3.0, 4.5, and 6.0 L ha⁻¹) – while the second factor featured distinct plant growth-promoting bacteria strains (B) (isolated UFRB FA72A2-1 + nitrogen top dressing (I1), UFRB FA34C2-2 isolate + top nitrogen (I2), and commercial strain + top nitrogen (CS)). Two additional control treatments were introduced (cover nitrogen (CNC) and total nitrogen (CTN)), thus culminating in a total of 68 experimental plots. The levels of Ecohumic® were judiciously selected based on the manufacturer's recommendations for corn crops (3.0 L ha⁻¹).

2.5. Planting and fertilization

For the planting phase, AG 1051 hybrid corn seeds were employed, originating from a semi-early cycle, characterized by a physiological maturation duration of 133–139 days, and intended for silage, green corn, and grain production. Three seeds were sown per pot at a depth of approximately 3 cm, and they were immersed in the inoculating solution, with a stipulated population of 10⁸ bacterial cells and designated HS levels in the respective treatments. The commercial inoculant was applied to the seeds before planting, with an application of 100 mL per 60,000 seeds, adhering to the manufacturer's recommendations. Additionally, 4.4 mL of sterilized inoculum was directly applied to each seed at the time of sowing. The inoculations involving isolates I1 and I2 were performed by pipetting 4.4 mL of the inoculum directly onto each seed during the sowing process. The HS utilized contained 10 % total organic carbon, 13 % humic acid, 17 % fulvic acid, 0 % humine, 10 gL⁻¹ potassium nitrate, 7.0 gL⁻¹ copper sulfate, 7.0 gL⁻¹ boric acid, and 0.5 gL⁻¹ of thickener. The respective levels were diluted in 60 mL of water, with 1 mL being applied to

Table 1
Chemical and physical analysis of the soil used in the experiment.

Soil Chemical Analysis													
pH	mg dm ⁻³	Cmol _c dm ⁻³ of soil							%		g dm ⁻³		g Kg ⁻¹
(H ₂ O)	*P	*K ⁺	**Ca ²⁺	**Mg ²⁺	**Al ³⁺	***H ⁺	BS	t	T	V	m	OM	TOC
5.4	31	0.09	2.0	0.5	0.2	3.2	2.6	2.8	6.0	43	7	16	9.28
Soil Physical Analysis													
Total sample fractions%			Granulometric composition (g Kg ⁻¹ of ADFE)						Textural class				
Fine earth < 2 mm			Coarse sand 2–0.20 mm		Thin sand 0.20–0.05 mm		Silt 0.05–0.002 mm		Clay < 0.002 mm				
100			550		170		20		260				

* Mehlich Extractor I;.

** KCl extractor 1 N;.

*** CaCl₂ 0.01 M; BS = bases sum; t = effective CEC; T = CEC at pH 7; V = base saturation; m = aluminum saturation; OM = organic matter; TOC = total organic carbon; and ADFE = air-dried fine earth.

each seed post-sowing. Plant thinning was performed 15 days after emergence (DAE), leaving a singular plant per pot, and regular irrigation was maintained to ensure soil moisture at a level approximating the pot's capacity, determined by soil water retention (Casaroli and Van Lier, 2008).

To fulfill the crop's nutrient requisites, fertilizations were carried out, entailing 80 Kg ha⁻¹ of nitrogen, with 20 Kg ha⁻¹ designated as planting fertilization, and this was administered solely to the total nitrogen control treatment, encompassing an application of 440 mg per vase of urea. Furthermore, 60 Kg ha⁻¹ comprised topdressing fertilization, which was systematically implemented across all treatments, utilizing 1330 mg per pot of urea. Phosphorus supply amounted to 30 Kg ha⁻¹, and this was administered in all treatments, with the source being simple superphosphate (1700 mg per vase). Potassium topdressing fertilization was applied to all treatments, involving 50 Kg ha⁻¹ of potassium chloride (860 mg of KCl per vase). All topdressing fertilizations were executed when the plants had achieved six to eight well-developed leaves (25 DAE). These fertilizations were administered in accordance with soil analysis and crop-specific recommendations (Ribeiro et al., 1999).

2.6. Morphological and physiological analyses

The experimental procedures were conducted until the onset of flowering, at which point a comprehensive evaluation encompassing emergence, morphological characteristics, physiological parameters, and leaf nutrient content were executed.

2.6.1. Emergence analysis

The assessment included parameters such as emergence percentage (EM), emergence velocity (EV), emergence velocity index (EVI), and emergence velocity coefficient (EVC). Evaluation of seedling emergence data commenced on the seventh day post-experiment initiation, coinciding with the first signs of emergence, and extended until the seedling emergence reached stabilization (16 days after sowing). Seedlings displaying a coleoptile emerging above the soil surface were classified as emerged. Results were expressed as the average percentage in conformity with the criteria established by the Seed Analysis Regulation (Brasil, 2009). Emergence speed assessment adhered to the methodology proposed by Edmond and Drapala (1958). The emergence speed index was determined through daily counts from the emergence of the first seedling, as per Maguire (1962). The emergence speed coefficient was calculated in accordance with the recommendations of Furbeck et al. (1993).

2.6.2. Morphological traits

Plant growth parameters were appraised at 60 DAE, encompassing height (H), measured by assessing all plants within each

treatment, and the maximum height at the plant base, at ground level, gauged using a ruler graduated in centimeters. Stem diameter (D) was determined at the base of the plant using a digital caliper and expressed in millimeters. The number of leaves (NL) was obtained by counting the leaves across all plants in each treatment.

Upon conclusion of the experiment, the plants were harvested and segregated into shoots and roots. Leaf area (LA) was determined by separating leaves from stems and subsequently measuring it with a LI 3100C leaf area meter, characterized by a resolution of 0.1 mm², with the results expressed in square centimeters (cm²). The plant parts were subjected to drying within an oven featuring forced air circulation, maintained at 65 °C, until achieving a constant weight. The production of shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), and total dry mass (TDM) were determined by weighing the dry plant materials using a precise digital scale. The root-to-shoot ratio (R/S) was computed by dividing the total dry mass of roots by the total dry mass of shoots. Root volume (RV) was determined by water displacement, employing a graduated ruler integrated into a glass box filled with a known volume. The root volume was determined by quantifying the difference between the initial and final values, reflecting the water displacement following root insertion.

2.6.3. Gas exchange and photosynthetic pigments

Gas exchange rates, inclusive of net photosynthesis (A), transpiration (E), and stomatal conductance (g_s), were ascertained by measuring gas exchange activities between 8 and 11 am. For this purpose, the middle third of the last fully expanded leaf, situated in the central section of the plant, served as the reference point. Leaf temperature was maintained at an average of 30 °C. The apparatus employed was an infrared gas analyzer (IRGA LCPro, ADC, UK), featuring a chamber area measuring 6.25 cm². During the measurements, the plants were exposed to an irradiance level of 1000 mmol photons m⁻² s⁻¹, with the CO₂ concentration in the air supplied to the IRGA set at 400 mmol mol⁻¹.

The determination of photosynthetic pigment content involved placing four leaf discs, each with a diameter of 7 mm, in a tube containing 5 mL of acetone (80 %) (Arnon, 1949), and allowing them to stand in darkness for 48 h to extract the pigments. Subsequently, the pigments were quantified using a spectrophotometer (Wellburn, 1994).

2.6.4. Leaf content of nitrogen and phosphorus

Dry material originating from the leaf area was subjected to grinding within a knife mill equipped with 1-mm sieves and stored in labeled plastic bags. The determination of nitrogen (N) content was conducted via sulfuric solubilization, coupled with the semi-micro Kjeldahl method. Phosphorus (P) content was ascertained through wet digestion involving perchloric nitric solubilization, with

spectrometry employing vanadate yellow; readings were taken at 420 nm, according to Carmo et al. (2000).

The accumulated content of N and P (ACCUM N and ACCUM P) within the leaf area was calculated by multiplying the determined values for each nutrient by the leaf dry mass (Jian et al., 2019).

2.7. Statistical analyses

All data underwent a normality test (Lilliefors) and a homogeneity of variances test (Cochran and Bartlett). Subsequently, an analysis of variance was conducted (F at 0.05). Post-analysis, qualitative treatment means were compared using the Scott-Knott test at a 5 % probability level. Quantitative data underwent regression analysis. Pearson's correlation coefficients were calculated for the analyzed variables, with significance tested using the Student t -test at both the 1 % and 5 % probability levels, using the software R, version 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Austria).

3. Results

Results obtained in the experiment reveal significant effects of isolated factors, specifically the levels of humic substances and plant growth-promoting bacteria, on various variables, including shoot dry mass, the number of leaves, and net photosynthesis (Supplementary Table 2 and 3). On the other hand, parameters such as the percentage of emergence, emergence velocity index, nitrogen content, and accumulated nitrogen were significantly influenced by the presence of plant growth-promoting bacteria alone (Supplementary Table 1 and 4).

Height, diameter, leaf area, root dry mass, total dry mass, root-to-shoot ratio, root volume, total chlorophyll, carotenoids, and phosphorus content were found to be influenced by the interaction between the levels of humic substances and plant growth-promoting bacteria (Supplementary Table 2, 3 and 4). However, variables like emergence velocity, emergence velocity coefficient, transpiration, stomatal conductance, and accumulated phosphorus did not exhibit significant effects ($p > 0.05$) among the treatments in this experiment (Supplementary Table 1, 3 and 4).

Notably, additional treatments, such as the total nitrogen control and cover nitrogen control, demonstrated a significant interaction with the factorial levels of humic substances and plant growth-promoting bacteria, but only for root dry mass, total dry mass, root-to-shoot ratio, root volume, total chlorophyll, carotenoids, nitrogen content, and accumulated nitrogen content (Supplementary Table 2, 3 and 4). These interactions were also significant among themselves for their respective characteristics, except for the root-to-shoot ratio, as well as phosphorus content, height, and diameter.

Analyzing the impact of plant growth-promoting bacteria in isolation, without the influence of humic substances, revealed positive effects on corn seedlings. For instance, the variables emergence percentage and emergence velocity index displayed higher values for the isolate UFRB FA72A2-1 than for the commercial strain but did not differ from the isolate UFRB FA34C2-2. However, there was no significant difference in the characteristics of emergence velocity and emergence velocity coefficient ($p > 0.05$) (Table 2).

With the inoculation of the isolate UFRB FA72A2-1, corn plants exhibited similar height values as a function of increasing levels of humic substances. In contrast, for the isolate UFRB FA34C2-2 and the commercial strain, the levels of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances resulted in greater height compared to the levels of 0.0, 4.5, and 6.0 L ha⁻¹ (Fig. 1A). Additionally, corn plants inoculated with UFRB FA72A2-1 showed a higher shoot dry mass and number of leaves compared to those inoculated with other bacteria, as indicated in Table 3.

Under inoculation with UFRB FA72A2-1 and the commercial strain, the increase in levels of humic substances led to an increase in

Table 2

Percentage of emergence (EM), emergence velocity (EV), emergence velocity index (EVI), and emergence velocity coefficient (EVC) of corn plants with isolates UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), commercial strain (CS) and controls with nitrogen coverage (CNC) and total (CTN).

Treatments	EM (%)	EV	EVI	EVC
I1	96.67 ^{2.29} a	7.99 ^{0.16} a	0.371 ^{0.01} a	12.610 ^{2.4} a
I2	90.00 ^{4.26} a	8.01 ^{0.14} a	0.3430 ^{0.01} a	12.56 ^{2.1} a
CS	81.67 ^{4.51} b	8.05 ^{0.13} a	0.307 ^{0.02} b	12.490 ^{2.1} a
CTN	100.00 ^{0.00}	7.83 ^{0.17}	0.3830 ^{0.01}	12.780 ^{2.8}
CNC	91.67 ^{8.33}	8.17 ^{0.28}	0.345 ^{0.01}	12.29 ^{2.4}
CV (%)	19.26	7.92	20.63	7.5

Means followed by the same letter in the column do not differ by the Scott-Knott test at 5 % significance. Superscript values are standard error.

stem diameter up to the estimated level of 3.36 and 3.16 L ha⁻¹, reaching maximum values of 25.02 and 26.09 mm per plant, respectively (Fig. 1B). Plants inoculated with UFRB FA72A2-1 exhibited a larger stem diameter compared to those inoculated with the other bacteria, except when using 3.0 L ha⁻¹ of humic substances, where there was no difference in values between bacteria.

Elevated levels of humic substances resulted in an increase in the number of leaves, but did not lead to an increase in leaf area for corn plants (Fig. 1C-D). For the level of 1.5 L ha⁻¹ of humic substances, the number of leaves was greater than that at the 0.0 level and other levels. At the 4.5 and 6.0 L ha⁻¹ of humic substances, there was a smaller number of leaves compared to 0.0, 1.5, and 3.0 (Fig. 1C). At the humic substance level of 1.5 L ha⁻¹, there was a greater leaf area under inoculation with the commercial strain. At the levels of 3.0 and 4.5 L ha⁻¹, there was a smaller leaf area in plants inoculated with UFRB FA34C2-2 compared to those inoculated with UFRB FA72A2-1 and the commercial strain. At the other levels, the leaf area did not differ between bacteria.

The application of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances resulted in an increase in shoot dry mass for corn plants (Fig. 2A). Under the inoculation with a commercial strain, increasing the level of humic substances to an estimated value of 2.65 L ha⁻¹ also promoted an increase in the total dry mass of plants, reaching a maximum weight of 147.18 g per plant, which was above the value found for the cover nitrogen control (142.75 g) and below that for total nitrogen (159.49 g per plant) (Fig. 2B). At levels of 0.0, 4.5, and 6.0 L ha⁻¹ of humic substances, there was a higher total dry mass in plants inoculated with UFRB FA72A2-1. For 1.5 L ha⁻¹, the total dry mass did not differ between treatments with bacteria. Under the application of 3.0 L ha⁻¹, the isolates UFRB FA72A2-1 and the commercial strain provided a higher total dry mass compared to UFRB FA34C2-2.

There was a significant interaction between the levels of humic substances and additional treatments for root volume, root dry mass, and root-to-shoot ratio. The total nitrogen and cover nitrogen controls displayed higher values of root volume, root dry mass, and root-to-shoot ratio than the average of humic substance levels and plant growth-promoting bacteria (Table 3). In addition, there was greater root volume and root dry mass for the total nitrogen control compared to the cover nitrogen control, with no difference between them for root-to-shoot ratio.

Generally, the application of humic substances did not result in an increase in root volume, root dry mass, and root-to-shoot ratio compared to the 0.0 level for any of the bacteria, except under inoculation with UFRB FA72A2-1. In this case, the application of humic substances at 1.5, 4.5, and 6.0 L ha⁻¹ resulted in a greater root volume (311.08, 353.00, and 355.33 cm³ per plant) than under the 0.0 level (266.67 cm³). For this same characteristic, the controls total nitrogen and cover nitrogen obtained values of 400.00 and 333.33 cm³ of plant root⁻¹.

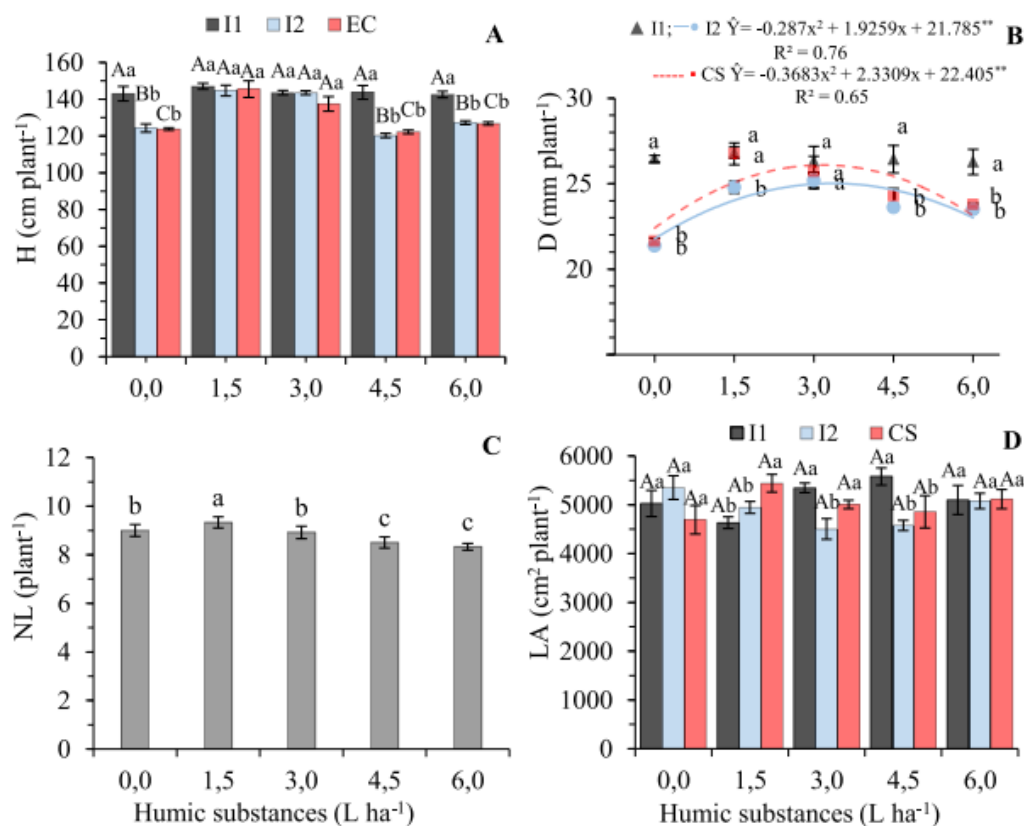


Fig. 1. Plant height (H) [A], stem diameter (D) [B], number of leaves (NL) [C] and leaf area (LA) [D] of corn plants inoculated with plant growth-promoting bacteria isolated UFRB FA72A2-1 (—, ▲ I1), UFRB FA34C2-2 (---, ● I2), commercial strain (---, ● CS) and different levels of humic substances. *Significant ($p < 0.01$), according to the t-test. Means followed by equal capital letters do not differ between levels of humic substances and equal lower case letters do not differ between bacteria (Scott-Knott test, $p < 0.05$).

Table 3

Root volume, root dry mass and root/shoot ratio of corn plants inoculated with isolates UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), commercial strain (CS) and controls with nitrogen coverage (CNC) and total (CTN).

Controls**	Strain	Root volume ($\text{cm}^3 \text{ plant}^{-1}$) Humic substances (L ha^{-1})				
		0.0	1.5	3.0	4.5	6.0
CTN	I1	400.00 ^{27.22} a	266.67 ^{0.00} Bb	311.08 ^{15.71} Aa	216.67 ^{16.67} Bb	353.00 ^{16.67} Aa
CNC	I2	333.33 ^{0.00} b	294.42 ^{16.67} Ab	333.33 ^{23.57} Aa	233.33 ^{13.61} Bb	266.67 ^{0.00} Bb
F	CS	299.81	333.33 ^{0.00} Aa	266.67 ^{0.00} Bb	316.66 ^{16.66} Aa	350.00 ^{40.00} Aa
Controls**		Root dry mass (g plant^{-1})				
		0.0	1.5	3.0	4.5	6.0
CTN	I1	45.99 ^{2.43} a	44.05 ^{2.12} Aa	34.52 ^{1.11} Ba	32.03 ^{0.67} Ba	47.31 ^{0.67} Aa
CNC	I2	39.86 ^{2.85} b	30.80 ^{1.01} Ab	33.91 ^{1.82} Aa	33.13 ^{3.49} Aa	29.91 ^{0.31} Ab
F	CS	35.33	32.13 ^{0.60} Ab	35.40 ^{3.59} Aa	37.93 ^{2.52} Aa	32.11 ^{0.94} Ab
Controls**		Root/shoot ratio				
		0.0	1.5	3.0	4.5	6.0
CTN	I1	0.40 ^{0.01} a	0.41 ^{0.018} Aa	0.28 ^{0.016} Ca	0.26 ^{0.012} Cb	0.42 ^{0.009} Aa
CNC	I2	0.39 ^{0.03} a	0.32 ^{0.010} Ab	0.28 ^{0.002} Aa	0.33 ^{0.000} Aa	0.33 ^{0.000} Aa
F	CS	0.33	0.34 ^{0.008} Ab	0.32 ^{0.027} Aa	0.33 ^{0.029} Aa	0.33 ^{0.010} Ab

** Means of the control treatments differ in relation to the mean of the factorial (F test, $p < 0.01$). Means followed by equal capital letters in the lines do not differ between levels of humic substances and lower case equals in the columns do not differ between controls or strains of bacteria (Scott-Knott test, $p < 0.05$). Superscript values are standard error. F: factorial mean (levels of humic substances (L) x plant growth-promoting bacteria (B)).

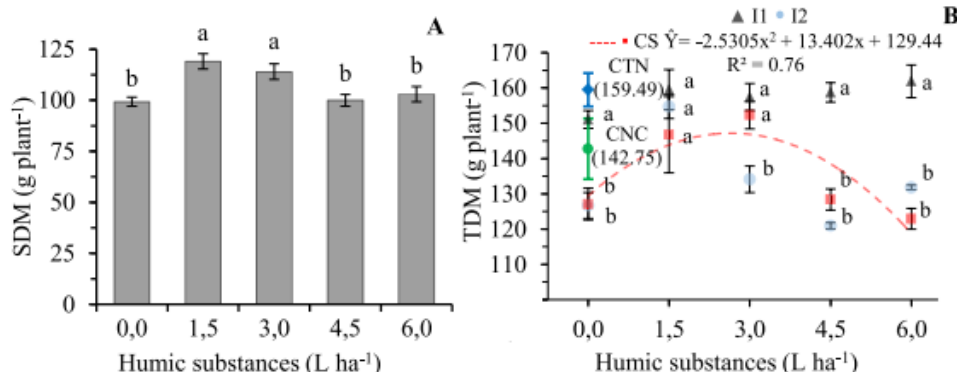


Fig. 2. Shoot dry mass (SDM) [A] as a function of application of humic substance levels total dry mass (TDM) [B] of corn plants as a function of application of humic substance levels and inoculation with isolates of plant growth-promoting bacteria UFRB FA72A2-1 (—△11), UFRB FA34C2-2 (—□12), commercial strain (—●CS) and controls with nitrogen coverage (—◆CNC) and total (—◆CTN). *Significant ($p < 0.01$), according to the t-test. Means followed by equal lowercase letters do not differ from each other (Scott-Knott test, $p < 0.01$).

With no application of humic substances and at levels of 3.0, 4.5, and 6.0 L ha⁻¹ of humic substances, corn plants inoculated with a commercial strain exhibited a root volume greater than or equal to the isolates (Table 3). Under the application of 1.5 L ha⁻¹ of humic substances, there was a smaller root volume under inoculation with the commercial strain compared to UFRB FA34C2-2 and a similar value to UFRB FA72A2-1.

At the levels of 0.0, 4.5, and 6.0 L ha⁻¹ of humic substances, there was a greater root dry mass under inoculation with UFRB FA72A2-1 and a greater root-to-shoot ratio at the levels of 0.0 and 4.5 for the purchased UFRB FA34C2-2 and the commercial strain. At the other levels, root dry mass and root-to-shoot ratio remained similar between strains. The total nitrogen control showed values of 45.99 g and 0.40, and the cover nitrogen control showed values of 39.86 g and 0.33, respectively, for these characteristics (Table 3).

Stomatal conductance and transpiration of corn plants were not influenced by the studied factors (Supplementary Table 3 and 5). However, for net photosynthesis, there was an isolated effect of bacterial strains and levels of humic substances. Values were higher under inoculation with UFRB FA72A2-1 (Table 3) and at the levels of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances (Fig. 3).

In plants inoculated with UFRB FA72A2-1, the increase in the levels of humic substances resulted in a linear decrease in the total chlorophyll content (Fig. 4A). For UFRB FA34C2-2 and the commercial strain, there was an increase in total chlorophyll with the increase in

humic substances up to the estimated levels of 2.63 and 2.82 L ha⁻¹, with a subsequent decrease at higher levels. In the absence of humic substances, the total chlorophyll content was higher under inoculation with UFRB FA72A2-1. Under the application of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹, there was a higher content for UFRB FA72A2-1, followed by UFRB FA34C2-2, and a lower content for the commercial strain. At the level of 4.5 L ha⁻¹, the levels did not differ between treatments with bacteria. The total nitrogen and cover nitrogen controls showed total chlorophyll contents of 0.0253 and 0.0152 $\mu\text{g cm}^{-2}$ per plant (Fig. 4A).

For the carotenoid content, the increase in the levels of humic substances caused a quadratic effect, increasing the content up to the estimated level of 2.0 L ha⁻¹ for UFRB FA72A2-1 and 2.5 L ha⁻¹ for UFRB FA34C2-2 and the commercial strain, with a subsequent decrease (Fig. 4B). Regardless of the levels of humic substances, corn plants inoculated with UFRB FA72A2-1 exhibited higher levels of carotenoids than UFRB FA34C2-2, and the commercial strain did not differ significantly. For the total nitrogen and cover nitrogen controls, the average values found were 0.0015 and 0.0012 $\mu\text{g cm}^{-2}$ per plant, respectively.

Corn plants, when inoculated with the bacterium UFRB FA72A2-1, showed higher leaf contents of nitrogen and accumulated nitrogen than when inoculated with the other bacteria. However, the average values remained lower than those of the total nitrogen and cover nitrogen controls, with total nitrogen being statistically greater than cover nitrogen, as indicated in Table 4.

Means followed by different lowercase letters in rows differ between bacteria and uppercase letters between additional treatments (Scott-Knott Test, $p < 0.05$). Superscript values are standard error. **Means of the control treatments differ in relation to the mean of the factorial (F test, $p < 0.01$).

The application of humic substances did not affect the leaf phosphorus content in corn plants. Under the application of 1.5 L ha⁻¹ of humic substances, there was a lower phosphorus content in plants inoculated with UFRB FA34C2-2 compared to UFRB FA72A2-1. At the application of 4.5 L ha⁻¹, there was a higher phosphorus content for the commercial strain compared to UFRB FA72A2-1. At the other levels of humic substances, phosphorus levels did not differ significantly between bacteria (Fig. 5).

The accumulated phosphorus content in leaves differed only between controls, with higher total nitrogen content (28.03 mg per plant) (Table 4).

Shoot dry mass and total dry mass exhibited a positive correlation with net photosynthesis and plant height. In turn, net photosynthesis correlated with carotenoid and total chlorophyll contents, plant

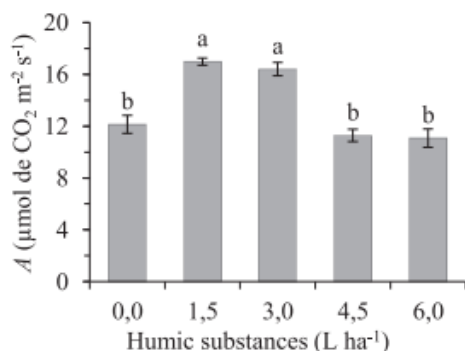


Fig. 3. Net photosynthesis (A) of corn plants as a function of the application of levels of humic substances. Means followed by the same lowercase letters do not differ from each other (Scott-Knott test, $p < 0.05$).

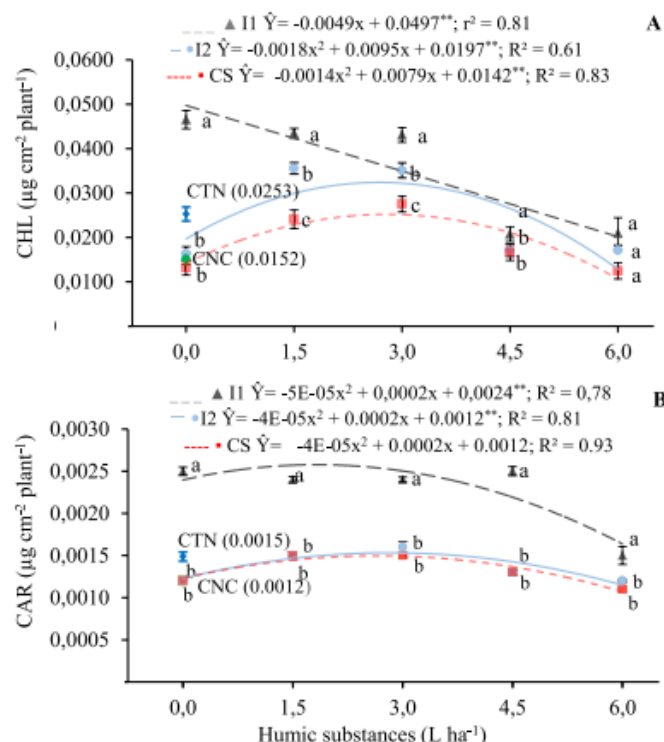


Fig 4. Contents of total chlorophyll (CHL) [A] and carotenoids (CAR) [B] in corn leaves as a function of the application of levels of humic substances and inoculation with isolates of plant growth-promoting bacteria UFRB FA72A2-1 (—▲ I1), UFRB FA34C2-2 (—● I2), commercial strain (---● EC), controls with nitrogen cover (● CNC) and total (● CTN). Means followed by the same lowercase letters do not differ between bacteria (Scott-Knott Test, $p < 0.01$). **Significant ($p < 0.01$), according to t-test.

height, and the number of leaves. The carotenoid content correlated with the total chlorophyll content, height, diameter, number of leaves, and leaf nitrogen content. Total chlorophyll correlated only with plant height. Finally, there was a correlation between height and diameter and leaf number with leaf nitrogen content (Table 5).

These results highlight a positive correlation between photosynthesis and pigment contents with the growth parameters of corn plants, particularly total dry mass, height, and the number of leaves.

4. Discussion

The inoculation of corn seeds with UFRB FA72A2-1 and UFRB FA34C2-2 bacteria yielded a higher percentage of emergence and emergence velocity index (Table 2), which may contribute to

enhanced seedling vigor. Vigorous seedlings have a competitive edge, particularly under challenging conditions such as limited light, nutrients, and water stress, which can significantly influence crop establishment. These findings suggest that the UFRB FA72A2-1 and UFRB FA34C2-2 isolates may enhance the concentration of organic solutes, thereby modifying the osmotic balance (Santos et al., 2014), thus facilitating water uptake by seeds.

The results concerning the inoculation of seeds with plant growth-promoting bacteria were diverse. Inoculations with *Bacillus proteolyticus* increased the germination of seeds and the growth of corn and peanut plants (Omeiri et al., 2022; Trinh et al., 2023), and *Achromobacter spanius* increased germination of *Vigna radiata* seeds (Ahmad et al., 2006). Inoculation with *Azospirillum brasiliense* increased the emergence percentage of corn seeds (Barilli et al.,

Table 4

Shoot dry mass (SDM) (g plant^{-1}), number of leaves (NL plant^{-1}), net photosynthesis (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ plant}^{-1}$), transpiration (E) ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ plant}^{-1}$), stomatal conductance (g_s) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ plant}^{-1}$), leaf nitrogen content (N) ($\text{g kg}^{-1} \text{ plant}^{-1}$), accumulated leaf nitrogen (ACCUM N) (mg plant^{-1}) and accumulated leaf phosphorus (ACCUM P) (mg plant^{-1}) of corn plants with isolated UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), commercial strain (CS), and controls with nitrogen cover (CNC) and total (CTN).

Treatments	SDM	NL	A	E	g_s	N	ACCUM N	ACCUM P
I1	117.69 ^{2.20a}	9.70 ^{0.10a}	15.52 ^{0.57a}	2.04 ^{0.15a}	0.07 ^{0.003a}	2.47 ^{0.07a}	85.26 ^{3.19a}	23.29 ^{0.91a}
I2	101.49 ^{2.68b}	8.30 ^{0.13b}	12.7 ^{0.73b}	2.26 ^{0.12a}	0.08 ^{0.004a}	1.64 ^{0.07b}	57.84 ^{2.84b}	23.56 ^{0.45a}
CS	101.71 ^{2.88b}	8.45 ^{0.13b}	12.51 ^{0.65b}	2.26 ^{0.15a}	0.08 ^{0.004a}	1.74 ^{0.06b}	64.14 ^{3.41b}	25.03 ^{0.89a}
CTN	113.50 ^{2.38A}	9.00 ^{0.41A}	13.13 ^{1.09A}	2.12 ^{0.21A}	0.07 ^{0.01A}	2.66 ^{0.16***A}	102.89 ^{7.29***A}	28.03 ^{0.72A}
CNC	102.90 ^{6.92A}	8.75 ^{0.25A}	12.29 ^{1.36A}	2.47 ^{0.39A}	0.08 ^{0.01A}	1.84 ^{0.05***B}	65.48 ^{1.61***B}	23.15 ^{1.53B}
CV (%)	7.65	4.96	8.81	21.34	19.07	14.73	21.36	13.98

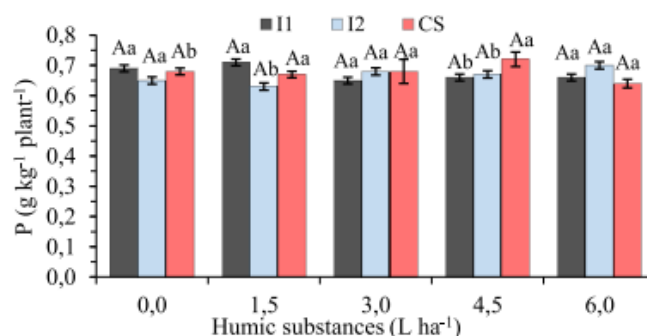


Fig. 5. Leaf phosphorus (P) content in corn plants as a function of humic substances levels and inoculation with isolates of plant growth-promoting bacteria UFRB FA72A2-1 (I1), UFRB FA34C2-2 (I2), commercial strain (CS). Means followed by the same uppercase letters do not differ between levels of humic substances and the same lowercase letters do not differ between bacteria (Scott-Knott Test, $p < 0.05$).

2011), while under inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* Z67 no effect was observed (Conceição et al., 2008). However, both studies revealed an increase in root and shoot fresh mass in seedlings.

The increase in humic substance levels up to 3.0 L ha^{-1} led to an increase in the content of photosynthetic pigments (Fig. 4 AB). This increase is most likely due to the higher photosynthetic rate at levels of 1.5 and 3.0 L ha^{-1} (Fig. 3) resulting from enhanced light absorption capacity. This observation is supported by the positive correlation between the photosynthetic rate and chlorophyll and carotenoid contents (Table 4). Furthermore, the beneficial effects of humic substances on photosynthesis are not solely derived from increased chlorophyll content; they also involve changes in plant gene expression and the content of chemical compounds involved in the photosynthetic process (Shah et al., 2018).

In plants inoculated with the isolate UFRB FA34C2-2 and the commercial strain, a quadratic adjustment was made for the total chlorophyll content due to increased humic substance levels. However, for UFRB FA72A2-1, there was a linear reduction. These results indicate that in plants inoculated with PGPB the positive effects of humic substances on chlorophyll content may vary depending on the species. The increase in pigment content up to the level of 3.0 L ha^{-1} in plants inoculated with UFRB FA34C2-2 and the commercial strain is attributed to the influence of humic substances on nitrogen assimilation

and metabolism, contributing to increased chlorophyll molecule synthesis (Canellas and Olivares, 2014). The decrease observed at higher levels demonstrates a dose-dependent effect, with an optimal dose at intermediate levels (Verlinden et al., 2009).

Monocotyledonous plants such as corn can meet a significant portion of their nitrogen requirements by associating with diazotrophic bacteria. In addition to contributing to nitrogen fixation, inoculation with these microorganisms is correlated with improved nitrogen uptake from the soil (Carvalho et al., 2014). In this study, corn plants inoculated with UFRB FA72A2-1 exhibited a higher nitrogen content than UFRB FA34C2-2 and the commercial strain (Table 3). This led to higher levels of photosynthetic pigments (Fig. 4), net photosynthesis, shoot dry mass, and leaf number (Table 4). Additionally, a trend toward greater values for height, stem diameter (Fig. 1 AB), and root dry mass (Table 3) was observed. These results underscore the idea that the effect of bacteria on promoting growth is related to nitrogen acquisition.

The higher leaf nitrogen and accumulated nitrogen content in corn plants inoculated with the bacterium UFRB FA72A2-1 (Table 4) may be attributed to greater efficiency in biological nitrogen fixation and a more developed root system mediated by the production of growth-related phytohormones, resulting in more efficient water and nutrient uptake (Pankiewicz et al., 2021). Corroborating these findings, plants inoculated with UFRB FA72A2-1 exhibited a tendency

Table 5
- Estimates of Pearson's correlation coefficients with their respective significances between 16 morphophysiological variables of corn under different levels of humic substances and inoculation with plant growth-promoting bacteria.

Variables	LA	SDM	RDM	TDM	R/S	RV	A	CAR	CHL	H	D	NL	P	ACCUM P	N
SDM	0.13ns														
RDM	0.29*	0.33ns													
TDM	0.22ns	0.93**	0.65**												
R/S	0.21ns	-0.35ns	0.76**	0.01ns											
RV	0.05ns	0.03ns	0.35ns	0.16ns	0.30ns										
A	-0.05ns	0.67**	0.2ns	0.62*	-0.23ns	-0.23ns									
CAR	0.13ns	0.55ns	0.4ns	0.59ns	0.05ns	-0.18ns	0.64**								
CHL	-0.10ns	0.56ns	0.18ns	0.52ns	-0.18ns	-0.32**	0.78**	0.74**							
H	0.14ns	0.68**	0.41ns	0.71**	-0.05ns	-0.60ns	0.75**	0.62*	0.62*						
D	0.20ns	0.49ns	0.38ns	0.54ns	0.05ns	-0.30ns	0.56ns	0.63*	0.59ns	0.63**					
NL	0.16ns	0.49ns	0.28ns	0.51ns	-0.03ns	-0.03ns	0.61*	0.74**	0.60ns	0.59ns	0.52ns				
P	0.03ns	-0.02ns	0.03ns	0.0ns	0.02ns	0.03ns	-0.19ns	0.01ns	0.02ns	-0.07ns	0.11ns	-0.10ns			
ACCUM P	0.36**	0.15ns	0.01ns	0.12ns	-0.11ns	0.15ns	-0.09ns	-0.11ns	-0.10ns	0.05ns	0.13ns	-0.02**	0.49ns		
N	0.11ns	0.49ns	0.48ns	0.58ns	0.15ns	0.16ns	0.35ns	0.65**	0.44ns	0.54ns	0.47ns	0.65**	0.12ns	-0.01ns	
ACCUM N	0.28ns	0.52ns	0.41ns	0.58ns	0.05ns	0.23ns	0.32ns	0.50ns	0.32ns	0.52ns	0.46ns	0.52ns	0.12ns	0.43ns	0.86**

ns not significant;

* significant at the 5 % probability ($p < 0.05$); and

** significant at the 1 % probability ($p < 0.01$) according to the t-test. H= height, D= stem diameter, NL= number of leaves, LA= leaf area, SDM and RDM= shoot and root dry mass, TDM= total dry mass, R/S= root/shoot ratio, RV= root volume, A= net photosynthesis, CAR= carotenoids, CHL= total chlorophyll, N= nitrogen content, ACCUM N = accumulated nitrogen, P= phosphorus content, and ACCUM P= accumulated phosphorus.

toward higher root dry mass (Table 3), leading to a subsequent increase in shoot dry mass (Table 4).

The successful interaction between diazotrophic bacteria and the host may involve controlling the bacterial population and/or improving root development (Vargas et al., 2012). In this study, the superior performance of corn plants inoculated with UFRB FA72A2-1 is possibly attributed to a more effective interaction of this isolate with the plants, as evidenced by the root dry mass values (Table 3) and nitrogen contents (Table 4). The enhanced growth of plants inoculated with *Bacillus* is due to its ability to solubilize phosphates, produce phytohormones, fix nitrogen, in addition to acting in the biocontrol of phytopathogens (Huang et al., 2015; Miljaković et al., 2020).

The lower performance of plants inoculated with isolates UFRB FA34C2-2 and IC is attributed to the fact that the mechanisms of growth promotion vary depending on the species of PGPB (Ahmad et al., 2006). Additionally, isolates may differ in their contribution to nitrogen fixation. *Achromobacter spanius* isolates have the ability to solubilize phosphate, produce indoleacetic acid, exopolysaccharides and siderophores, but the capacity for nitrogen fixation has shown variable results, both positive (Verma et al., 2019) and negative (Ahmad et al., 2006; Samet et al., 2022).

Despite the lower results for UFRB FA34C2-2 and the commercial strain in comparison to UFRB FA72A2-1, for these plants, the addition of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances favored an increase in photosynthetic pigment content (Fig. 4), height (Fig. 1A), stem diameter (Fig. 1B), and total dry mass for the commercial strain (Fig. 2B). Therefore, the application of humic substances up to a dose of 3.0 L ha⁻¹ in conjunction with less efficient nitrogen-supplying bacteria can enhance the effects on corn plant growth. This is possibly due to chemical changes in the rhizosphere induced by humic substances, which stimulate the emergence of lateral roots and an increase in the number of mitotic sites, facilitating the colonization of plants by diazotrophic bacteria (Conceição et al., 2009; Da Silva Lima et al., 2014). Positive effects of the combined use of diazotrophic bacteria and humic acids have been reported for corn, leading to increased plant height, stem diameter, and root length and volume (De Oliveira Araújo et al., 2016). In this study, independent applications of humic substances at the levels of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ also resulted in increased shoot dry mass of corn plants (Fig. 2A).

The interaction between plant growth-promoting bacteria and humic substances induces chemical changes in the rhizosphere, which can result in enhanced root growth and nutrient uptake (Olivares et al., 2017). Humic substances enhance nutrient uptake by plants by activating the enzyme H⁺-ATPase, increasing the electrochemical proton gradient, and promoting ion transport across cell membranes (Baldotto et al., 2009; Canellas and Olivares, 2014). Furthermore, they can form complexes with metal ions, thereby increasing the availability of nutrients such as phosphorus, zinc, manganese, copper, and iron (García et al., 2016). In this study, the application of humic substances to corn plants inoculated with plant growth-promoting bacteria did not lead to increased root development (Table 3) and greater nutrient acquisition of phosphorus and nitrogen. This is likely because the positive effect of humic substances on nutrient uptake mainly occurs when these nutrients are limited in the soil. In this study, the plants received nutrients according to the crop's requirements. Additionally, plant growth-promoting bacteria contribute to nitrogen supply and phosphorus uptake (Glick, 2012).

The results of this study underscore the importance of further research to explore alternative technologies or combinations of technologies to promote plant growth. The goal is to enhance plant physiological processes and nutrient acquisition, making agricultural systems more sustainable and economically viable. In this study, the application of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances to plants inoculated with the UFRB FA34C2-2 isolate and the commercial strain

resulted in additive effects, leading to improvements in corn development.

5. Conclusions

Inoculation with the UFRB FA72A2-1 isolate enhanced plant growth, coupled with elevated leaf nitrogen content, total chlorophyll, carotenoids, and photosynthetic rate. In the case of plants inoculated with UFRB FA34C2-2 and the commercial strain, the application of 1.5 and 3.0 L ha⁻¹ of humic substances resulted in increased photosynthetic pigments and overall plant growth. This study underscores the potential of utilizing plant growth-promoting bacteria combined with humic substances to facilitate corn plant growth. The effect of the combined application of humic substances with plant growth-promoting bacteria on corn plants depends on the dose of the humic substance and the species involved. Further investigations are warranted to gain a more comprehensive understanding of this intricate relationship.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Elismar Pereira de Oliveira: Writing – original draft, Writing – review & editing, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology. **Poliana Prates de Souza Soares:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Andreza de Jesus Correia:** Data curation. **Robson Silva da França:** Formal analysis. **Divino Levi Miguel:** Formal analysis, Visualization. **Rafaela Simão Abrahão Nobrega:** Supervision, Methodology, Writing – review & editing. **Patrícia Lopes Leal:** Supervision, Methodology, Writing – review & editing.

Acknowledgements

We thank Dr. Rafaela Simão Abrahão Nobrega for providing the bacterial isolates used in this study; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brazil for granting a scholarship to the EPO; to Koppert Biological Systems and Agroindustria Ferrari for supplying their products (Azokop® and Ecohumic®) used in the study; and the Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) and the Programa de Pós-Graduação em Agronomia for research support. This research is associated with the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Biodiversidade do Solo (INCT-CNPq).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.sajb.2024.01.031.

References

- Aguiar, N.D.O., Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Zandonadi, D.B., Olivares, F.L., Façanha, A.R., 2009. Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 33, 1613–1623. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000600010>.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Aqil, F., Ahmed Wani, A., Sousche, Y.S., 2006. Plant growth promoting potential of free-living diazotrophs and other rhizobacteria isolated from Northern Indian soil. *Biotechnol. J.* 1 (10), 1112–1123. <https://doi.org/10.1002/biot.200600132>.
- Araújo, E.D.O., Mercante, F.M., Vitorino, A., Nunes, D., Paim, L., Mendes, D., 2013. Produtividade do milho em resposta a aplicação de nitrogênio e à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. *Embrapa Agropecuária Oeste- Artigo em Anais de Congresso (ALICE)*. Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, 34, 2013, Florianópolis. Ciência do solo: para quê e para quem: anais. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de

- Clência do Solo <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/966908/1/CBCSARAJOPRODUTIVIDADE.pdf>. (Accessed 8 February 2023).
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24 (1). <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Giro, V.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R., 2009. Performance of 'Victoria' pineapple in response to humic acid application during acclimatization. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 33, 979–990. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000400022>.
- Baldotto, M.A., DE Melo, R.O., Baldotto, L.B., 2019. Field corn yield in response to humic acids application in the absence or presence of liming and mineral fertilization. *Semin. Ciênc. Agrar.* 40, 3299–3304. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3299>.
- Barilli, D.R., Tsutsumi, C.Y., May, A., Miranda, A.M., Hachmann, T.L., Modonlon, T.A., 2011. Eficiência na inoculação do milho com *Azospirillum brasilense* em diferentes períodos antes da semeadura. *Cadern. Agroecol.* 6 (2), 1–5. <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/view/11724>.
- Batista, V.V., Adami, P.F., Ferreira, V.B., Giacomel, C.L., Silva, J.S., Olinigi, K.F., 2018. Humic/fulvic acid and nitrogen in the corn crop yield. *Rev. Bras. Eng. Biosist.* 12, 257–267. <https://doi.org/10.18011/bioeng2018v12n3p257-267>.
- Borioni, E., Mógor, Á.F., Pinto, F., 2016. Influence of the application of fulvic acid on seedling root growth and yield in lettuce. *Rev. Ciênc. Agron.* 47, 509–515. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160061>.
- Bowden, C.L., Evanylo, G.K., Zhang, X., Ervin, E.H., Seiler, J.R., 2010. Soil carbon and physiological responses of corn and soybean to organic amendments. *Compost Sci. Util. Emmaus* 18, 162–173. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2010.10736952>.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Regras Para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Mapa/ACS, Brasília, DF, p. 399.
- Braulio, C.S., 2023. Microrganismos na Promoção de Crescimento de feijão-Caupi e Maracujazeiro e no Controle de Fusariose. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, p. 142.
- Burlakovs, J., Kļaviņš, M., Osinska, L., Purmalis, O., 2013. The impact of humic substances as remediation agents to the speciation forms of metal in soil. *APCBEE Procedia* 5, 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.apcb.2013.05.034>.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 1 (3). <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>.
- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R., 2010. Composição química e propriedades de bioatividade de frações granulométricas separadas de um vermicomposto ácido húmico. *Chemosphere* 78 (4), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.018>.
- Canellas, L.P., Santos, G.A., 2005. HUMOSFERA, tratado Preliminar Sobre a Química das Substâncias Húmicas. UENF.
- Carmo, C.D.S., De Araujo, W.S., Bernardi, A.D.C., Saldanha, M.F.C., 2000. Métodos de Análise de Tecidos Vegetais Utilizados na Embrapa Solos.
- Caron, V.C., Graças, J.P., Castro, P.R.C., 2015. Condicionadores do Solo: Ácidos Húmicos e Fúlvicos. ESALQ/USP, Piracicaba.
- Carvalho, T.L.G., Balsemão-Pires, E., Saraiva, R.M., Ferreira, P.C.G., Hemery, A.S., 2014. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J. Exp. Bot.* 65 (19), 5631–5642. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru319>.
- Casaroli, D., Van Lier, Q.J., 2008. Critérios para determinação da capacidade de campo. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 32, 59–66. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832008000100007>.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2022. Série Histórica Das Safras. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>. (Accessed 8 November 2022).
- Conceição, P.M., Vieira, H.D., Canellas, L.P., Marques-Júnior, R.B., Olivares, F.L., 2008. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesq. Agropec. Brasil* 43. <https://doi.org/10.1590/S0100-204x2008000400015> 545–8.
- Conceição, P.M.D., Vieira, H.D., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Conceição, P.S.D., 2009. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. *Ciênc. Rural* 39. <https://doi.org/10.1590/S0103-847820090005000137> 1880–188.
- Da Silva Lima, L., Olivares, F.L., De Oliveira, R.R., Vega, M.R.G., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2014. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 23 (1). <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0023-z>.
- Dartora, J., Guimarães, V.F., Marini, D., Sander, G., 2013. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.* 17, 1023–1029. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013001000001>.
- De Oliveira, A.E., Rocha, J.R., Gerola, J.G., Matte, L.C., 2016. Diazotrophic bacteria inoculation associates with acid and nitrogen in corn. *Afr. J. Plant Sci.* 10, 162–166. <https://doi.org/10.5897/AJPS2016.1394>.
- Demétrio, C.S., Fornasier Filho, D., Cazetta, J.O., Cazetta, D.A., 2008. Desempenho de híbridos de milho submetidos a diferentes espaçamentos e densidades populacionais. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43, 1691–1697. <https://doi.org/10.1590/S0100-204x2008001200008>.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.L., 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa SP.
- Doornbos, R.F., Van Loon, L.C., Bakker, P.A., 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 227–243. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0028-y>.
- Dotto, A.P., Lana, M.D.C., Steiner, F., Frandoloso, J.F., 2010. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. *Rev. Bras. Ciênc. Agrar.* 5, 376–382. <https://www.redalyc.org/pdf/1190/119016971016.pdf>.
- Duarte, J.O., Garcia, J.C., Miranda, R.A., 2011. Sistema de Produção: Cultivo do Milho, 7th ed. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivadoMilho_7ed/economia.htm. (Accessed 4 January 2023).
- Edmond, J.B., Drapala, W.J., 1958. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 71, 428–434.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, 2011. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). p. 230. Manual de Métodos de Análise de Solo. Rio de Janeiro.
- Filho, J.F.D.C.L., Thomason, W.E., Evanylo, G.K., Zhang, X., Strickland, M.S., Chim, B.K., Bermand, C., Diatta, A., 2020. Corn response to an Integrated Plant Nutrition System (IPNS) with humic acid and biofertilizers. *J. Agric. Sci.* 12, 25–41. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n8p25>.
- Furbeck, S.M., Bourland, F.M., Watson, C.E., 1993. Relationship of seed and germination measurements with resistance to seed weathering cotton. *Seed Sci. Technol.* 21 (3), 505–512. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=4008726>.
- Garcia, A.C., Santos, L.A., de Souza, L.G.A., Tavares, O.C.H., Zonta, E., Gomes, E.T.M., Garcia-Mina, J.M., Barbara, R.L.L., 2016. Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *J. Plant Physiol.* 192, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.008>.
- Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Sci-entifica*, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.
- Huang, X.-F., Zhou, D., Manter, D.K., Reardon, K.F., Vivanco, J.M., 2015. *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *J. Appl. Microbiol.* 118 (3), 672–684. <https://doi.org/10.1111/jam.12720>.
- Jian, L., Bai, X., Zhang, H., Song, X., Li, Z., 2019. Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* under copper and zinc stress. *PeerJ* 7, e6875. <https://doi.org/10.7717/peerj.6875>.
- Maguire, J.D., 1962. Speeds of germination-aid in selection and evaluation for seedling-emergence and vigor. *Crop Sci.* 2 (2), 176–177.
- Miljaković, D., Marinković, J., Balešević-Tubić, S., 2020. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* 8 (7), 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>.
- Moreira, F.M.S., Lima, A.S., Jesus, E.C., Silva, K.D.A., Nóbrega, R.S.A., Florentino, L.A., 2013. Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que nodulam leguminosas. In: Moreira, F.M.S., Cares, J.E., Zanetti, R., Stürmer, S.L. (Eds.), O ecossistema Solo: Componentes, Relações Ecológicas e Efeitos Na Produção Vegetal. Ed. UFLA, Lavras, pp. 327–340.
- Naamala, J., Jaiswal, S.K., Dakora, F.D., 2016. Antibiotics resistance in rhizobium: type, process, mechanism and benefit for agriculture. *Curr. Microbiol.* 72, 804–816. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1005-0>.
- Nardi, S., Schiavon, M., e Francioso, O., 2021. A estrutura química e a atividade biológica das substâncias húmicas definem seu papel como promotores de crescimento vegetal. *Molecules* 26 (8), 2256. <https://doi.org/10.3390/molecules26082256>.
- Olivares, F.L., Busato, J.G., De Paula, A.M., Da Silva Lima, L., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2017. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>.
- Omeiri, M., Khnazyer, R., Yusef, H., Tokajian, S., Salloum, T., Mokh, S., 2022. *Bacillus* spp. isolated from soil in Lebanon can simultaneously degrade methomyl in contaminated soils and enhance plant growth. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 39, 102280. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102280>.
- Pankiewicz, V.C.S., Do Amaral, F.P., Ané, J.M., Stacey, G., 2021. Diazotrophic bacteria and their mechanisms to interact and benefit cereals. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3 (5), 491–498. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-20-0316-FI>.
- Pereira, M.G., Santos, C.E., Freitas, A.D., Stamford, N.P., Rocha, G.S., Barbosa, A.T., 2013. Interações entre fungos micorrízicos arbusculares, rizóbios e actinomicetos na rizosfera de soja. *Rev. Bras. Eng. Agr. Ambient.* 17 (12), 1249–1256. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013001200001>.
- Ribeiro, A.C., Guimaraes, P.T.G., Alvares, V.H., 1999. Recomendações Para o Uso de Corretivos e Fertilizantes Em Minas Gerais: 5ª Aproximação. UFV, Viçosa-MG.
- Ribeiro, S.S., 2014. Cultura do milho no Brasil. *Rev. Cientif. Semana Acad.* 49, 1–13.
- Rodrigues, L.A., Alves, C.Z., Rego, C.H.Q., Silva, T.R.B.D., Silva, J.B.D., 2017. Humic acid on germination and vigor of corn seeds. *Rev. Caatinga* 30, 149–154. <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n116rc>.
- Samet, M., Ghazala, I., Karray, F., Abid, C., Chiah, N., Nouri-Ellouz, O., Sayadi, S., Gargouri-Bouazid, R., 2022. Isolation of bacterial strains from compost teas and screening of their PGPR properties on potato plants. *Sci. Pollut. Res.* 29, 75365–75379. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21046-8>.
- Sangoi, L., Da Silva, L.M.M., Mota, M.R., Panison, F., Schmitt, A., De Souza, N.M., Giordani, W., Schenatto, D.E., 2015. Desempenho agrônomo do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 39, 1141–1150. <https://doi.org/10.1590/01000683rbc20140736>.
- Santos, J.F.D., Sacramento, B.L.D., Mota, K.N.A.B., Souza, J.T.D., Azevedo Neto, A.D.D., 2014. Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. *Pesq. Agropec. Trop.* 44, 142–150. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632014000200008>.
- Shah, Z.H., Rehman, H.M., Akhtar, T., Alsamady, H., Hamooh, B.T., Mujtaba, T., Daur, I., Zahran, Y.A., Alzahrani, H.A.S., Ali, S., Yang, S.H., Chung, G., 2018. Humic substances: determining potential molecular regulatory processes in plants. *Front. Plant Sci.* 9, 263. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00263>.
- Sousa, J.X., 2017. Promoção do Crescimento Vegetal por Bactérias Diazotróficas No Feijão-Caupi. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, p. 73. Dissertação (Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas).
- Trinh, L.L., Le Nguyen, A.M., Nguyen, H.H., 2023. Root-associated bacteria *Bacillus albus* and *Bacillus proteolyticus* promote the growth of peanut seedlings and protect

- them from the aflatoxigenic *Aspergillus flavus* CDP2. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 47, 102582. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102582>.
- USDA - United States Department Of Agriculture, 2021. World Agricultural Production. <https://www.fiesp.com.br/arquivo-download/?id=273518>. (Accessed 6 September 2022).
- Valiente-Banuet, A., Aizen, M.A., Alcántara, J.M., Arroyo, J., Cocucci, A., et al., 2015. Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Funct. Ecol.* 29 (3), 299–307. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12356>.
- Vargas, L., De Carvalho, T.L.G., Ferreira, P.C.G., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Hemerly, A.S., 2012. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. *Plant Soil* 356, 127–137. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1274-8>.
- Verlinden, G., Pycke, B., Mertens, J., Debersaques, F., Verheyen, K., Baert, G., Bries, J., Haesaert, G., 2009. Application of humic substances results in consistent increases in crop yield and nutrient uptake. *J. Plant Nutr.* 32 (9), 1407–1426. <https://doi.org/10.1080/01904160903092630>.
- Verma, P., Yadav, A.N., Khannam, K.S., Mishra, S., Kumar, S., Saxena, A.K., Suman, A., 2019. Appraisal of diversity and functional attributes of thermotolerant wheat associated bacteria from the peninsular zone of India. *Saudi J. Biol. Sci.* 26 (7), 1882–1895. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.042>.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144 (3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).