UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

GABRIELA DA SILVA FREITAS

INOCULAÇÃO FOLIAR COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E EFICIÊNCIA DE USO DO NITROGÊNIO em *Urochloa brizantha* cv. Marandu

Ilha Solteira
2026

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GABRIELA DA SILVA FREITAS

INOCULAÇÃO FOLIAR COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E EFICIÊNCIA DE USO DO NITROGÊNIO em *Urochloa brizantha* cv. Marandu

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Reges Heinrichs
Coorientadores: Profa. Dra. Camille Eichelberger Granada
Prof. Dr. Raul Antônio Sperotto

Ilha Solteira

2026

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

F866i

Freitas, Gabriela da Silva.
Inoculação foliar com bactérias promotoras de crescimento e eficiência de uso do nitrogênio em *Urochloa brizantha* cv. Marandu / Gabriela da Silva Freitas. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2026
142 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2026

Orientador: Reges Heinrichs
Coorientador: Camille Eichelberger Granada e Raul Antônio Sperotto
Inclui bibliografia

1. Forrageiras. 2. *Azospirillum*. 3. *Bacillus*. 4. Isótopos estáveis. 5. Análise dos proteomas. 6. Rizosfera.

Elaborada por Raiane da Silva Santos - CRB-8/9999

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Inoculação foliar com bactérias promotoras de crescimento e eficiência de uso do nitrogênio em *Urochloa brizantha* cv. Marandu

AUTORA: GABRIELA DA SILVA FREITAS
ORIENTADOR: REGES HEINRICHS
COORIENTADOR: RAUL ANTONIO SPEROTTO
COORIENTADORA: CAMILLE EICHELBERGER GRANADA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia, área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Prof. Assoc. REGES HEINRICHS (Participaçao Virtual)
Departame Docu mento assinado digitalmente gov.br REGES HEINRICHS Data: 25/08/2026 08:16:52-0300 Verifi que em https://validar.iti.gov.br SP / Câmpus de Dracena - FCAT

Docu mento assinado digitalmente gov.br VAGNER DO NASCIMENTO Data: 25/08/2026 15:34:55-0300 Verifi que em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. VAGNER DO NASCIMENTO (Participaçao Virtual)
Departamento de Produção Vegetal / UNESP / Câmpus de Dracena - FCAT

Pesquisador Dr. ADÔNIS MOREIRA (Participaçao Virtual)
Fertilidad[illegible] / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAP Docu mento assinado digitalmente gov.br ADONIS MOREIRA Data: 25/08/2026 12:33:59-0300 Verifi que em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr LUIZ ARNALDO FERNANDES (Participaçao Virtual)
Instituto de Ciê Docu mento assinado digitalmente gov.br LUIZ ARNALDO FERNANDES Data: 25/08/2026 13:28:06-0300 Verifi que em https://validar.iti.gov.br ederal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. BORJA VELAZQUEZ MARTI (Participaçao Virtual)
Universidad Politécnica de Valencia

Ilha Solteira, 21 de agosto de 2026.

Faculdade de Engenharia - Câmpus de Ilha Solteira
Av. Brasil Centro, 56, 15385007, Ilha Solteira - São Paulo
https://www.feis.unesp.br/#/ppge - CNPJ: 48.031.918/0015-20.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa apresenta potencial para contribuir para o desenvolvimento de sistemas de produção de pastagens mais eficientes e sustentáveis, especialmente por demonstrar que bactérias promotoras de crescimento de plantas podem atuar como ferramentas complementares ao manejo da adubação nitrogenada em *Urochloa brizantha* cv. Marandu. Os resultados indicam que a associação entre inoculação bacteriana e doses moderadas de nitrogênio pode favorecer a recuperação do N-fertilizante, o estado nutricional, o desempenho fisiológico e a produção de forragem.

A identificação de estirpes com maior potencial de resposta, especialmente *Bacillus* sp. N72, e da coinoculação com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp., amplia as possibilidades de utilização de bioinsumos no manejo de pastagens tropicais. A utilização mais eficiente do nitrogênio pode contribuir para otimizar a adubação, reduzir perdas de nutrientes e manter níveis adequados de produtividade, particularmente em condições de disponibilidade moderada de N.

A pesquisa contribui para estratégias de intensificação sustentável da pecuária, uma vez que o aumento da eficiência de uso e recuperação do nitrogênio pode reduzir a dependência de maiores doses de fertilizantes nitrogenados e, consequentemente, os potenciais impactos associados à sua produção e aplicação. Além disso, os resultados de proteômica e microbioma fornecem informações sobre os mecanismos fisiológicos, metabólicos e microbianos associados à interação entre plantas e bactérias, ampliando a compreensão dos processos envolvidos na promoção do crescimento vegetal.

Assim, a pesquisa apresenta impacto potencial tanto aplicado quanto científico, ao integrar avaliações de produtividade, nutrição mineral, fisiologia vegetal, uso de ^{15}N, proteômica e microbioma. Esse conjunto de informações pode subsidiar futuras pesquisas e estratégias de manejo que busquem maior eficiência no uso de fertilizantes nitrogenados, maior produtividade das pastagens e redução dos impactos ambientais da produção pecuária.

POTENCIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research has the potential to contribute to the development of more efficient and sustainable pasture production systems, particularly by demonstrating that plant growth-promoting bacteria can act as complementary tools to nitrogen fertilization management in *Urochloa brizantha* cv. Marandu. The results indicate that the association between bacterial inoculation and moderate nitrogen rates may improve fertilizer N recovery, plant nutritional status, physiological performance, and forage production.

The identification of strains with greater potential, particularly *Bacillus* sp. N72, as well as co-inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus* spp., expands the possibilities for using biological inputs in tropical pasture management. More efficient nitrogen use may contribute to optimizing fertilization practices, reducing nutrient losses, and maintaining adequate productivity levels, particularly under conditions of moderate N supply.

This research contributes to strategies for the sustainable intensification of livestock production, as improved nitrogen use and recovery efficiency may reduce the dependence on higher rates of nitrogen fertilizers and, consequently, the potential environmental impacts associated with their production and application. In addition, the proteomic and microbiome results provide insights into the physiological, metabolic, and microbial mechanisms associated with plant–bacteria interactions, expanding the understanding of the processes involved in plant growth promotion.

Therefore, this research has both applied and scientific potential by integrating evaluations of productivity, mineral nutrition, plant physiology, ^{15}N utilization, proteomics, and microbiome composition. This integrated approach may support future research and management strategies aimed at improving nitrogen fertilizer use efficiency, increasing pasture productivity, and reducing the environmental impacts of livestock production.

DEDICATÓRIA

A Deus, fonte de força e sabedoria, que conduziu cada passo desta jornada. Este trabalho é testemunho de que a fé, aliada à determinação, torna possível vencer desafios e transformar sonhos em realidade.

Dedico esta conquista a todos os que travaram suas batalhas e se reergueram. Que esta caminhada inspire outros a acreditar que, mesmo nas adversidades, é possível encontrar dentro de si a força que sustenta, orienta e transforma.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, alicerce da minha vida, que me concedeu proteção e saúde para seguir e persistir, mesmo diante das dificuldades ao longo do processo.

Ao meu pai, Sidnei Forini de Freitas, meu maior exemplo de resiliência, que, durante todo o meu desenvolvimento, mostrou que, quando queremos, é possível encontrar uma forma de executar; alguém que sempre procura melhorar e dar o seu melhor aos seus. À minha mãe, Simone da Silva Cruz Freitas, minha base de apoio, que me permite dedicar-me aos estudos e me auxilia em todos os momentos, sendo abrigo, orientação e o empurrão que, por vezes, foi necessário.

Ao meu filho, Kaique Freitas Boneto, meu maior incentivo para crescer pessoal e intelectualmente, que me ajuda todos os dias a buscar o meu melhor. Ao meu namorado Guilherme Carlos, por todo apoio e cuidado comigo.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", em especial à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira e à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena, pelo suporte e pela oportunidade.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro concedido por meio do Auxílio à Pesquisa (Processo nº 2023/13986-3), que possibilitou a execução desta pesquisa e a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. Reges Heinrichs, pela orientação, apoio, paciência, aconselhamento e amizade, registro minha sincera gratidão. Aos coorientadores, Profª. Dra. Camille Eichelberger Granada e Prof. Dr. Raul Antônio Sperotto, que se fizeram presentes em todos os momentos, pela parceria marcada por dedicação e disponibilidade. Aos funcionários de campo da Unesp, em especial Allan e Rodrigo, pela ajuda e paciência na condução do experimento.

Aos professores Carolina Bonini, Fernando Shintate Galindo e Paulo Renato Lopes, agradeço pela dedicação e maestria em transmitir conhecimento, bem como por todo o apoio durante o curso.

Aos amigos que tornaram a caminhada mais leve e sempre agregaram conhecimento ao processo, em especial José Augusto Liberato, Maurício Bruno, Melissa Alexandre, Laura

Nantes, Lucila Vilela, Flávia Rodrigues, Kátia Lirian, Júlia e Carol, meus sinceros agradecimentos.

Ao Grupo de Experimentação em Nutrição e Adubação de Plantas (GENAP), por todas as oportunidades de aprendizado e pelo auxílio durante a pesquisa. Aos alunos de graduação Matheus Okazuka, José Antônio e João Pedro, pela valiosa colaboração.

“Confia no Senhor de todo o teu coração.
Reconhece-o em todos os teus caminhos,
e ele endireitará as tuas veredas.”
Provérbios 3:5–6

RESUMO

As pastagens ocupam extensas áreas e representam a base da alimentação na pecuária nacional. Porém grande parte dessas áreas possuem um manejo inadequado que prejudicam seu crescimento e desenvolvimento. O uso de microrganismos diazotróficos surgem como alternativa para melhorar o desenvolvimento e características fisiológicas das forragens. O objetivo foi avaliar o potencial de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, aplicados via foliar e associados a diferentes doses de nitrogênio (N), em promover o crescimento de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, por meio da avaliação da eficiência de uso e recuperação do N-fertilizante (^{15}N), estado nutricional, parâmetros fisiológicos, produção de biomassa, além de alterações no proteoma e no microbioma rizosférico. O delineamento foi blocos casualizados, com quatro repetições, os tratamentos foram: T1) controle (sem N e sem inoculação), T2) 80 kg ha^{-1} N, T3) 40 kg ha^{-1} N, T4) T3 + *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (AZ), T5) T3 + *Bacillus* S26 (S26), T6) T3 + *Bacillus* N72 (N72), T7) T3 + AZ + S26 + N72, T8) AZ + S26 + N72, T9) AZ, T10) S26, T11) N72. Foram avaliados atributos biométricos, nutricionais e fisiológicos das plantas, a eficiência de uso e recuperação do fertilizante nitrogenado pela técnica isotópica com ^{15}N, bem como análises de proteômica diferencial e do microbioma rizosférico. Os resultados foram sistematizados em três capítulos, organizados nos eixos temáticos *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), *Bacillus* sp. S26 e N72 e coinoculação. Os resultados demonstram que a dose de 80 kg ha^{-1} N proporciona maior produtividade. A inoculação associada à dose de 40 kg ha^{-1} N promove ganhos em eficiência de recuperação do N-fertilizante, desempenho fisiológico e estado nutricional das plantas. A estirpe *Bacillus* sp. N72 destaca-se em favorecer a recuperação do N aplicado, enquanto a coinoculação com *A. brasilense* e *Bacillus* spp. teve produtividade semelhante às maiores doses de N. As análises isotópicas evidenciam que a maior parte do N acumulado pelas plantas foi proveniente do solo, enquanto as análises de proteômica e microbioma revelam alterações em processos relacionados ao metabolismo energético, fotossíntese, assimilação de carbono e N e na composição das comunidades microbianas da rizosfera. Diante disso, quando se considera exclusivamente a produtividade a melhor dose foi 80 kg ha^{-1} N. No entanto, para características fisiológica relacionadas a metabolismo e microbioma a associação de N com *A. brasilense* e *Bacillus* sp. N72 obtiveram desempenho superior.

Palavras-chave: Forrageiras; *Azospirillum; Bacillus*; isótopos estáveis; análise dos proteomas; rizosfera.

ABSTRACT

Pastures occupy extensive areas and represent the basis of livestock production in Brazil. However, a large proportion of these areas are inadequately managed, which negatively affects pasture growth and development. The use of diazotrophic microorganisms has emerged as an alternative for improving the growth and physiological characteristics of forage plants. The objective of this study was to evaluate the potential of Azospirillum brasilense, Bacillus sp. S26, and Bacillus sp. N72, applied via foliar application and associated with different nitrogen (N) rates, to promote the growth of Urochloa brizantha cv. Marandu. This was assessed through the evaluation of nitrogen fertilizer (^{15}N) use and recovery efficiency, plant nutritional status, physiological parameters, biomass production, and alterations in the proteome and rhizospheric microbiome. The experimental design consisted of randomized blocks with four replications. The treatments were: T1) control (without N and inoculation), T2) 80 kg ha^{-1} N, T3) 40 kg ha^{-1} N, T4) T3 + Azospirillum brasilense Ab-V5 + Ab-V6 (AZ), T5) T3 + Bacillus S26 (S26), T6) T3 + Bacillus N72 (N72), T7) T3 + AZ + S26 + N72, T8) AZ + S26 + N72, T9) AZ, T10) S26, and T11) N72. Plant biometric, nutritional, and physiological attributes were evaluated, along with nitrogen fertilizer use and recovery efficiency using the ^{15}N isotopic technique, as well as differential proteomic and rhizospheric microbiome analyses. The results were organized into three chapters according to the following thematic axes: Azospirillum brasilense (Ab-V5 + Ab-V6), Bacillus sp. S26 and N72, and co-inoculation. The results demonstrated that the rate of 80 kg ha^{-1} N provided the highest productivity. Inoculation associated with the rate of 40 kg ha^{-1} N increased nitrogen fertilizer recovery efficiency, physiological performance, and plant nutritional status. The strain Bacillus sp. N72 stood out for enhancing the recovery of applied N, whereas co-inoculation with A. brasilense and Bacillus spp. resulted in productivity similar to that obtained with the highest N rate. Isotopic analyses showed that most of the N accumulated by the plants originated from the soil, whereas proteomic and microbiome analyses revealed changes in processes related to energy metabolism, photosynthesis, carbon and N assimilation, and the composition of rhizospheric microbial communities. Therefore, when productivity alone is considered, the best treatment was 80 kg ha^{-1} N. However, with regard to physiological characteristics related to metabolism and the microbiome, the combination of N with A. brasilense and Bacillus sp. N72 showed superior performance.

Keywords: Forage grasses; *Azospirillum*; *Bacillus* sp.; stable isotopes; proteome analysis; rhizosphere.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Precipitação pluvial mensal e médias históricas, e temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período experimental. Dracena, SP, 2024/2025. Dados obtidos da estação meteorológica da UNESP/FCAT – Dracena 43

Figura 2. Produtividade de massa seca (MS) do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no período experimental de dois anos agrícolas (2023/2024 e 2024/2025), sob inoculação em área total com bactérias e doses de N. Os cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8 referem-se ao período das águas, enquanto os cortes 4, 5 e 9 referem-se ao período das secas. Tratamentos: T1 – controle (sem inoculação e sem N); T2 – 80 kg N ha^{-1}, sem inoculação; T3 – 40 kg N ha^{-1}, sem inoculação; T4 – 40 kg N ha^{-1}(T3) + *Azospirillum brasilense* (AZ); T5 – *Azospirillum brasilense* (AZ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos dentro de cada corte ($p \leq 0,05$) 50

Figura 3. Matriz de correlação de Pearson entre os nutrientes na parte aérea do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no ano de 2024, sob inoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e adubação nitrogenada. (a) Período das águas referente ao corte 2 (U) e (b) período da seca referente ao corte 4 (S). Os valores nas células representam o coeficiente de correlação (r), e os asteriscos indicam significância estatística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns = não significativo). A escala de cores indica a direção e intensidade da correlação (azul = positiva; vermelho = negativa), sendo cores mais intensas associadas a maior magnitude de |r|..... 57

Figura 4. Matriz de correlação de Pearson entre os nutrientes na parte aérea do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no ano de 2025, sob inoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e adubação nitrogenada. (a) Período das águas referente ao corte 7 (U) e (b) período da seca referente ao corte 9 (S). Os valores nas células representam o coeficiente de correlação (r), e os asteriscos indicam significância estatística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns = não significativo). A escala de cores indica a direção e intensidade da correlação (azul = positiva; vermelho = negativa), sendo cores mais intensas associadas a maior magnitude de |r|..... 58

Figura 5. Diagramas de Venn mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente abundantes na parte aérea de *Urochloa brizantha* cv. Marandu em 2024 (a, b) e 2025 (c, d). O tratamento com 40 kg N ha^{-1} associado à inoculação com *Azospirillum* brasilense foi comparado aos tratamentos com 40 kg N ha^{-1} (a, c) e 80 kg N ha^{-1} (b, d) 61

Figura 6. Análise das comunidades microbianas de solos cultivados com *Urochloa brizantha* cv. Marandu sob diferentes doses de N e inoculação com *Azospirillum brasilense*. (A) Diversidade alfa, (B) Diversidade beta e (C) 15 famílias procarióticas que mais contribuíram para a diversidade total de acordo com o teste SIMPER..... 64

CAPÍTULO II

Figura 1. Precipitação pluvial mensal e médias históricas, e temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período experimental. Dracena, SP, 2024/2025. Dados obtidos da estação meteorológica da UNESP/Feis – Ilha Solteira 83

Figura 2. Produtividade acumulada de massa seca (MS) do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no primeiro ano agrícola (2023/2024) (A) segundo ano agrícola (2024/2025) (B) — sob doses de nitrogênio mineral e inoculação foliar com *Bacillus* spp. estirpes S26 e N72. Tratamentos: sem inoculação e sem N; sem inoculação + 40 kg N ha^{-1}; sem inoculação + 80 kg N ha^{-1}; S26 sem N; S26 + 40 kg N ha^{-1}; N72 sem N; e N72 + 40 kg N ha^{-1}. Barras representam as médias e linhas verticais indicam o erro padrão da média. Letras maiúsculas comparam as doses de N dentro de cada condição de inoculação, enquanto letras minúsculas comparam as condições de inoculação dentro de cada dose de N, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 91

Figura 3. Análise discriminante canônica (ADC) dos teores foliares de nutrientes do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) em cortes representativos dos períodos de águas e seca, sob doses de nitrogênio mineral e inoculação foliar com *Bacillus* spp. estirpes S26 e N72. (A) 2º corte — período das águas; (B) 4º corte — período de seca; (C) 7º corte — período das águas; e (D) 9º corte — período de seca. Tratamentos: T1 = sem inoculação e sem N; T2 = sem inoculação + 40 kg N ha^{-1}; T3 = sem inoculação + 80 kg N ha^{-1}; T4 = S26 sem N; T5 = S26 + 40 kg N ha^{-1}; T6 = N72 sem N; e T7 = N72 + 40 kg N ha^{-1}. Os vetores indicam a contribuição

dos nutrientes foliares para a discriminação dos tratamentos, enquanto a proximidade entre tratamentos e vetores indica maior associação multivariada com os respectivos nutrientes 99

Figura 4. Diagramas de Venn representando proteínas diferencialmente abundantes identificadas na parte aérea do capim-marandu inoculado com *Bacillus* sp. N72 associado a 40 kg N ha^{-1}, em comparação aos tratamentos sem inoculação com 40 e 80 kg N ha^{-1}, nos anos de 2024 e 2025. Os círculos azuis representam proteínas identificadas no tratamento inoculado com *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1}, enquanto os círculos amarelos representam proteínas identificadas nos tratamentos sem inoculação com 40 ou 80 kg N ha^{-1}. A região de interseção indica proteínas compartilhadas entre os tratamentos comparados, e as regiões exclusivas representam proteínas diferencialmente abundantes específicas de cada condição. (a) Comparação entre *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} e 40 kg N ha^{-1} em 2024; (b) comparação entre *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} e 80 kg N ha^{-1} em 2024; (c) comparação entre *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} e 40 kg N ha^{-1} em 2025; e (d) comparação entre *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} e 80 kg N ha^{-1} em 2025. Os números centrais representam proteínas compartilhadas entre os tratamentos, enquanto os números externos correspondem às proteínas exclusivas de cada condição. As setas indicam o número de proteínas com maior abundância relativa em cada tratamento comparado 102

Figura 5. Análise das comunidades microbianas de solos cultivados com *Urochloa brizantha* cv. Marandu sob diferentes doses de N e inoculação com *Bacillus* spp. A- Índice de diversidade de Shannon; B - Beta diversidade; C - Classes mais importantes; D Gêneros mais importantes que contribuíram para a diversidade total de acordo com o teste SIMPER 109

CAPÍTULO III

Figura 1. Precipitação pluvial mensal e médias históricas, e temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período experimental. Dracena, SP, 2024/2025. Dados obtidos da estação meteorológica da UNESP/Feis – Ilha Solteira 124

Figura 2. Produtividade de massa seca (MS) do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no período experimental de dois anos agrícolas (2023/2024 e 2024/2025), sob inoculação em área total com bactérias e doses de N. Os cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8 referem-se ao período das águas, enquanto os cortes 4, 5 e 9 referem-se ao período das secas. Tratamentos:

T1 – controle (sem inoculação e sem N); T2 – 80 kg N ha^{-1}, sem inoculação; T3 – 40 kg N ha^{-1}, sem inoculação; T4 – 40 kg N ha^{-1} + *Azospirillum brasilense* (AZ) + *Bacillus* sp. S26 (S26) + *Bacillus* sp. N72 (N72); T5 – *Azospirillum brasilense (AZ) + Bacillus sp. S26 (S26) + Bacillus sp. N72 (N72)*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos dentro de cada corte ($p \leq 0,05$) pelo teste Tukey 128

Figura 3. Matriz de correlação de Pearson entre os nutrientes na parte aérea do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no período das águas de 2024, sob coinoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), *Bacillus* sp S26 e N72 e adubação nitrogenada. Os valores nas células representam o coeficiente de correlação (r), e os asteriscos indicam significância estatística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns = não significativo). A escala de cores indica a direção e intensidade da correlação (vermelho = positiva; verde = negativa), sendo cores mais intensas associadas a maior magnitude de |r| 133

Figura 4. Biplot da análise discriminante canônica (ADC) aplicada aos teores foliares de nutrientes e à massa seca do capim-marandu no período das águas de 2024. Os eixos Can1 e Can2 representam, respectivamente, 71,4% e 21,8% da variação discriminante, totalizando 93,2% da variabilidade multivariada explicada. Os pontos indicam os tratamentos, enquanto os vetores representam as variáveis nutricionais e produtivas incluídas na análise. A direção e o comprimento dos vetores indicam sua contribuição para a discriminação entre tratamentos, e a proximidade entre pontos e vetores sugere maior associação multivariada com as respectivas variáveis. As linhas tracejadas indicam a origem dos eixos canônicos 134

Figura 5. Matriz de correlação de Pearson entre os nutrientes na parte aérea do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no período das águas de 2025, sob coinoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), *Bacillus* sp S26 e N72 e adubação nitrogenada. Os valores nas células representam o coeficiente de correlação (r), e os asteriscos indicam significância estatística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns = não significativo). A escala de cores indica a direção e intensidade da correlação (vermelho = positiva; verde = negativa), sendo cores mais intensas associadas a maior magnitude de |r| 135

Figura 6. Biplot da análise discriminante canônica (ADC) aplicada à produtividade de massa seca e aos teores foliares de nutrientes do capim-marandu no período das águas de 2025. Os

eixos canônicos Can1 e Can2 explicaram, respectivamente, 88,1% e 7,8% da variação discriminante, totalizando 95,9% da variabilidade multivariada. Os pontos representam os tratamentos, enquanto os vetores indicam as variáveis produtivas e nutricionais utilizadas na análise. A direção e o comprimento dos vetores expressam sua contribuição relativa para a separação dos tratamentos, e a proximidade entre pontos e vetores indica maior associação multivariada entre tratamento e variável. As linhas tracejadas representam a origem dos eixos canônicos 136

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo na instalação do experimento, Dracena - SP..... 42

Tabela 2. Produtividades acumulada de massa seca do capim-marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, no período de Janeiro/2024 a Maio/2025, sob inoculação ou não, com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}..... 51

Tabela 3. Densidade de raiz do capim-marandu cultivado a campo em Dracena – SP, no período de Janeiro/2024 a Maio/2025, sob inoculação ou não, com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}..... 52

Tabela 4. Altura do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena – SP, no período de 2024 e 2025, sob inoculação ou não, com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}..... 53

Tabela 5. Razão de lâmina foliar e colmo (LF/CM) e porcentagem de lâmina foliar (% LF) do capim-marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, no período das águas e seca no ano de 2024 e 2025, sob inoculação ou não, com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}..... 54

Tabela 6. Dados isótopos ^{15}N do capim-marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, período de 2024 sob inoculação ou não, com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}..... 55

Tabela 7. Dados isótopos ^{15}N do capim-marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, período de 2025 sob inoculação ou não, com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}..... 56

Tabela 8. Fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), CO_2 na câmara subestomática (Ci), eficiência do uso da água instantânea (WUEt), eficiência do uso da

água intrínseca (WUEi) e eficiência de carboxilação (CE) do capim-marandu, cultivado a campo, sob inoculação foliar ou não com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (AZ), em associação a adubação nitrogenada, realizado no segundo corte, no período das águas. Dracena, SP..... 60

Tabela 9. Representação esquemática das categorias funcionais diferencialmente representadas na parte aérea de capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) sob condições de 40 kg N ha-1 + *Azospirillum brasilense*, 40 kg N ha-1 e 80 kg N ha-1, durante o segundo (2024) e sétimo (2025) cortes do capim. Diferentes tons de cinza representam os diferentes padrões de resposta. O número de setas refere-se ao nível de representação, que se baseia no número de sequências diferencialmente abundantes..... 65

CAPÍTULO II

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo na instalação do experimento, Dracena – SP...83

Tabela 2. Produtividade acumulada de massa seca do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, nos anos agrícolas 1 e 2, sob ausência de inoculação ou inoculação com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1} 92

Tabela 3. Densidade de raízes do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, avaliada em maio de 2025, sob ausência de inoculação ou inoculação com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1} 93

Tabela 4. Altura do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, nos períodos de 2024 e 2025, sob ausência de inoculação ou inoculação com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1} 94

Tabela 5. Razão lâmina foliar/colmo (LF/CM) e porcentagem de lâmina foliar (% LF) do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, nos períodos das águas e da seca, em 2024 e 2025, sob ausência de inoculação ou inoculação com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1} 95

Tabela 6. Dados isótopos N15 do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, sob inoculação ou não, com *Bacillus* sp. (S26 e N72), em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1} 96

Tabela 7. Dados isótopos N15 do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, sob inoculação ou não, com *Bacillus* sp. (S26 e N72), em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1} 97

Tabela 8. Índice de clorofila (SPAD), fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), concentração interna de CO_2 (Ci), eficiência instantânea do uso da água (WUEt), eficiência intrínseca do uso da água (WUEi) e eficiência de carboxilação (CE) do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, nos períodos das águas de 2024 e 2025, sob ausência de inoculação foliar ou inoculação foliar com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1} 100

Tabela 9. Representação esquemática das categorias funcionais diferencialmente representadas na parte aérea de plantas de capim-marandu (Urochloa brizantha cv. Marandu) sob as condições 40 kg ha^{-1} de N + *Bacillus* sp. N72, 40 kg ha^{-1} de N e 80 kg ha^{-1} de N, durante o segundo (2024) e o sétimo (2025) ciclos de rebrota 103

CAPÍTULO III

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo na instalação do experimento, Dracena – SP 123

Tabela 2. Descrição dos tratamentos e quantidades de fertilizantes aplicados no experimento 124

Tabela 3. Produtividades acumulada de massa seca do capim marandu (kg ha^{-1}) e densidade de raiz (g dm^{-3}), cultivado a campo, em Dracena – SP, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72), em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1} 129

Tabela 4. Altura do capim marandu cultivado a campo, em Dracena – SP, no período de 2024 e 2025, sob inoculação ou não, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) *e Bacillus* sp. (S26 e N72) em associação a adubação nitrogenada. nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1} 130

Tabela 5. Razão de lâmina foliar e colmo (LF/CM) e porcentagem de lâmina foliar (% LF) do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, no período das águas e seca no ano de 2024 e 2025, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72) em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1} 130

Tabela 6. Dados isótopos N15 do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72), no período de 2024, em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1} 131

Tabela 7. Dados isótopos N15 do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72), no período de 2025, em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1} 132

Tabela 8. Índice de clorofila (SPAD), fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), CO_2 na câmara subestomática (Ci), eficiência do uso da água instantânea (WUEt), eficiência do uso da água intrínseca (WUEi) e eficiência de carboxilação (CE) do capim marandu, cultivado a campo, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72), em associação a adubação nitrogenada, realizado no segundo corte, no período das águas. Dracena, SP 137

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 22

2 REVISÃO DE LITERATURA 24

2.1 Qualidade das pastagens no Brasil 24

2.2 *Urochloa brizantha* cv. Marandu 26

2.3 Adubação nitrogenada nas pastagens tropicais 27

2.4 Bactérias promotoras de crescimento 29

2.5 *Azospirillum brasilense* 31

2.6 *Bacillus* sp. 32

2.7 Interação entre Adubação Nitrogenada e Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas 35

REFERÊNCIAS 38

3 Inoculação via foliar de *Azospirillum brasilense* aumentam a recuperação de nitrogênio e a eficiência metabólica sob suprimento moderado de N em *Urochloa brizantha* cv. Marandu 40

Resumo 40

3.1 Introdução 40

3.2 Material e Métodos 42

3.2.1 Caracterização da área experimental 42

3.2.2 Condições climáticas 43

3.2.3 Delineamento experimental e tratamentos 43

3.2.4 Formulação do inoculante BPCP 44

3.2.5 Amostragem das plantas e concentrações de nutrientes 44

3.2.6 Quantificação do N derivado do fertilizante e do solo 45

3.2.7 Capacidade fotossintética 47

3.2.8 Análise proteômica 47

3.2.9 Microbioma do solo 48

3.2.10 Densidade radicular 48

3.2.11 Análise estatística 49

3.3 Resultados 49

3.3.1 Produtividade de massa seca 49

3.3.2 Análise temporal da produtividade acumulada e da densidade de massa seca radicular 50

3.3.3 Altura de plantas 52
3.3.4 Lâmina foliar 53
3.3.5 Eficiência de uso e recuperação do nitrogênio 54
3.3.6 Estado nutricional 56
3.3.7 Capacidade fotossintética 59
3.3.8 Visão geral da análise proteômica 60
3.3.9 Comunidades procarióticas do solo 63
3.4 Discussão 66
3.4.1 Resposta à fertilização nitrogenada 66
3.4.2 Microrganismos 67
3.4.3 Interação entre microrganismos e eficiência de uso do nitrogênio 67
3.4.4 Proteínas do capim-marandu afetadas pela inoculação com Azospirillum brasilense durante o segundo corte 68
3.4.5 Proteínas do capim-marandu afetadas pela inoculação com Azospirillum brasilense durante o sétimo corte (2025) 71
3.5 Conclusão 74
REFERÊNCIAS 75
4 Interação entre adubação nitrogenada e *Bacillus* spp. na eficiência de recuperação de N e desempenho fisiológico de U*rochloa brizantha* cv. marandu 80
Resumo 80
4.1 Introdução 80
4.2 Material e Métodos 82
4.2.1 Caracterização da área experimental 82
4.2.2 Condições climáticas 83
4.2.3 Delineamento experimental e tratamentos 84
4.2.4 Produto aplicado 84
4.2.5 Amostragem de plantas e concentração de nutrientes 85
4.2.6 Quantificação do N fixado e proveniente do fertilizante e do solo 85
4.2.7 Capacidade fotossintética 87
4.2.8 Análise Proteômica 88
4.2.9 Microbioma do solo 88
4.2.10 Densidade de raiz 89
4.2.11 Análise estatística 89
4.3 Resultados 90

4.3.1 Produtividade de massa seca 90
4.3.2 Análise temporal da produtividade e massa seca raiz 91
4.3.3 Altura de plantas 93
4.3.4 Lâmina foliar 94
4.3.5 Eficiência de uso e recuperação do N 95
4.3.6 Estado nutricional 97
4.3.7 Capacidade fotossintética 99
4.3.8 Visão geral da análise proteômica 101
4.3.9 Microbioma do solo 108
4.4 Discussão 109
4.4.1 Resposta à adubação nitrogenada 109
4.4.2 Eficiência de uso do N (EUN) e recuperação do fertilizante (^{15}N) 110
4.4.3 O papel do Bacillus e interação com N 111
4.4.4 *Reprogramação proteômica induzida por Bacillus* sp. N72 *ao longo dos cortes* 112
4.4.5 Integração entre proteômica vegetal e microbioma do solo 114
4.5 Conclusão 116
REFERÊNCIAS 117
5 Sinergismo da coinoculação de *Azospirillum brasilense e Bacillus* sp. via foliar e doses de nitrogênio na produtividade e eficiência de uso do N em *Urochloa brizantha* cv. Marandu 121
Resumo 121
5.1 Introdução 121
5.2 Material e Métodos 123
5.2.1 Caracterização da área experimental 123
5.2.2 Condições climáticas 123
5.2.3 Delineamento experimental e tratamentos 124
5.2.4 Produto aplicado 125
5.2.5 Amostragem de plantas e concentração de nutrientes 125
5.2.6 Quantificação do N fixado e proveniente do fertilizante e do solo 126
5.2.7 Capacidade fotossintética 127
5.2.8 Densidade de raiz 127
5.2.9 Análise estatística 127
5.3 Resultados 127
5.3.1 Produtividade de massa seca e raiz 127

5.3.2 Altura de plantas 129
5.3.3 Lâmina foliar 129
5.3.4 *Eficiência de uso e recuperação do* N 131
5.3.5 Análise multivariada do estado nutricional 132
5.3.6 Capacidade fotossintética 136
5.4 Discussão 137
5.4.1 Efeito da coinoculação com Azospirillum brasilense e Bacillus spp. sobre crescimento, nutrição e fisiologia 137
5.4.2 Interação microrganismos × nitrogênio: eficiência de uso e recuperação do N 138
5.4.3 Dinâmica nutricional no período das águas de 2024 e 2025 139
5.5 Conclusão 140
REFERÊNCIAS 141

1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional exige maior produção de alimentos, mas a expansão de novas áreas de cultivo está próxima ao seu limite e a degradação do solo é preocupante. A baixa disponibilidade e aproveitamento de nutrientes e a redução da matéria orgânica impactam a produção forrageira e favorecem a infestação de plantas invasoras, acelerando o processo de degradação da pastagem e do solo (Parsons; Rowarth; Newton, 2009).

Embora essencial ao desenvolvimento das gramíneas, o nitrogênio apresenta curta permanência no solo e alto custo de aplicação, especialmente em regiões tropicais (Branco; Júnior, 2022). No entanto, o aproveitamento do N-fertilizante é baixo. Estima-se que, aproximadamente, 50% do N aplicado é perdido por volatilização ou lixiviação, contribuindo para impactos ambientais como acidificação do solo e eutrofização da água (Banger *et al*., 2017; Galindo *et al*., 2022; Pedreira *et al*., 2017).

A ureia, principal fertilizante nitrogenado, representa 60% do mercado brasileiro. Possui alta concentração de N e baixo custo, mas apresenta elevadas perdas por volatilização quando aplicada na superfície sem incorporação (Cantarella *et al*., 2018a; Rosolem *et al*., 2017). Para aumentar a eficiência do N-fertilizante, em especial da ureia, a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal pode ser uma estratégia viável. Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) como *Azospirillum brasilense* e o gênero *Bacillus* podem promover o crescimento radicular, aumentando a absorção de nutrientes e produzindo fitohormônios (Heinrichs *et al*., 2020; Joseph; Ranjan Patra; Lawrence, 2012).

A inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB), como *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp., tem se mostrado uma alternativa eficaz para melhorar o desempenho agronômico de gramíneas forrageiras, especialmente em condições tropicais com alta demanda por nitrogênio. Em estudos recentes com *Urochloa brizantha* cv. Marandu, a inoculação com *Azospirillum* e *Bacillus*, isoladas ou em co-inoculação, promoveu aumento de até 29% no total de nitrogênio acumulado na planta, além de incrementos de 11 a 17% na biomassa seca e de 5 a 12% no índice de clorofila foliar, dependendo da dose de N aplicada. Ainda, a co-inoculação permitiu elevar a eficiência de uso do nitrogênio (NUE) em até 23% e a recuperação do N do fertilizante em até 26%, reduzindo a necessidade de adubação nitrogenada de 240 para 175 kg N ha^{-1}, sem prejuízo à produtividade. Esses resultados indicam que o uso de PGPB pode contribuir substancialmente para a sustentabilidade das pastagens

tropicais, otimizando o uso de fertilizantes e melhorando a qualidade da forragem, especialmente em sistemas com restrições econômicas ou ambientais.

Baseado no exposto, a associação de BPCPs e doses N pode otimizar a eficiência de uso e aumentar a recuperação do N-fertilizante aplicado, otimizando o manejo sustentável de N em sistemas de produção de pastagens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade das pastagens no Brasil

O Brasil mantém uma das maiores áreas de pastagens do mundo, distribuídas por todos os biomas e sob distintos contextos edafoclimáticos e produtivos. As estimativas recentes convergem para um quadro de elevada participação de áreas com sinais de degradação. O retrato atual revela um mosaico em que pastos produtivos convivem com extensas superfícies subutilizadas, o que explica a recorrência do tema degradação no debate técnico, ambiental e de políticas públicas (Dias-Filho, 2014).

Do ponto de vista conceitual, degradação de pastagens compreende a perda continuada da capacidade de suporte e de produtividade, detectável por sinais como queda de biomassa, redução de cobertura do solo, mudança da composição florística e aumento de plantas daninhas. Essa degradação pode ser predominantemente agrícola (relacionada a manejo e fertilidade) ou biológica (associada a perda de cobertura e processos erosivos), exigindo estratégias de recuperação distintas (Dias-Filho, 2014).

No plano quantitativo, integrações de grandes bases geoespaciais sugerem que uma fração relevante das pastagens brasileiras apresenta níveis intermediários a severos de degradação. Sínteses nacionais recentes estimam que cerca de 60% das pastagens cultivadas têm algum grau de limitação de vigor, com aproximadamente 28 milhões de hectares reunindo degradação intermediária/severa e, ao mesmo tempo, bom a muito bom potencial agrícola para intensificação via recuperação, integração lavoura-pecuária (ILP) ou conversão planejada, reduzindo a pressão por novas aberturas (Bolfe *et al*., 2024). Esses resultados reforçam oportunidades de intensificação sustentável alavancadas por informação espacial e logística, desde que compatibilizadas com restrições ambientais e prioridades de conservação (Bolfe *et al*., 2024).

As causas recorrentes incluem superlotação animal, adubação e correção insuficientes, ausência de rotação/descanso, baixa diversidade forrageira e falhas de estabelecimento/reforma, frequentemente agravadas por estresses hídricos e solos de baixa CTC. Tais fatores se expressam em quedas de produtividade animal, aumento de emissões por unidade de produto e maior risco de erosão, com impactos econômicos e ambientais relevantes. Estudos aplicados com dados de campo confirmam a capacidade dos indicadores de vigor e estrutura vegetal para

discriminar estágios de degradação, oferecendo métricas úteis para diagnóstico e planejamento (Teles *et al*., 2025).

No enfrentamento da degradação, a literatura converge para um gradiente de intervenção: (i) recuperação (ajustes de manejo, adubação/correção, ressemeadura dirigida e controle de invasoras), quando a base forrageira e o solo permitem reverter perdas sem pausa longa; e (ii) renovação do estande quando há colapso da comunidade forrageira ou limitações edáficas severas. Práticas como pastejo rotativo com metas de altura, uso de leguminosas, adubação nitrogenada e de reposição de K, Ca, Mg e S estão entre as evidências mais sólidas de recuperação de vigor e elevação de lotação e ganho por área (Dias-Filho, 2014).

A diversidade biológica do solo é decisiva para a qualidade das pastagens porque sustenta processos como ciclagem de nutrientes, estruturação do solo, supressão de patógenos e resiliência frente a estresses. Entre os componentes mais relevantes estão as bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB), como *Azospirillum* e *Bacillus*, que atuam por fixação biológica associativa de N, produção de fitormônios (ex.: ácido indolacético (AIA)), solubilização de P, sideróforos, ACC-desaminase e indução de resistência — mecanismos amplamente documentados em gramíneas tropicais (FAO, 2020; Pelagio-Flores *et al*., *2025*). Em pastagens, há evidências de ganhos de produtividade e maior eficiência no uso de N com *A. brasilense* — isolado ou co-inoculado com *Bacillus* — inclusive em *Urochloa brizantha* e *Urochloa humidicola*, com respostas superiores quando combinadas a adubação nitrogenada moderada (Bezerra *et al*., 2025; Castro *et al*., 2025; Terra *et al*., 2024). Além do efeito direto na planta, sistemas integrados (ILP/ILPF) e boas práticas de manejo tendem a elevar biomassa e atividade microbianas, melhorar a estabilidade de agregados e o C orgânico do solo, criando condições para maior diversidade e funcionalidade bacteriana; tais indicadores biológicos respondem sensivelmente à degradação e à restauração, sendo úteis no diagnóstico e monitoramento de recuperação de pastos (Souza *et al*., 2020).

Em síntese, a qualidade das pastagens no Brasil é o elo crítico entre produtividade pecuária, competitividade agropecuária e compromissos ambientais. O monitoramento sistemático por vigor, aliado a diagnósticos de solo/planta e indicadores de degradação, permite priorizar áreas, calibrar custos e sequenciar intervenções da recuperação à intensificação. A combinação de boas práticas de manejo, adubação e correção orientadas por análise, diversificação forrageira e integração produtiva configura a via tecnicamente robusta para reverter passivos, aumentar lotação e ganho por área e reduzir emissões por produto, com

evidências já consolidadas em múltiplas regiões do país (Dias-Filho, 2025; Bolfe *et al.*, 2024; Reis *et al.*, 2024).

2.2 *Urochloa brizantha* cv. Marandu

A Urochloa brizantha cv. Marandu consolidou-se como uma das forrageiras tropicais mais importantes do Brasil em virtude de sua elevada adaptabilidade, capacidade produtiva e ampla eficiência sob sistemas de produção diversos. O conjunto de estudos recentes evidencia que o desempenho dessa gramínea resulta da interação entre nutrição mineral adequada, manejo de pastagens consistente, uso de ferramentas biotecnológicas como inoculantes microbianos e práticas que visam melhorar a qualidade da forragem produzida.

No que diz respeito à nutrição e adubação, os trabalhos demonstram respostas expressivas da Marandu ao fornecimento equilibrado de macronutrientes, especialmente nitrogênio, potássio e enxofre. A ausência de enxofre pode reduzir a produção de biomassa em mais de 60%, impactando diretamente a formação estrutural da planta e a capacidade de rebrota (Cabral *et al*., 2025). De modo geral, a adubação nitrogenada é o principal fator para incremento de massa seca, perfilhamento e teor proteico, apresentando respostas claras ao aumento das doses aplicadas (Vilela *et al*., 2012; Ribeiro *et al*., 2011). A adubação potássica também desempenha papel fundamental no metabolismo energético e na regulação osmótica, proporcionando maior estabilidade e acúmulo de biomassa (Martuscello *et al*., 2016). Da mesma forma, características químicas e produtivas variam conforme o tipo de solo e o aporte de nutrientes, reforçando a importância de um manejo nutricional ajustado a condições edafoclimáticas específicas (Guerra *et al*., 2019).

Paralelamente, o uso de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) tem se mostrado uma ferramenta eficaz na otimização da eficiência nutricional da Marandu. Estudos com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* demonstram incrementos significativos no desenvolvimento radicular, na absorção de nutrientes e na produtividade total da planta (Hanisch; Balbinot Junior; Vogt, 2017; Guimarães *et al*., 2020). Além disso, a inoculação tem potencial para melhorar a eficiência de uso do nitrogênio, resultando em maior acúmulo desse nutriente na parte aérea e, em alguns casos, permitindo reduzir parcialmente a adubação nitrogenada sem prejuízos produtivos (Pinc *et al*., 2020; Alves *et al*., 2022). Pesquisas isotópicas também sugerem contribuições significativas de fixação biológica de nitrogênio em

gramíneas tropicais, incluindo a Marandu, quando associadas a comunidades microbianas diazotróficas (Morais *et al*., 2015).

No âmbito do manejo de pastagens, a literatura é consistente ao apontar a importância de estratégias fundamentadas na ecofisiologia do dossel. A manutenção de alturas adequadas de manejo, bem como a adoção de estratégias de pastejo rotacionado, promove maior eficiência de colheita e estabilidade produtiva (Euclides *et al*., 2009; Santos *et al*., 2018). Sob essas condições, o Marandu apresenta boa capacidade de ajuste estrutural, além de elevada resiliência à sazonalidade climática, desde que a taxa de lotação e o período de descanso sejam ajustados ao regime de crescimento (Barbosa *et al*., 2007; Euclides *et al*., 2016). Em sistemas integrados, como ILPF, o Marandu demonstra desempenho satisfatório mesmo sob sombreamento moderado, beneficiando-se de condições microclimáticas favoráveis e maior ciclagem de nutrientes (Balbino *et al*., 2012).

A qualidade da forragem é outro fator central na avaliação desse cultivar. Os teores de proteína bruta, fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) e lignina variam de acordo com a adubação, a idade de rebrota e o ambiente de produção, refletindo mudanças estruturais no dossel (Gerdes *et al*., 2002; Fernandes *et al*., 2019). A adubação nitrogenada melhora a qualidade, elevando o teor proteico e reduzindo a proporção de fibras indigestíveis (Ribeiro *et al*., 2011). A adoção de consórcios com leguminosas e manejos orgânicos também tem mostrado potencial para elevar a qualidade química e a digestibilidade da forragem (Silva *et al*., 2021). Por outro lado, intervalos prolongados de corte ou pastejo resultam em maior acúmulo de FDN, FDA e lignina, o que compromete a digestibilidade e a eficiência de utilização pelo animal (Sanches *et al*., 2010).

A *Urochloa brizantha* cv. Marandu se destaca como uma forrageira versátil, responsiva e altamente adaptada aos sistemas de produção tropicais. O desempenho máximo do cultivar depende da integração entre adubação equilibrada, uso de inoculantes microbianos, manejo fisiologicamente orientado e práticas que valorizem a qualidade da forragem. Os avanços científicos mostram que a Marandu permanece estratégica para a intensificação sustentável de pastagens no Brasil, especialmente em modelos que priorizam eficiência nutricional, estabilidade produtiva e melhoria contínua da qualidade do alimento fornecido aos animais.

2.3 Adubação nitrogenada nas pastagens tropicais

A adubação nitrogenada constitui um dos pilares da intensificação sustentável de pastagens tropicais, sobretudo em sistemas baseados em *Urochloa brizantha* cv. Marandu, que

representam parcela expressiva das áreas de produção pecuária no Brasil. O nitrogênio (N) é o nutriente que mais limita o crescimento foliar, o perfilhamento e a rebrota de gramíneas tropicais, devido à elevada taxa de ciclagem e às perdas significativas por volatilização, lixiviação e desnitrificação em ambientes quentes e úmidos. Nessas condições, o manejo adequado do N é determinante para elevar a produtividade, a eficiência de uso e a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Estudos recentes demonstram que o Marandu apresenta forte resposta à aplicação de N, com incrementos lineares ou quadráticos no acúmulo de forragem e na relação folha:colmo à medida que se elevam as doses (Costa *et al*., 2022; Aquino *et al*., 2023). As faixas de maior eficiência agronômica situam-se, em geral, entre 150 e 200 kg N ha^{-1} ano^{-1}, enquanto valores superiores a 250–300 kg N ha^{-1} tendem a elevar as perdas e reduzir a eficiência de uso do nitrogênio (NUE), sem ganhos proporcionais de biomassa (Gomes *et al*., 2023). Esses achados reforçam a importância de sincronizar a oferta de N com a demanda fisiológica da planta, sobretudo em fases de elevada atividade meristemática e maior emissão de perfilhos.

A eficiência do N aplicado depende fortemente das condições edafoclimáticas. Em solos de textura média ou arenosos, com menor capacidade de retenção, observa-se maior risco de lixiviação de nitrato, enquanto áreas de Cerrado e ambientes tropicais úmidos favorecem volatilização de amônia quando se utiliza ureia sem inibidores (Abdala *et al*., 2021). Nesse contexto, tecnologias como NBPT e DMPP têm sido estudadas para reduzir perdas por volatilização e emissões de N_2O, com resultados promissores tanto em produtividade quanto em mitigação de impactos ambientais (Bakker *et al*., 2023; Cardoso *et al*., 2023). Tais estratégias alinham-se às crescentes demandas por sistemas pecuários de baixa emissão, especialmente no Brasil.

A adubação nitrogenada também influencia a dinâmica radicular e o estoque de carbono no solo. Pesquisas de longo prazo demonstram que doses adequadas de N promovem maior crescimento de raízes finas, aumentam a deposição de resíduos e contribuem para a melhoria dos atributos químicos, como a relação C/N e o teor de matéria orgânica (Santos *et al*., 2021). Esses efeitos são relevantes para a resiliência das pastagens frente a estresses hídricos e para a recuperação de áreas degradadas.

Do ponto de vista fisiológico, o Marandu apresenta elevada plasticidade para ajustar a fotossíntese e a taxa de emissão de folhas conforme a disponibilidade de N. Estudos de ecofisiologia indicam que o nutriente atua diretamente na síntese de clorofila, na atividade da Rubisco e na expansão celular, influenciando o índice de área foliar e a arquitetura do dossel

(Lara; Pedreira, 2021). Assim, o manejo do N não apenas determina a produtividade, mas também modifica a estrutura do pasto e a interceptação luminosa, com reflexos no desempenho animal.

Nos últimos anos, tem crescido o interesse pela integração entre adubação nitrogenada e inoculantes microbianos, incluindo *Azospirillum*, *Bacillus* e *Herbaspirillum*, visando aumentar a eficiência de uso do N e reduzir dependência de fertilizantes sintéticos. Pesquisas apontam incrementos moderados, mas consistentes em produtividade e teor de N na planta quando o N é associado a PGPR (Hungria; Mendes, 2022), embora a magnitude das respostas dependa de condições ambientais e do manejo do pasto. Esse avanço é particularmente relevante para sistemas de integração lavoura-pecuária e para propriedades que buscam reduzir custos ou adotar práticas de baixo carbono.

Outro enfoque contemporâneo da literatura diz respeito ao manejo do N em sistemas integrados (ILPF), nos quais a reciclagem de nutrientes, a presença de árvores e a maior cobertura do solo alteram a mineralização e a necessidade de adubação. Resultados recentes mostram que o N pode ser utilizado de forma mais eficiente nesses ambientes, com menores perdas e maior retorno em desempenho animal (Moraes *et al*., 2022; Euclides *et al*., 2020).

A adubação nitrogenada em pastagens tropicais, especialmente em *Urochloa brizantha* cv. Marandu, deve ser compreendida como prática estratégica para intensificação sustentável, exigindo doses adequadas, fracionamento racional, uso de tecnologias mitigadoras e integração com bioinsumos e manejo apropriado do pastejo. O avanço da pesquisa evidencia que o N pode simultaneamente aumentar a produtividade, melhorar a qualidade da forragem e contribuir para ganhos ambientais, desde que manejado com critérios agronômicos e com base em evidências científicas.

2.4 Bactérias promotoras de crescimento

A utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) em pastagens tropicais tem se destacado como estratégia sustentável para intensificação da pecuária, melhoria da eficiência de uso de nutrientes e aumento da resiliência das gramíneas forrageiras. Em especial, gêneros como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas e PaeniBacillus* têm sido amplamente estudados devido à sua interação funcional com raízes de *Urochloa* spp., promovendo respostas fisiológicas importantes para o crescimento, nutrição mineral e tolerância a estresses (Hungria *et al*., 2022; Martuscello *et al*., 2023).

Entre as PGPR aplicadas em pastagens, *Azospirillum brasilense* é uma das mais investigadas, apresentando elevada capacidade de colonização rizosférica e endofítica, além de contribuir para a fixação biológica de nitrogênio (FBN) associativa (Cassán *et al*., 2021; Baldani; Baldani, 2022). Embora a contribuição direta de N fixado varie amplamente (3–40 kg N ha^{-1} ano^{-1}), o principal impacto fisiológico decorre da melhoria da eficiência de uso do nitrogênio (NUE). Essa eficiência aumentada está relacionada à maior atividade da redutase do nitrato, ao incremento da assimilação de nitrogênio via os ciclos GS/GOGAT e à melhor redistribuição deste nutriente nos tecidos jovens (Fukami; Cerezini; Hungria, 2020).

Outra contribuição importante de PGPR como *Azospirillum* e *Bacillus* é a produção de fitormônios, em especial o ácido indolacético (AIA). Esse fitormônio regula diretamente a arquitetura radicular, induzindo maior emissão de raízes laterais e pelos radiculares, aumentando a exploração do solo (Souza; Ambrosini; Passaglia, 2021). Como resultado, há intensificação da absorção de água e nutrientes essenciais, incluindo N, P, Mg e micronutrientes, além de aumento na área foliar e no teor de clorofila (Fukami; Cerezini; Hungria, 2020). Ensaios com pastagens indicam incrementos de até 40% no comprimento radicular e maior vigor vegetativo após a inoculação (Cassán *et al*., 2021).

Quanto aos mecanismos de disponibilização de nutrientes, espécies de *Bacillus* e Pseudomonas são reconhecidas por sua atuação na solubilização de fósforo (P), transformando formas pouco solúveis em fosfatos assimiláveis pelas plantas. Esse processo ocorre pela liberação de ácidos orgânicos, como cítrico, málico e glicólico, que reduzem o pH da rizosfera e mobilizam o P do solo (Hashem; Tabassum; Abd-Allah, 2020). De modo complementar, PGPR produtoras de sideróforos aumentam a disponibilidade de Fe^{3+}, elemento essencial para a síntese de clorofila e o funcionamento dos citocromos no transporte de elétrons — processos fundamentais para o metabolismo fotossintético (Martuscello *et al*., 2023).

No contexto da tolerância a estresses abióticos, espécies de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. velezensis* destacam-se pela indução de respostas fisiológicas associadas à proteção da planta. Elas aumentam a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), reduzem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e promovem estabilização da integridade das membranas celulares (Souza; Ambrosini; Passaglia, 2021; Hashem; Tabassum; Abd-Allah, 2020). Consequentemente, plantas inoculadas apresentam maior retenção hídrica, condutância estomática controlada e maior resiliência em condições de seca — características relevantes para sistemas de produção em solos arenosos e de textura média.

Além dos benefícios fisiológicos diretos, PGPR como *Bacillus* desempenham importante papel no controle biológico, produzindo lipopeptídeos como surfactina, iturina e fengicina, capazes de inibir fitopatógenos e reduzir a pressão de doenças no sistema radicular (Souza; Ambrosini; Passaglia, 2021). A integração entre esses efeitos diretos (modulação hormonal e nutricional) e indiretos (controle de patógenos) contribui para maior estabilidade da pastagem ao longo dos ciclos de pastejo.

Evidências recentes em *Urochloa brizantha* cv. Marandu apontam ganhos agronômicos consistentes com o uso de PGPR. Estudos entre 2022 e 2024 demonstram incrementos de 10–25% na produção de matéria seca, aumento dos teores de proteína bruta, redução da fibra em detergente neutro (FDN) e melhoria significativa da eficiência no uso do N (Silva *et al*., 2024). Ensaios com *Herbaspirillum seropedicae* indicam ainda aumento da recuperação de ^{15}N, reforçando a contribuição dessas bactérias para a eficiência da adubação nitrogenada (Santos *et al*., 2024). Tais resultados confirmam o potencial das PGPR como ferramenta estratégica para a redução dos custos com fertilizantes, mitigação de impactos ambientais e fortalecimento da sustentabilidade da pecuária tropical.

Dessa forma, as bactérias promotoras de crescimento representam importante interface entre microbiologia, fisiologia vegetal e manejo sustentável de pastagens. Seus efeitos fisiológicos — desde a modulação hormonal até a ativação de rotas metabólicas ligadas à nutrição e ao estresse — contribuem para sistemas mais resilientes e produtivos, reduzindo a dependência de insumos sintéticos e aumentando a competitividade da pecuária nos trópicos. Com o avanço das pesquisas em mecanismos moleculares e formulações mais eficientes de inoculantes, o uso de PGPR em *Urochloa* spp. tende a ganhar ainda mais relevância nos próximos anos.

2.5 *Azospirillum brasilense*

A inoculação com *Azospirillum brasilense* tem adquirido destaque crescente como alternativa biotecnológica para aumentar a eficiência produtiva de pastagens tropicais, sobretudo de gramíneas do gênero *Urochloa*, devido à sua capacidade de promover o crescimento vegetal e otimizar o uso do nitrogênio. Estudos recentes demonstram que a inoculação favorece o desenvolvimento radicular, a produção de biomassa e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, resultados atribuídos tanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN)

de forma associativa quanto à produção microbiana de fitohormônios que modulam intensamente a fisiologia das plantas (Freitas *et al*., 2023; Liberato *et al*., 2024).

A síntese de fitohormônios, especialmente ácido indolacético (AIA), citocininas e giberelinas é um dos mecanismos centrais associados à ação de *A. brasilense* em gramíneas tropicais. O AIA estimula a formação de raízes laterais, o alongamento radicular e a expansão da zona de absorção, ampliando a capacidade da planta em explorar o solo e absorver nutrientes essenciais. As citocininas produzidas pela bactéria contribuem para maior taxa de perfilhamento e manutenção da atividade meristemática, enquanto as giberelinas favorecem crescimento vegetativo e velocidade de rebrota após pastejo, fatores essenciais para estabilidade produtiva em sistemas intensivos (Santos *et al*., 2021; Moreira *et al*., 2020).

Do ponto de vista ecofisiológico, a inoculação exerce efeitos positivos na tolerância das plantas a estresses abióticos, especialmente déficit hídrico e altas temperaturas. Esses efeitos decorrem da ativação de enzimas antioxidantes, da manutenção da integridade das membranas celulares e do aumento da concentração de solutos compatíveis, mecanismos frequentemente associados à maior resiliência em pastagens submetidas a variações climáticas típicas de ambientes tropicais (Oliveira *et al*., 2021; Liberato *et al*., 2024). Em condições de campo, isso se traduz em maior vigor, rebrota mais rápida após o pastejo e estabilidade de produção ao longo do ano.

Outra contribuição relevante diz respeito ao manejo nutricional. A inoculação com *A. brasilense* tem demonstrado potencial para reduzir substancialmente a necessidade de adubação nitrogenada mineral, permitindo economias de 20 a 40% sem comprometer a produtividade ou a qualidade da forragem, especialmente quando associada a doses moderadas de N (Freitas *et al*., 2023; Castro *et al*., 2025). Essa redução resulta de maior eficiência de uso do nitrogênio, obtida pela combinação da FBN associativa, do maior crescimento radicular e da regulação hormonal microbiana, além da melhoria da atividade metabólica do dossel, frequentemente evidenciada por aumentos na concentração de clorofila e funções fotossintéticas.

2.6 *Bacillus* sp.

A utilização de *Bacillus* sp. como bactéria promotora de crescimento tem se consolidado como estratégia central na modernização dos sistemas de produção a pasto, sobretudo nas

gramíneas tropicais do gênero *Urochloa*, que dominam os sistemas pecuários brasileiros. O interesse crescente se deve à capacidade fisiológica multifacetada desse gênero, que atua simultaneamente na promoção do crescimento vegetal, no aumento da eficiência de uso do nitrogênio e na resiliência da planta frente a estresses abióticos e bióticos. Em sistemas onde a resposta ao nitrogênio é fortemente condicionada pela dinâmica do solo, um microrganismo capaz de modular a rizosfera, estimular a aquisição de nutrientes e potencializar o retorno do fertilizante nitrogenado torna-se peça-chave no manejo sustentável.

No nível fisiológico, *Bacillus* sp. se destaca pela produção de fitohormônios, especialmente ácido indolacético (AIA), giberelinas e citocininas, que desempenham papel determinante na indução de ramificações radiculares, no alongamento celular e no maior perfilhamento das gramíneas. Segundo Batista *et al*. (2024), essa produção hormonal altera a arquitetura do sistema radicular, ampliando a superfície de absorção e favorecendo a exploração de camadas mais profundas do solo, o que resulta em maior captação de nutrientes, particularmente N e P. Esse comportamento hormonal é coerente com os achados de Debastiani *et al*. (2023), que observaram que a estirpe *Bacillus* sp. S26 sintetiza elevadas quantidades de compostos indólicos, simultaneamente à produção de sideróforos, mecanismos essenciais para a disponibilidade de Fe e a manutenção do metabolismo vegetal em condições de estresse.

A capacidade de solubilização de fosfatos é outro atributo fisiológico crítico para o desempenho de *Bacillus* em pastagens. Estirpes como *B. subtilis* são conhecidas por converter formas insolúveis de P em espécies assimiláveis, além de mineralizar compostos orgânicos via fosfatases. Em solos de pastagens tropicais, frequentemente caracterizados por alta fixação de P e baixa disponibilidade, essa atividade tem valor estratégico, pois complementa a adubação fosfatada e potencializa o uso do N, uma vez que a deficiência de P limita fortemente a absorção e a assimilação nitrogenada. Assim, a ação simultânea no ciclo do N e do P gera uma sinergia fisiológica que se traduz em maior eficiência fotossintética e incremento de produtividade forrageira.

Do ponto de vista da produtividade em *Urochloa brizantha* cv. Marandu, os trabalhos de Sampaio (2020) representam um marco na compreensão da interação entre *Bacillus* sp. e N. Em solo de pastagem degradada, a inoculação com *B. subtilis* promoveu aumentos no número de perfilhos, número de folhas, diâmetro do colmo, acúmulo de N, P e K e massa seca da parte aérea, mesmo na ausência de adubação nitrogenada. Esses efeitos foram reforçados quando o inoculante foi combinado com *Azospirillum* brasilense, resultando em maior massa seca total e maior acúmulo de P, evidenciando uma complementaridade metabólica entre os gêneros. O

estudo também apontou que *B. subtilis* tende a expressar melhor seu potencial em doses moderadas a altas de nitrogênio, sugerindo que a bactéria atua amplificando o desempenho fisiológico da planta quando não há limitação severa desse nutriente.

No primeiro ciclo produtivo, Sampaio *et al*. (2021) confirmaram que a associação entre fertilizante nitrogenado e *Bacillus* sp. aumenta a altura das plantas e o acúmulo de K na forragem, reforçando a hipótese de que *Bacillus* contribui para uma maior absorção e translocação de nutrientes. Esses resultados corroboram observações de Manrique *et al*. (2019), que demonstraram que o revestimento de sementes de U. brizantha com *B. subtilis* aumenta germinação, vigor e massa inicial de plantas, indicando que o efeito do gênero pode iniciar ainda na fase de estabelecimento da pastagem, garantindo um estande mais vigoroso e competitivo.

A integração entre *Bacillus* sp. e o manejo nitrogenado tem recebido maior embasamento com o avanço de estudos com isótopos estáveis, especialmente no âmbito de Galindo *et al*. (2024). Em experimentos com milho sob coinoculação de *A. brasilense* e *Bacillus* sp., os autores observaram aumento da recuperação do nitrogênio do fertilizante (NREC), maior acúmulo de N total na planta e maior eficiência de uso do N aplicado. A ampliação do sistema radicular, induzida pelos fitohormônios e pelo melhor ambiente rizosférico proporcionado por *Bacillus*, foi determinante para explicar o aumento da absorção e o melhor aproveitamento do nitrogênio mineral. Esses resultados, embora obtidos em milho, têm forte paralelismo com gramíneas forrageiras perenes, como Marandu, cujo sistema radicular profundo e perenizado tende a responder de maneira ainda mais expressiva ao estímulo rizosférico bacteriano.

Quando se analisa o papel de *Bacillus* sp. sob o ponto de vista agronômico, percebe-se que sua aplicação permite aumentar o retorno por unidade de nitrogênio aplicado, melhorar a eficiência de uso do N e, potencialmente, reduzir as doses necessárias para atingir níveis elevados de produção. Em sistemas tropicais, onde a adubação nitrogenada representa o principal custo de intensificação, a utilização de *Bacillus* emerge como alternativa para alinhar produtividade, sustentabilidade e viabilidade econômica, especialmente considerando o cenário de perdas elevadas por volatilização e lixiviação em solos de textura média e arenosa.

Além disso, ao melhorar a tolerância a estresses abióticos como deficiência hídrica, toxicidade por metais (Debastiani *et al*., 2023) e limitações químicas do solo, *Bacillus* contribui para a estabilidade da produção em sistemas de sequeiro, característica essencial para pastagens tropicais expostas a períodos de déficit hídrico. A combinação entre maior desenvolvimento

radicular, maior capacidade de absorção e sinais hormonais mais eficientes coloca o gênero como elemento-chave no avanço dos bioinsumos aplicados à pecuária.

A literatura recente demonstra que *Bacillus* sp. não atua apenas como inoculante, mas como modulador fisiológico complexo, influenciando diretamente o metabolismo nitrogenado, o crescimento radicular e a eficiência nutricional da planta. Quando integrado à adubação nitrogenada, o gênero potencializa a resposta do Marandu ao N, melhora o aproveitamento dos fertilizantes e reforça estratégias de manejo que buscam simultaneamente produtividade, sustentabilidade e redução de impactos ambientais. Trata-se, portanto, de uma ferramenta promissora para sistemas de produção intensivos e sustentáveis, alinhada às exigências atuais de incremento de eficiência e redução da dependência exclusiva de fertilizantes químicos.

2.7 Interação entre Adubação Nitrogenada e Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas

A adubação nitrogenada permanece como um dos principais fatores de incremento de produtividade em culturas agrícolas e pastagens tropicais, porém seu uso intensivo eleva custos e impactos ambientais associados a emissões de CO_2, perdas por volatilização e lixiviação. Nos últimos anos, a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR), especialmente *Azospirillum* brasilense e espécies de *Bacillus*, tem sido estudada como estratégia complementar ou parcialmente substitutiva ao fertilizante nitrogenado, visando melhorar a eficiência de uso do nitrogênio (NUE) e a sustentabilidade dos sistemas produtivos (Di Benedetto *et al*., 2017; Khoso *et al*., 2024).

Do ponto de vista fisiológico, *Azospirillum* atua principalmente via fixação biológica de nitrogênio em níveis moderados, produção de fitormônios – sobretudo auxinas – e estímulo ao desenvolvimento radicular, o que amplia a capacidade de absorção de água e nutrientes. Estudos recentes reforçam que a inoculação aumenta a expressão de genes associados ao transporte de nitrato e amônio e melhora a eficiência de assimilação do N mineral aplicado (Kaymak, 2023; Zeffa *et al*., 2019). Assim, a interação entre PGPR e adubação nitrogenada não é aditiva, mas sim sinérgica: doses intermediárias de N tendem a potencializar os efeitos da inoculação, enquanto níveis muito baixos ou muito altos reduzem a resposta (Barbosa *et al*., 2022).

Em culturas anuais, diversos trabalhos mostram que a inoculação com *A. brasilense* permite manter a produtividade mesmo com redução parcial da adubação nitrogenada. Em milho, Galindo *et al*. (2016) observaram maior produtividade e melhoria na diagnose foliar com

a combinação de inoculação e adubação mineral. Resultados semelhantes foram reportados por Caires *et al*. (2021), demonstrando que a inoculação via semente possibilita menor dependência de N sintético em sistemas sob plantio direto. Meta-análise conduzida por Barbosa *et al*. (2022) reforça que a resposta média do milho ao *Azospirillum* é positiva em diferentes regiões do Brasil, com ganhos em biomassa, produtividade e eficiência de uso do N. Em arroz irrigado, Mattos *et al*. (2022) verificaram que a inoculação pode equivaler ao aporte de aproximadamente 30 kg ha^{-1} de N, enquanto Zeffa *et al*. (2019) demonstraram aumento da NUE e desempenho superior entre distintos genótipos.

A interação também tem sido estudada em sistemas mais complexos, como pastagens de Urochloa spp., altamente responsivas à adubação nitrogenada. Hungria *et al*. (2021) demonstraram que a inoculação de sementes e aplicação foliar de PGPR em braquiárias resultou em maior produção de forragem, melhoria do estado nutricional e potencial para reduzir a necessidade de N mineral. Estudos conduzidos por Duarte *et al*. (2020) evidenciaram que a inoculação com *Azospirillum* e *Bacillus* altera características morfogênicas e estruturais de Urochloa, aumentando taxa de alongamento foliar, número de perfilhos e biomassa aérea. Na cultivar Marandu, Heinrichs *et al*. (2020) verificaram incremento significativo na produção de matéria seca e no teor de nutrientes quando associada a doses moderadas de N, reforçando a natureza sinérgica entre os bioinsumos e a adubação.

Pesquisas mais recentes têm destacado o potencial da co-inoculação entre *Azospirillum* e *Bacillus*. Terra *et al*. (2024) relataram que a combinação das duas bactérias aumenta a biomassa, a eficiência fotossintética e parâmetros fisiológicos de Urochloa brizantha, com maior expressão dos efeitos quando há fornecimento adequado de N. Costa *et al*. (2022) observaram respostas semelhantes em sistemas com *Bacillus* subtilis e agentes biológicos adicionais, indicando que o consórcio de PGPR pode modular processos fisiológicos, melhorar a absorção de nutrientes e aumentar a resistência a estresses. Estudos recentes em azevém e Tifton 85 reforçam que a co-inoculação pode permitir reduções graduais da adubação nitrogenada sem perdas de produtividade, especialmente em solos de média fertilidade.

De modo geral, a integração entre adubação nitrogenada e PGPR tem potencial para transformar o manejo nutricional, reduzindo custos e impactos ambientais e aumentando a resiliência das plantas. A literatura indica que *Azospirillum* e *Bacillus* atuam como moduladores da eficiência de uso do N, alterando arquitetura radicular, fisiologia foliar, assimilação de nitrogênio e crescimento. Na prática, o uso combinado de doses otimizadas de N e inoculantes

biológicos representa uma estratégia promissora para culturas anuais e pastagens tropicais, alinhando produtividade com sustentabilidade.

REFERÊNCIAS

ANAS, Muhammad *et al.* Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. **Biological Research**, v. 53, n. 1, p. 47, 16 out. 2020.

BACKER, Rachel *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 23 out. 2018.

BANGER, Kamaljit *et al.* A Vision for Incorporating Environmental Effects into Nitrogen Management Decision Support Tools for U.S. Maize Production. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 28 jul. 2017.

BEZERRA, Gianna Maria Oscar *et al.* Productive Performance of Brachiaria brizantha cv. Paiaguás in Response to Different Inoculation Techniques of *Azospirillum* brasilense Associated with Nitrogen Fertilization in the Brazilian Amazon. **Nitrogen**, v. 6, n. 2, p. 47, jun. 2025.

BOLFE, Édson Luis *et al.* Potential for Agricultural Expansion in Degraded Pasture Lands in Brazil Based on Geospatial Databases. **Land**, v. 13, n. 2, p. 200, fev. 2024.

BRANCO, Jaisson dos Santos; JÚNIOR, Paulo Prates. Fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável de forragem. **Revista Edutec**, v. 3, n. 1, 23 jun. 2022.

CANTARELLA, Heitor *et al.* Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. **Journal of Advanced Research**, Biotechnological and medical relevance of ureases. v. 13, p. 19–27, 1 set. 2018.

CASTRO, José Wilker Leal *et al. Azospirillum* brasilense associated with nitrogen fertilization in Urochloa humidicola pastures cultivated in the Amazonian savanna. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, v. 26, 13 ago. 2025.

DIAS-FILHO, Moacyr Bernardino. Diagnóstico das Pastagens no Brasil. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**, p. 38, maio 2014.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Enhancing agronomic efficiency and maize grain yield with *Azospirillum brasilense* inoculation under Brazilian savannah conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 134, p. 126471, 1 mar. 2022.

GUIMARÃES, Gabriel Silva *et al.* Pointing Out Opportunities to Increase Grassland Pastures Productivity via Microbial Inoculants: Attending the Society's Demands for Meat Production with Sustainability. **Agronomy**, v. 12, n. 8, 24 jul. 2022.

HEINRICHS, Reges *et al. Azospirillum* inoculation of "Marandu" palisade grass seeds: effects on forage production and nutritional status. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 2, p. 465–478, 6 mar. 2020.

JOSEPH, B.; RANJAN PATRA, R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (Cicer arietinum L.). **International Journal of Plant Production**, v. 1, n. 2, p. 141–152, 24 jul. 2012.

OECD; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031**. *[S.l.]*: OECD, 2022.

OLIVEIRA, Daniele *et al.* Changes in soil carbon and soil carbon sequestration potential under different types of pasture management in Brazil. **Regional Environmental Change**, v. 22, 27 jun. 2022.

PARSONS, A.; ROWARTH, Jacqueline; NEWTON, Paul. Managing pasture for animals and soil carbon. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v. 71, p. 77–84, 1 jan. 2009.

PEDREIRA, B. C. *et al.* Tiller density and tillering on *Brachiaria brizantha cv.* Marandu pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 1039–1046, ago. 2017.

PELAGIO-FLORES, Ramón *et al.* A century of *Azospirillum*: plant growth promotion and agricultural promise. **Plant Signaling & Behavior**, v. 20, n. 1, p. 2551609, *[S.d.]*.

RIBEIRO, Pablo *et al.* Do tropical climatic conditions reduce the effectiveness of nitrification inhibitors? A meta-analysis of studies carried out in Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 15 mar. 2023.

ROSOLEM, Ciro A. *et al.* Chapter Five - Enhanced Plant Rooting and Crop System Management for Improved N Use Efficiency. *In*: SPARKS, Donald L. (Org.). **Advances in Agronomy**. *[S.l.]*: Academic Press, 2017. v. 146 p. 205–239.

SARKIS, Leonardo Fernandes *et al.* Ammonia volatization from conventional and stabilized fertilizers, agronomic aspects and microbiological attributes in a Brazilian coffee crop system. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 8 dez. 2023.

SOUZA, Juscelio Ramos de *et al.* Volatilization of ammonia from conventional sources of nitrogen and compacted urea under controlled conditions. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 15, n. 2, p. 1–6, 2020.

TELES, Nathalia *et al.* Pasture Degradation Estimates Through Field Data in the State of Goiás, Brazil. **Land Degradation & Development**, v. n/a, n. n/a, 2025.

TERRA, Lorena Emanuelle da Mata *et al.* Co-Inoculation of *Azospirillum* brasilense and *Bacillus* sp. Enhances Biomass and Photosynthetic Efficiency in Urochloa brizantha. **Agriculture**, v. 14, n. 12, 19 dez. 2024.

THIENGO, Cassio Carlette *et al.* Nitrogen fertilization regulates crosstalk between marandu palisadegrass and Herbaspirillum seropedicae: An investigation based on 15N isotopic analysis and root morphology. **Environmental Research**, v. 249, p. 118345, 15 maio 2024.

3 INOCULAÇÃO VIA FOLIAR DE *Azospirillum brasilense* AUMENTAM A RECUPERAÇÃO DE NITROGÊNIO E A EFICIÊNCIA METABÓLICA SOB SUPRIMENTO MODERADO DE N EM *Urochloa brizantha* cv. MARANDU

Resumo

O aumento da eficiência de uso do nitrogênio (N) é essencial para a sustentabilidade de pastagens tropicais, tornando necessária a adoção de estratégias que reduzam a dependência da adubação nitrogenada mineral sem comprometer a produtividade. Este estudo avaliou o efeito da inoculação foliar com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), associada à adubação nitrogenada, sobre a produtividade, recuperação do N do fertilizante, desenvolvimento radicular, desempenho fisiológico, metabolismo da parte aérea e comunidades procarióticas da rizosfera de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, cultivada em Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico de textura arenosa. O experimento foi conduzido em campo durante dois anos agrícolas, utilizando cinco tratamentos: controle sem N e sem inoculação, 40 ou 80 kg ha^{-1} N, 40 kg ha^{-1} N combinados com *A. brasilense* e inoculação sem N. Foram avaliadas a produtividade de massa seca, a densidade radicular, a recuperação do N por meio da técnica com ^{15}N, as trocas gasosas, a proteômica da parte aérea e a microbiota da rizosfera. A dose de 80 kg N ha^{-1} proporcionou a maior produtividade acumulada, enquanto a inoculação isolada não promoveu ganhos sustentados. Entretanto, a associação de 40 kg ha^{-1} N com *A. brasilense* aumentou a densidade radicular, favoreceu a recuperação do N do fertilizante durante o período das águas e melhorou a eficiência intrínseca do uso da água e a eficiência de carboxilação. Também promoveu alterações no metabolismo proteico e na estrutura das comunidades procarióticas da rizosfera, sem modificar a diversidade de Shannon. Conclui-se que A. brasilense não substitui a adubação nitrogenada mineral, mas complementa o fornecimento de N, melhorando a eficiência fisiológica e metabólica da forrageira e contribuindo para a sustentabilidade dos sistemas de produção de pastagens.

Palavras-chave: eficiência de uso da água, sistema radicular, pastagens tropicais, proteômica, comunidades procarióticas.

3.1 Introdução

As pastagens tropicais sustentam grande parte da produção pecuária em sistemas de pastejo e, nesse contexto, *Urochloa brizantha* cv. Marandu (capim-marandu) destaca-se por sua adaptação e potencial produtivo. Entretanto, a intensificação das pastagens é frequentemente limitada pela baixa disponibilidade de nitrogênio (N) no solo, o que reduz o perfilhamento, a área foliar e o acúmulo de forragem, especialmente quando há descompasso entre o suprimento de nutrientes e as condições ambientais. Assim, a fertilização nitrogenada continua sendo uma das ferramentas mais eficientes para aumentar a produtividade; contudo, seu uso envolve custos

e pode apresentar baixa eficiência de recuperação pelas plantas, o que motiva a busca por estratégias que aumentem a eficiência de uso do nitrogênio (EUN) (Galindo *et al*., 2021a).

Entre as alternativas complementares à fertilização, destacam-se os inoculantes microbianos contendo bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). Essas bactérias podem modular a fisiologia vegetal por meio de mecanismos como produção/indução de fitormônios, estímulo ao crescimento radicular, melhoria da aquisição de água e nutrientes e aumento da tolerância a estresses (Cassán; Diaz-Zorita, 2016; Vacheron *et al*., 2013). Em pastagens, revisões recentes indicam que os inoculantes podem contribuir para maior produtividade e sustentabilidade, embora os resultados sejam condicionados por fatores como dose de N, clima, solo, manejo e método de aplicação (Guimarães *et al*., 2022). Dentro desse grupo bacteriano, cepas de *Azospirillum brasilense* têm recebido atenção devido ao seu potencial para fixação biológica de nitrogênio e ao amplo uso agrícola. Os efeitos benéficos promovidos pela inoculação dessas cepas bacterianas são frequentemente associados ao aumento da biomassa e ao maior vigor do sistema radicular, o que pode favorecer a captura e a utilização de N quando o nutriente é fornecido em níveis moderados (Galindo *et al*., 2021b; Leite *et al*., 2018).

No capim-marandu, evidências mostram que a inoculação com *A. brasilense* pode alterar o estado nutricional e, em alguns cenários, contribuir para a produção de forragem (Heinrichs *et al*., 2020; Leite *et al*., 2018). Recentemente, estudos com gramíneas forrageiras exploraram a inoculação foliar (e/ou coinoculação) via pulverização, relatando potenciais ganhos em biomassa e em atributos fisiológicos relacionados ao desempenho fotossintético, sugerindo que as respostas microbianas podem ser expressas inicialmente em variáveis funcionais e, posteriormente, refletir-se na produtividade quando o ambiente permite (Freitas *et al*., 2023; Terra *et al*., 2024). Ainda assim, é importante compreender a magnitude desses efeitos e em quais doses de N a inoculação contribui para a EUN, especialmente em condições de campo e sob sazonalidade hídrica.

Para elucidar mecanismos e quantificar processos, o uso de técnicas isotópicas com ^{15}N permite particionar a origem do N absorvido e estimar a recuperação do fertilizante, fortalecendo inferências sobre a eficiência e o destino do nutriente no sistema (Galindo *et al*., 2024). Em pastagens, abordagens que integram ^{15}N com atributos radiculares e respostas fisiológicas têm sido úteis para compreender como a fertilização nitrogenada regula as interações planta–microrganismo e a dinâmica de aquisição de N (Thiengo *et al*., 2024c). Nesse sentido, integrar produtividade, morfologia radicular, variáveis de trocas gasosas e análises de

proteômica diferencial pode esclarecer se a inoculação atua como complemento ao N, por exemplo, ao aumentar a exploração do solo e melhorar o desempenho fotossintético durante janelas ambientais favoráveis. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação (aplicação em área total) com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), associada a doses de N-ureia, sobre produtividade, atributos radiculares, desempenho fisiológico, eficiência de uso/recuperação de N e alterações proteômicas em *U. brizantha* cv. Marandu.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi conduzido em condições de campo, em área de formação com *U. brizantha* cv. Marandu durante os anos agrícolas de 2023/2024 e 2024/2025 (dezembro de 2023 a julho de 2025), no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (UNESP), Câmpus de Dracena (21°27′ S, 51°36′ W; 421 m). O histórico da área apresentava um cultivo anterior de *U. decumbens* cv. Basilisk sem manejo algum. O solo foi classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, de textura arenosa (Santos *et al*., 2025). Os atributos químicos da camada de 0–0,20 m são apresentados na Tabela 1. Após a análise inicial do solo, foi aplicada uniformemente 1 t ha^{-1} de calcário dolomítico para correção da acidez, visando elevar V a 70%. Em meados de novembro de 2023, *U. brizantha* cv. Marandu, reconhecida por sua elevada produção de matéria seca, foi semeada, e foram aplicados 8 kg de N, 60 kg de P_2O_5 e 20 kg de K_2O por hectare para o estabelecimento da forrageira, utilizando-se taxa de semeadura de 10 kg ha^{-1} de sementes puras viáveis (Van Raij, 2011).

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo na instalação do experimento coletado na camada de 0-20 cm, Dracena - SP

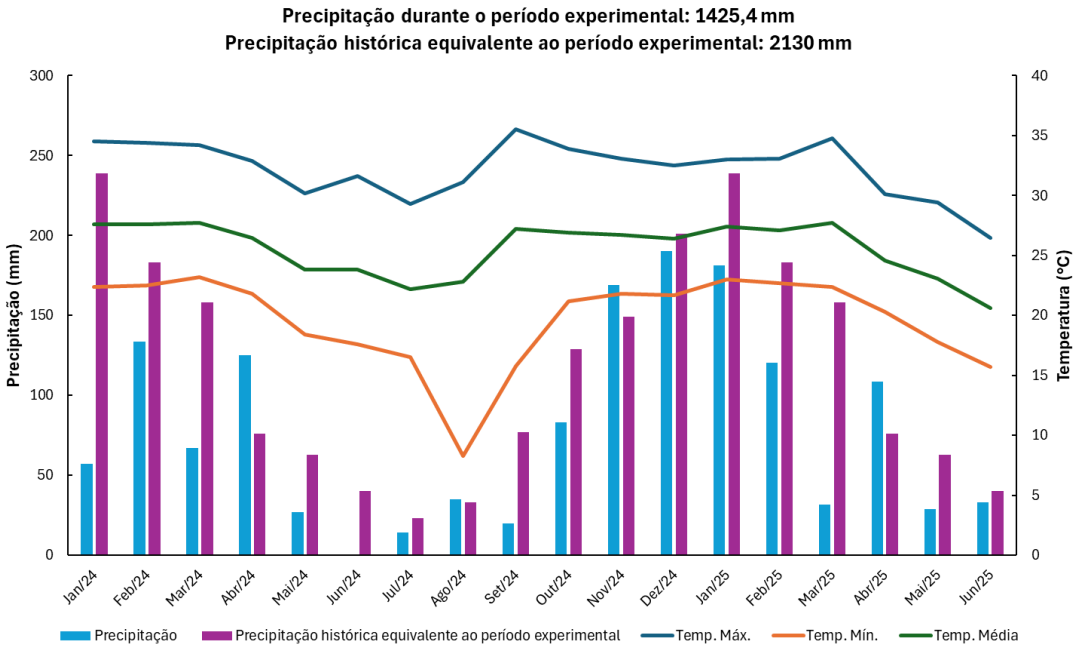
pH	M.O	P	K	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al	H +Al	SB	CTC	V	m
$CaCl_2$	mg/dm^3		----------mmol$_c$/dm^3----------							---% ---	
4,6	12	1,0	1,7	8,5	1,7	2,0	21,0	12	33	36	14
Cu	Fe	Mn	S	Zn	B	Areia	Argila	Silte			
mg/dm^3						g/kg					
1,6	25,1	30,5	2,6	0,7	0,48	859	90	51			

Nota: pH ($CaCl_2$) (0,01 mol L^{-1}) na relação solo: solução de 1:2,5; H+Al foi determinado pelo método Shoemaker–McLean–Pratt (SMP); P, Ca^{2+}, Mg^{2+} e K^+: extração por resina trocadora de íons; MO: teor de matéria orgânica do solo (Walkley-Black); S–SO_4^{2-}: extração com $Ca(H_2PO_4)_2$ 0,01 mol L^{-1}; B: ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 0,125%) foi extraído com água quente; Cu, Fe, Mn e Zn: extração com DTPA; soma de bases (SB): $Ca^{2+} + Mg^{2+} + K^+$; CTC: capacidade de troca de cátions a pH 7 (SB + H+Al); V% (saturação por bases): [(SB/CTC) × 100]; e distribuição granulométrica (areia, silte e argila) pelo método do densímetro. Fonte: Própria autora.

3.2.2 Condições climáticas

A região apresenta clima tropical úmido (Aw, classificação de Köppen), com verão chuvoso e inverno seco. A precipitação acumulada e a temperatura média anual foram de 922 mm e 26°C no ano agrícola 1 (2023/24), e de 503 mm e 25°C no ano agrícola 2 (2024/25); as temperaturas mínima e máxima foi de 19°C e 33°C, respectivamente. Os dados meteorológicos foram obtidos em estação meteorológica automática do Centro de Climatologia da UNESP/FCAT, em Dracena (Figura 1).

Figura 1 - Precipitação pluvial mensal e médias históricas, e temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período experimental. Dracena, SP, 2024/2025. Dados obtidos da estação meteorológica da UNESP/FCAT – Dracena



Fonte: Própria autora.

3.2.3 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições e cinco tratamentos (controle sem fertilização e sem inoculação; 80 kg ha^{-1} N; 40 kg ha^{-1} N sem e com inoculação com as cepas de *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6; e inoculação com as cepas sem fertilização nitrogenada), totalizando 20 unidades experimentais. Cada parcela mediu 4,0 m de comprimento por 3,0 m de largura, totalizando 12 m². O nitrogênio foi fornecido na forma de ureia (45% N), e as doses de 40 e 80 kg ha^{-1} N foram parceladas em duas aplicações

iguais por ano agrícola, totalizando quatro aplicações ao longo dos dois anos agrícolas (dez/2023, jan/2024, dez/2024 e jan/2025).

O estudo compreendeu nove cortes: fev/2024, abr/2024, mai/2024, out/2024, dez/2024, jan/2025, fev/2025, abr/2025 e mai/2025. Para determinar a origem do N (solo e fertilizante) e a absorção de N pelas plantas, foi utilizada a técnica de diluição isotópica com ^{15}N. Assim, foram aplicadas ureia marcada com ^{15}N (1,19 átomo% de excesso de ^{15}N) e ureia não marcada (controle isotópico). Todas as unidades experimentais receberam tanto ureia marcada quanto ureia natural. O traçador ^{15}N foi aplicado em uma microparcela de 0,5 m × 1,0 m delimitada com estacas de madeira, após a colheita do primeiro ciclo (fev/2024), dentro da área útil de cada parcela experimental. No quinto ciclo (dez/2024), foi realizada aplicação em área total de 60 kg P_2O_5 ha^{-1} na forma de superfosfato simples (18%) e 40 kg K_2O ha^{-1} na forma de cloreto de potássio (60%), imediatamente após o corte de uniformização para iniciar o segundo ano experimental.

3.2.4 Formulação do inoculante BPCP

As cepas de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) foram adquiridas comercialmente (concentração a 2×10^8 UFC mL^{-1}). A dose da solução bacteriana para aplicação foliar foi de 400 mL ha^{-1}, utilizando volume de calda de 200 L ha^{-1}. As aplicações foram realizadas dez dias após o corte de uniformização e após a primeira colheita (jan/2024 e mar/2024, respectivamente), sob temperaturas amenas e umidade adequada, no final da tarde. No segundo ano, a mesma metodologia foi seguida, com aplicações em dez/2024 e jan/2025. A aplicação dos tratamentos foi realizada com pulverizador costal elétrico, utilizando pressão constante e volume de calda de 200 L ha^{-1}.

3.2.5 Amostragem das plantas e concentrações de nutrientes

Antes de cada ciclo de corte, a altura das plantas foi medida com régua milimetrada. Nove ciclos foram realizados durante as estações seca e chuvosa para determinar a produtividade de massa seca das plantas, quando as parcelas atingiram parcialmente 40 cm de altura e a parte aérea foi colhida a 20 cm acima da superfície do solo. As amostras para estimativa da massa seca da parte aérea foram coletadas com auxílio de uma moldura de amostragem de 0,5 m², e uma roçadeira foi utilizada para cortar a área interna das parcelas.

Após a colheita, o material vegetal foi pesado. Uma subamostra de aproximadamente 200 g da fração lâmina foliar foi separada, e a fração colmo + bainha foi identificada, pesada e seca em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até massa constante, conforme descrito por (Silva; Queiroz, 2002a). O material seco foi pesado em balança analítica para quantificar a produtividade de massa seca da forragem, e as amostras foram moídas em micromoinho tipo Wiley (R-TE-648), passando por peneira de 1 mm. O N total foi determinado por digestão sulfúrica, seguida de destilação pelo método semimicro Kjeldahl. As concentrações de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Zn, Fe, Mn e Cu) foram determinadas conforme Malavolta (1997). O acúmulo de nutrientes na forragem foi calculado pela multiplicação da concentração do nutriente pela quantidade de massa seca produzida nas estações chuvosas (abr/2024 e fev/2025) e nas estações secas (out/2024 e mai/2025).

3.2.6 Quantificação do N derivado do fertilizante e do solo

O material vegetal para determinação de ^{15}N foi colhido da biomassa de forragem da parte aérea cortada a 20 cm acima da superfície do solo no segundo e no quarto ciclos, utilizando uma moldura de amostragem com 25 cm de largura e 50 cm de comprimento; uma foice de arroz foi utilizada para o corte. As amostras secas da parte aérea foram finamente moídas e passadas em peneira de 2 mm, acondicionadas em cápsulas de estanho e pesadas em balança analítica ultramicro com precisão de cinco casas decimais. Um espectrômetro de massa de razão isotópica acoplado a um analisador elementar de N foi utilizado para análise de ^{15}N (Isotope Ratio Mass Spectrometry—IRMS; modelo HYDRA 20-20 ANCA–GLS, Sercon, Cheshire, Reino Unido) (Barrie; Prosser, 1996).

Uma amostra controle com abundância natural do isótopo estável ^{15}N (0,366%) foi incluída a cada dez amostras analisadas para controle de qualidade. Assim, a quantidade de ^{15}N acumulada por *U. brizantha* cv. Marandu e o enriquecimento obtido (biomassa da parte aérea, kg ha^{-1}) foram calculados considerando a abundância isotópica do material marcado (ureia-^{15}N) e a abundância natural de ^{15}N (0,3663 átomo% ^{15}N: 99,6337 átomo% ^{14}N) (International Atomic Energy Agency—IAEA, 2001). O particionamento do nitrogênio na parte aérea de *U. brizantha* cv. Marandu foi calculado seguindo os procedimentos propostos por (Galindo *et al.*, 2021a; Paulo *et al.*, 2021; Trivelin *et al.*, 1994):

a) Nitrogênio acumulado: AN (kg ha^{-1}):

$$AN = (N \times MSPA) \qquad (1)$$

em que N é a concentração de nitrogênio no tecido (kg ha^{-1}) e MSPA é a massa seca da parte aérea (kg ha^{-1}).

b) Nitrogênio na planta derivado do fertilizante (NPFF):

O excesso de átomo% de ^{15}N na planta e no fertilizante foi obtido utilizando a Equação (2), com base no princípio da diluição isotópica, para calcular %Ndff

$$\% \, NPFF = \left(\frac{\% \, de \, átomos \, de \, {}^{15}N \, em \, excesso \, na \, planta}{\% \, de \, átomos \, de \, {}^{15}N \, em \, excesso \, no \, fertilizante} \right) \times 100 \qquad (2)$$

em que o excesso de átomo% de ^{15}N na planta corresponde ao átomo% de ^{15}N na planta menos a abundância natural (0,3663%), e o excesso de átomo% de ^{15}N no fertilizante corresponde ao átomo% de ^{15}N no fertilizante menos a abundância natural (0,3663%).

c) Quantidade de N derivado do fertilizante (QNPFF, kg ha^{-1}):

$$QNPFF = (\% \, NPFF \times AN) \div 100\text{Ndff} \qquad (3)$$

em que AN é o nitrogênio acumulado (kg ha^{-1}) e %NPFF é a porcentagem de N da planta derivado do fertilizante.

d) Quantidade de N derivado do solo (matéria orgânica remanescente e outras fontes) (QNPFS, kg ha^{-1}):

$$QNPFS = AN - QNPFF \qquad (4)$$

em que AN é o nitrogênio acumulado (kg ha^{-1}) e QNPFF é a quantidade de N da planta derivado do fertilizante (kg ha^{-1}).

e) Porcentagem de N derivado do solo (matéria orgânica remanescente e outras fontes) (%NPFS):

$$\% \, NPFS = (QNPFS \div AN) \times 100 \qquad (5)$$

em que AN é o nitrogênio acumulado (kg ha^{-1}) e QNPFS é a quantidade de N da planta derivado do solo.

f) Eficiência de recuperação do N do fertilizante (NRFF, %), com ou sem *A. brasilense*:

$$\% \, NRFF = (QNPFF \div DOSE) \times 100 \qquad (6)$$

em que QNPFF é a quantidade de N da planta derivado do fertilizante (kg ha^{-1}) e DOSE é a quantidade de N aplicada como fertilizante marcado (kg ha^{-1}).

3.2.7 Capacidade fotossintética

As avaliações de trocas gasosas foliares consistiram em medições não destrutivas utilizando analisador de gases por infravermelho (LI-6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE, EUA), sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de 1.800 μmol m^{-2} s^{-1} e concentração ambiente de CO_2 de 380 μmol mol^{-1}, com temperatura foliar entre 21 e 25°C, de acordo com (Roscher *et al*., 2011; Sakai *et al*., 2019). Foram registradas as seguintes variáveis: taxa de assimilação de CO_2 por unidade de área foliar (*A*, μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), transpiração (*E*, μmol H_2O m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (*g*s, mol H_2O m^{-2} s^{-1}), concentração intercelular de CO_2 (*Ci*, μmol mol^{-1}) e eficiências instantânea e intrínseca do uso da água (*WUEt* e *WUEi*, mmol CO_2 mol^{-1} H_2O). Duas leituras por parcela foram realizadas na terceira folha recém-expandida.

3.2.8 Análise proteômica

As análises de proteômica diferencial foram realizadas em tecidos da parte aérea de plantas de capim-marandu submetidas à inoculação foliar de *A. brasilense* + 40 kg ha^{-1} N, em comparação com plantas tratadas com diferentes doses de N (40 e 80 kg ha^{-1} N) sem inoculação bacteriana. As proteínas diferencialmente abundantes foram avaliadas após o tratamento de inoculação foliar (aproximadamente 30 dias). Três amostras biológicas por tecido/condição (cada uma com aproximadamente 250 mg de massa fresca) foram submetidas à extração proteica utilizando o Total Plant Protein Extraction Kit (Sigma-Aldrich). As concentrações de proteína foram determinadas pelo ensaio BCA, utilizando aLFumina sérica bovina como padrão (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Os extratos proteicos de cada tratamento foram digeridos com tripsina e preparados para posterior análise proteômica por espectrometria de massas (LC–MS/MS), seguindo a metodologia descrita por (Almadanim *et al*., 2017), utilizando bancos de dados específicos de Poaceae da NCBI Reference Sequence Database (RefSeq).

O software PatternLab foi utilizado para identificar proteínas diferencialmente abundantes ou exclusivas de cada condição testada. Comparações par a par entre condições foram realizadas utilizando dados de contagem espectral em uma versão atualizada do módulo TFold do PatternLab. A seleção e a filtragem de proteínas foram baseadas nos seguintes critérios: proteínas não detectadas em três corridas por tratamento foram excluídas; um limiar de q-valor de 0,05 e uma F-stringency de 0,01 foram aplicados. Proteínas de baixa abundância que apresentaram baixos valores de p e alteração significativa de fold change, mas baixas

contagens espectrais, foram removidas utilizando L-stringency de 0,4. Além disso, um fold change absoluto superior a 2 foi utilizado para definir proteínas diferencialmente abundantes (DAPs). Os dados de proteômica por espectrometria de massas foram depositados no ProteomeXchange Consortium por meio do repositório parceiro PRIDE (Perez-Riverol *et al*., 2025), com o identificador de conjunto de dados PXD073460.

3.2.9 Microbioma do solo

Ao final do experimento, três plantas de capim-marandu por parcela foram coletadas, e o solo rizosférico aderido às raízes foi cuidadosamente removido e armazenado a −80°C até o início dos procedimentos moleculares. O DNA genômico total foi extraído de 200 mg de solo rizosférico utilizando o PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, EUA). Uma PCR inicial foi realizada com os primers 341F e 806R (Caporaso *et al*., 2012), que amplificam a região V3–V4 do gene 16S rRNA. Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após o sequenciamento, as leituras brutas (formato fastq) foram processadas e analisadas utilizando Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME2) (Bolyen *et al*., 2019), versão 2020.8, e seus plugins. O plugin DADA2 (Callahan *et al*., 2016) foi utilizado para aparar as sequências, remover quimeras (método de consenso) e inferir sequências representativas, denominadas variantes de sequência de amplicons (ASVs). A taxonomia foi atribuída às ASVs utilizando o plugin q2-feature-classifier (Bokulich *et al*., 2018) contra o banco de dados de referência SILVA138 99% OTUs (Quast *et al*., 2013). As análises subsequentes foram realizadas no R v4.0 (R Core Team, 2014), utilizando os pacotes phyloseq (McMurdie; Holmes, 2013) e vegan (Oksanen *et al*., 2019). A cobertura de sequenciamento foi avaliada por análise de rarefação.

3.2.10 Densidade radicular

A densidade do sistema radicular foi avaliada ao final do segundo ano agrícola. A profundidade de amostragem foi de 0–20 cm, por meio da coleta de solo + raízes com trado holandês. Em seguida, as raízes foram lavadas em peneira para remoção do solo e secas em estufa a 65°C até massa constante. Os dados foram expressos em g dm^{-3}.

3.2.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R (versão 4.3.1; R Core Team, 2025). Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram testados pelos testes de Shapiro–Wilk e O'Neill–Mathews, respectivamente. O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$; pacote ExpDes.pt) foi utilizado para agrupar as médias dos tratamentos (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2021). Os mapas de calor de correlação de Pearson foram gerados utilizando os pacotes ggcorrplot (Kassambara, 2016) e ggplot2 (Cassimiro *et al*., 2023; Rodrigues *et al*., 2021)(Cassimiro *et al*., 2023; Rodrigues *et al*., 2021)(Wickham, 2016) no RStudio.

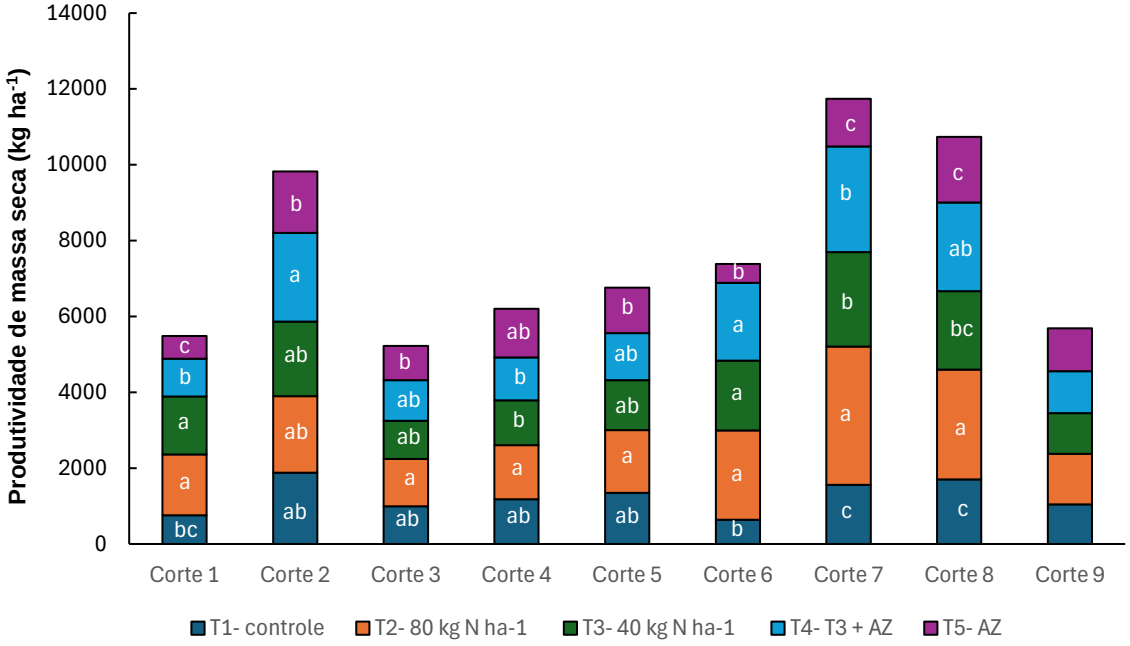
3.3 Resultados

3.3.1 Produtividade de massa seca

A produtividade de massa seca da parte aérea (MSPA) do capim-marandu variou entre os tratamentos ao longo dos nove cortes (Figura 2), evidenciando resposta predominante à fertilização nitrogenada e efeito pontual da inoculação em combinação com N. No primeiro ano agrícola, durante a estação chuvosa (cortes 1, 2 e 3), os maiores valores de MSPA foram geralmente observados nos tratamentos fertilizados com N, com destaque para 80 kg ha^{-1} N. No corte 2, a associação de 40 kg ha^{-1} N com inoculação com *A. brasilense* esteve entre os grupos superiores, sugerindo potenciais ganhos produtivos sob condições hídricas favoráveis. Durante a estação seca de 2024 (cortes 4 e 5), a dose de 80 kg ha^{-1} N permaneceu entre as maiores produtividades, enquanto a inoculação isolada apresentou desempenho inferior aos tratamentos fertilizados, especialmente no corte 5. No segundo ano agrícola, durante a estação chuvosa (cortes 6, 7 e 8), os tratamentos fertilizados com N atingiram as maiores produtividades, com picos nos cortes 7 e 8, reforçando a consistência da resposta ao N; em contraste, T1 (controle) e T5 (*A. brasilense* isolado) permaneceram entre os menores valores. Por fim, no corte 9 (estação seca), não foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, sugerindo menor responsividade da forrageira ao manejo sob restrição hídrica mais intensa.

Figura 2 - Produtividade de massa seca (MS) do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no período experimental de dois anos agrícolas (2023/2024 e 2024/2025), sob

inoculação em área total com bactérias e doses de N. Os cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8 referem-se ao período das águas, enquanto os cortes 4, 5 e 9 referem-se ao período das secas. Tratamentos: T1 – controle (sem inoculação e sem N); T2 – 80 kg N ha^{-1}, sem inoculação; T3 – 40 kg N ha^{-1}, sem inoculação; T4 – 40 kg N ha^{-1}(T3) + *Azospirillum brasilense* (AZ); T5 – *Azospirillum brasilense* (AZ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos dentro de cada corte ($p \leq 0,05$)



Fonte: Própria autora.

3.3.2 Análise temporal da produtividade acumulada e da densidade de massa seca radicular

A produtividade acumulada de massa seca diferiu entre os tratamentos em ambos os anos (Tabela 2). No ano agrícola 1 (fev a dez/2024), o tratamento com 80 kg N ha^{-1} apresentou a maior produtividade acumulada (7.943,9 kg ha^{-1}), superior a 40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* e *A. brasilense* isolado, e semelhante a 40 kg N ha^{-1}. O *A. brasilense* isolado teve o menor acúmulo (5.610,2 kg ha^{-1}). No ano agrícola 2 (jan a mai/2025), 80 kg N ha^{-1} permaneceu superior e alcançou o maior acúmulo (10.233,6 kg ha^{-1}), diferindo de todos os demais. Os tratamentos 40 kg N ha^{-1} e 40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* não diferiram entre si estatisticamente, enquanto o controle e a bactéria isolada apresentaram as menores produtividades, sugerindo que a inoculação isolada não sustentou ganhos na produtividade acumulada.

Tabela 2 - Produtividades acumulada de massa seca do capim-marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, no período de Janeiro/2024 a Maio/2025, sob inoculação ou não, com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Ano agrícola 1 Fevereiro a Dezembro/2024	Ano agrícola 2 Janeiro a Maio/2025
	kg ha^{-1}	
T1- controle	6166,9 bc	4939,7 c
T2- 80 kg N ha^{-1}	7943,9 a	10233,6 a
T3- 40 kg N ha^{-1}	6998,7 ab	7476,1 b
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	6783,04 b	8281,7 b
T5- *Azospirillum brasilense*	5610,2 c	4624,8 c
Média	6700,5	7111,1
Pr>F	**	**
C.V. (%)	6,8	9,6

Nota: Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).**Significativo a $p \leq 0,01$. ns = não significativo. Ano agrícola 1 compreende os cortes 1, 2, 3, 4 e 5. Ano agrícola 2 compreende os cortes 6, 7, 8 e 9. Fonte: Própia autora.

A densidade radicular foi influenciada pelos tratamentos (Tabela 3). O maior valor foi observado no tratamento 40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* (29,8 g dm^{-3}), diferindo do controle e da inoculação isolada, que apresentaram menores densidades (20,3 e 18,1 g dm^{-3}, respectivamente). Os tratamentos apenas com N mineral (T2 e T3) apresentaram valores intermediários (23,2 e 26,2 g dm^{-3}) e não diferiram estatisticamente de 40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense*, sugerindo que a combinação da inoculação com uma dose moderada de N favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular em comparação à ausência de N e à inoculação sem fertilização.

Tabela 3 - Densidade de raiz do capim-marandu cultivado a campo em Dracena – SP, no período de Janeiro/2024 a Maio/2025, sob inoculação ou não, com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}.

Tratamento	Maio/2025
	g dm^{-3}
T1- controle	20,3 b
T2- 80 kg N ha^{-1}	23,2 ab
T3- 40 kg N ha^{-1}	26,2 ab
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	29,8 a
T5- *Azospirillum brasilense*	18,1 b
Média	23,5
Pr>F	**
C.V. (%)	16,9

Nota: Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).**Significativo a $p \leq 0,01$. ns = não significativo. Raízes foram coletadas na profundidade de 0-20 cm.
Fonte: Própia autora.

3.3.3 Altura de plantas

No ano agrícola 1, os tratamentos não afetaram a altura de plantas, tanto na estação chuvosa quanto na seca (Tabela 4). As médias gerais foram semelhantes entre os tratamentos, com valores em torno de 50,0 e 53,9 cm nas avaliações da estação chuvosa e de 44,4, 36,8 e 47,0 cm nas avaliações da estação seca.

No ano agrícola 2, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos durante a estação chuvosa, enquanto não houve diferenças na estação seca (Tabela 4). Na primeira avaliação da estação chuvosa, 80 kg N ha^{-1} resultou em maior altura (50,4 cm) que a inoculação isolada (35,5 cm). Na segunda avaliação da estação chuvosa, a maior dose de N e 40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* formaram o grupo superior, 40 kg N ha^{-1} foi intermediário, e o controle e a bactéria isolada apresentaram as menores alturas.

Tabela 4 - Altura do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena – SP, no período de 2024 e 2025, sob inoculação ou não, com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}.

Tratamento	Janeiro a Dezembro/2024				
	Período das Águas			Período da Seca	
	cm				
T1- controle	49,2	54,6	43,6	37,1	46,5
T2- 80 kg N ha^{-1}	53,2	55,4	45,6	38,0	48,8
T3- 40 kg N ha^{-1}	50,9	53,8	43,7	33,8	47,8
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	49,4	53,4	45,6	37,4	48,2
T5- *Azospirillum brasilense*	47,6	52,3	43,4	37,9	43,8
Média	50,0	53,9	44.4	36,84	47,0
Pr>F	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	10,8	7,8	5,6	7,8	9,6

Tratamento	Janeiro a Maio/2025			
	Período das Águas			Período da Seca
	cm			
T1- controle	39,4 ab	64,6 c	39,1	49,8
T2- 80 kg N ha^{-1}	50,4 a	80,7 a	39,6	50,5
T3- 40 kg N ha^{-1}	45,0 ab	76,0 ab	40,6	50,8
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	43,6 ab	78,4 a	39,6	51,7
T5- *Azospirillum brasilense*	35,5 b	66,2 bc	39,3	49,1
Média	42,8	73,2	39,6	50,4
Pr>F	*	*	ns	ns
C.V. (%)	12,0	6,0	6,1	10,8

Nota: Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).**Significativo a $p \leq 0,01$. Período das Águas refere aos cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8. Período da Seca refere-se aos cortes 4, 5 e 9. Fonte: Própia autora.

3.3.4 Lâmina foliar

No primeiro ano agrícola, não houve efeito dos tratamentos sobre a relação lâmina foliar:colmo (LF/C) ou sobre a porcentagem de lâmina foliar (%LF) durante a estação chuvosa (Tabela 5), com médias gerais de 2,1 e 67,9%, respectivamente, indicando composição morfológica semelhante entre os manejos sob condições hídricas favoráveis. Na estação seca de 2024, os tratamentos afetaram significativamente a LF/C, enquanto a %LF não diferiu significativamente. Nessas condições, o controle e 40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* apresentaram as maiores relações (7,3 e 8,0, respectivamente), diferindo dos tratamentos com maior contribuição de colmo (T2, T3 e T5; valores de 2,8 a 3,6). Apesar da variação na LF/C, a proporção de lâmina foliar permaneceu estável entre os tratamentos, com média de 79,5% na estação seca de 2024.

No ano agrícola 2 não foram detectadas diferenças entre os tratamentos para LF/C ou %LF durante a estação chuvosa, com médias de 1,2 e 55,8%, respectivamente (Tabela 5). Em contraste, durante a estação seca de 2025, houve efeito significativo sobre LF/C e %LF ($p \leq 0,05$). Para LF/C, T2 (80 kg N ha^{-1}) apresentou o maior valor (3,0), diferindo de T4 (1,6), enquanto T1 e T3 foram intermediários. Para %LF, T2 novamente apresentou a maior porcentagem (74,4%), superior a T4 (61,4%), sugerindo que, sob maior restrição hídrica, a maior dose de N favoreceu a manutenção de uma estrutura mais folhosa, enquanto T4 apresentou menor participação de lâmina foliar.

Tabela 5 - Razão de lâmina foliar e colmo (LF/CM) e porcentagem de lâmina foliar (% LF) do capim-marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, no período das águas e seca no ano de 2024 e 2025, sob inoculação ou não, com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Janeiro a Dezembro/2024				Janeiro a Maio/2025			
	Período das Águas		Período da Seca		Período das Águas		Período da Seca	
	LF/CM	% LF	LF/CM	% LF	LF/CM	% LF	LF/CM	% LF
T1- controle	2,3	68,6	7,3 a	83,0	1,5	60,0	2,1 ab	65,9 ab
T2- 80 kg N ha^{-1}	2,6	71,5	3,6 b	77,6	1,2	56,4	3,0 a	74,4 a
T3- 40 kg N ha^{-1}	2,1	66,2	3,0 b	81,1	1,2	55,8	2,6 ab	72,4 ab
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	1,7	65,0	8,0 a	77,8	1,1	53,6	1,6 b	61,4 b
T5- *Azospirillum brasilense*	2,0	68,2	2,8 b	78,1	1,1	53,4	2,7 Ab	72,8 ab
Média	2,1	67,9	4,9	79,5	1,2	55,8	2,4	69,3
Pr>F	ns	ns	**	ns	ns	ns	*	*
C.V. (%)	18,8	8,5	20,8	14,1	17,2	6,7	22,4	7,3

Nota: Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).**Significativo a $p \leq 0,01$. ns = não significativo. Período das Águas refere aos cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8. Período da Seca refere-se aos cortes 4, 5 e 9. Fonte: Própria autora.

3.3.5 Eficiência de uso e recuperação do nitrogênio

Durante período das águas em 2024, não houve diferença entre os tratamentos para o acúmulo total de N (AN) ou para a quantidade de N derivado do solo (QNPFS) (Tabela 6). Entretanto, a contribuição do fertilizante variou entre os tratamentos, com diferenças no N da planta derivado do fertilizante (NPFF), na quantidade de N derivado do fertilizante (QNPFF) e no N da planta derivado do solo (NPFS). O tratamento 80 kg N ha^{-1} apresentou os maiores valores de NPFF (11,4%) e QNPFF (4,1 kg ha. O tratamento 40 kg ha^{-1} N + *A. brasilense* destacou-se pela maior eficiência de recuperação do N do fertilizante (NRFF = 16,9%), superior a 80 kg ha^{-1} N, sugerindo melhor aproveitamento do N aplicado quando combinado com a inoculação. No período da seca em 2024, os tratamentos afetaram significativamente AN,

NPFF, QNPFF, NRFF e QNPFS, enquanto NPFS não diferiu. AN aumentou em 40 kg N ha⁻¹ + *A. brasilense* (18,7 kg ha⁻¹), o que também esteve associado ao maior QNPFS (18,4 kg ha⁻¹).

Tabela 6 - Dados isótopos ^{15}N do capim-marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, período de 2024 sob inoculação ou não, com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Período das Águas					
	AN	NPFF	QNPFF	NRFF	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	36,7	11,4 a	4,1 a	10,4 b	32,6	88,6 b
T3- 40 kg N ha^{-1}	35,9	7,7 b	2,4 b	12,2 ab	30,2	92,2 a
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	36,1	9,3 ab	3,3 ab	16,9 a	32,8	90,7 ab
Média	36,2	9,4	3,2	13,1	31,8	90,5
Pr>F	ns	*	*	*	ns	*
C.V. (%)	7,4	10,6	16,9	17,3	13,3	1,1
Tratamento	Período da Seca					
	AN	NPFF	QNPFF	NRFF	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	15,6 b	1,4 b	0,2 b	1,1 b	15,4 b	98.8 a
T3- 40 kg N ha^{-1}	15,1 b	2,0 a	0,4 a	1,0 b	15,5 b	97.7 b
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	18,7 a	1,0 c	0,2 b	1,3 a	18,4 a	98.6 a
Média	16,4	1,4	0,2	1,1	16,4	98,3
Pr>F	*	**	**	**	**	ns
C.V. (%)	7,3	12,7	5,8	2,4	3,4	0,5

Nota: Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste Tukey. *Significativo a $p \leq 0,05$. ns = não significativo. Fonte de N: ureia. AN: Acúmulo de N; NPFF: Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Fertilizante; QNPFF: Quantidade de Nitrogênio Fornecido pelo Fertilizante; NRFF: Nitrogênio Recuperado Fornecido pelo Fertilizante; QNPFS: Quantidade do Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Solo; NPFS: Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Solo. Técnica de diluição isotópica com ^{15}N enriquecido a 1,19%. Período das Águas refere ao corte 2. Período da Seca refere-se ao corte 4. Fonte: Própria autora.

No período das águas 2025, na parte aérea, os tratamentos afetaram AN e as variáveis relacionadas ao N derivado do fertilizante (NPFF e QNPFF), bem como QNPFS e NPFS, enquanto NRFF não diferiu (Tabela 7). O tratamento 80 kg N ha⁻¹ apresentou maior AN (30,8 kg ha⁻¹) e maior contribuição do fertilizante (NPFF = 29,6% e QNPFF = 0,18 kg ha⁻¹), superando 40 kg N ha⁻¹ e 40 kg N ha⁻¹ + *A. brasilense*. Durante a estação seca, não houve diferenças entre os tratamentos para nenhuma variável, com baixa contribuição do fertilizante (NPFF ~3,1–4,3%; NRFF ~1,4–1,9%) e alta dependência do N do solo (NPFS ~95,6–96,9%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Dados isótopos ^{15}N do capim-marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, período de 2025 sob inoculação ou não, com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Período das Águas					
	AN	NPFF	QNPFF	NRFF	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	30,8 a	29,6 a	9,12 a	22,79	21,71 a	70,42 b
T3- 40 kg N ha^{-1}	20,3 b	18,1 b	3,66 b	18,31	16,60 b	81,94 a
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	23,9 b	17,6 b	4,19 b	20,96	19,73 ab	82,41 a
Média	25,0	21,7	5,66	20,69	19,35	78,26
Pr>F	*	**	**	ns	*	*
C.V. (%)	10,9	7,1	13,4	12,2	11,0	2,0
Tratamento	Período da Seca					
	AN	NPFF	QNPFF	NRFF	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	13,4	4,3	0,5	1,4	12,8	95,6
T3- 40 kg N ha^{-1}	11,3	3,3	0,3	1,9	10,9	96,7
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	12,0	3,1	0,3	1,8	11,6	96,9
Média	12,2	3,5	0,4	1,7	11,7	96,4
Pr>F	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	19,7	26,2	42,1	45,1	19,1	0,9

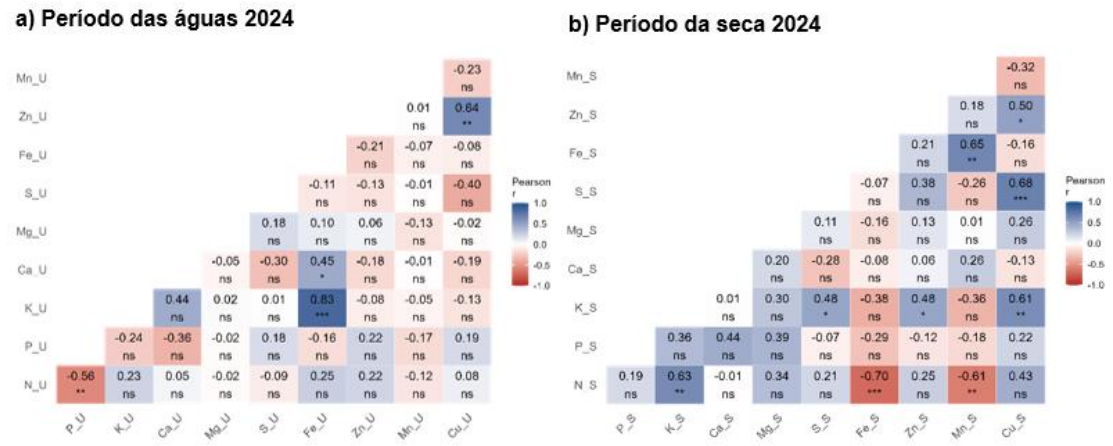
Nota: Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste Tukey. *Significativo a $p \leq 0,05$. ns = não significativo. Fonte de N: ureia. AN: Acúmulo de N; NPFF: Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Fertilizante; QNPFF: Quantidade de Nitrogênio Fornecido pelo Fertilizante; NRFF: Nitrogênio Recuperado Fornecido pelo Fertilizante; QNPFS: Quantidade do Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Solo; NPFS: Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Solo. Técnica de diluição isotópica com ^{15}N enriquecido a 1,19%. Período das Águas refere ao corte 7. Período da Seca refere-se ao corte 9. Fonte: Própria autora.

3.3.6 Estado nutricional

Na estação chuvosa de 2024, a matriz de correlação de Pearson mostrou poucas associações significativas entre as concentrações de nutrientes, com predomínio de correlações não significativas para a maioria dos pares (Figura 3a). A principal correlação negativa significativa ocorreu entre N e P ($r = -0,56$; $p \leq 0,01$). Entre as correlações positivas, observou-se forte associação entre K e Fe ($r = 0,83$; $p \leq 0,001$). Além disso, foi encontrada correlação positiva moderada entre Ca e Fe ($r = 0,45$; $p \leq 0,05$). Outra relação positiva relevante foi observada entre Zn e Cu ($r = 0,64$; $p \leq 0,01$), indicando associação consistente entre esses micronutrientes. As demais combinações, incluindo aquelas envolvendo Mn e S, não foram estatisticamente significativas.

Na estação seca de 2024, a matriz de correlação de Pearson mostrou que, embora a maioria das associações entre nutrientes não tenha sido significativa, correlações fortes e consistentes ocorreram principalmente envolvendo N, K, Fe, Mn, S, Zn e Cu (Figura 3b). Entre os macronutrientes, observou-se correlação positiva entre N e K ($r = 0,63$; $p \leq 0,01$). Em contraste, N correlacionou-se negativamente com Fe ($r = -0,70$; $p \leq 0,001$) e Mn ($r = -0,61$; $p \leq 0,01$), indicando que maiores concentrações de N estiveram associadas a menores valores de Fe e Mn. K também se associou positivamente a S ($r = 0,48$; $p \leq 0,05$), Zn ($r = 0,48$; $p \leq 0,05$) e Cu ($r = 0,61$; $p \leq 0,01$), sugerindo um grupo de nutrientes com comportamento semelhante. Além disso, houve correlações positivas entre S e Cu ($r = 0,68$; $p \leq 0,001$), Fe e Mn ($r = 0,65$; $p \leq 0,01$) e Zn e Cu ($r = 0,50$; $p \leq 0,05$).

Figura 3 - Matriz de correlação de Pearson entre os nutrientes na parte aérea do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no ano de 2024, sob inoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e adubação nitrogenada. (a) Período das águas referente ao corte 2 (U) e (b) período da seca referente ao corte 4 (S). Os valores nas células representam o coeficiente de correlação (r), e os asteriscos indicam significância estatística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns = não significativo). A escala de cores indica a direção e intensidade da correlação (azul = positiva; vermelho = negativa), sendo cores mais intensas associadas a maior magnitude de |r|



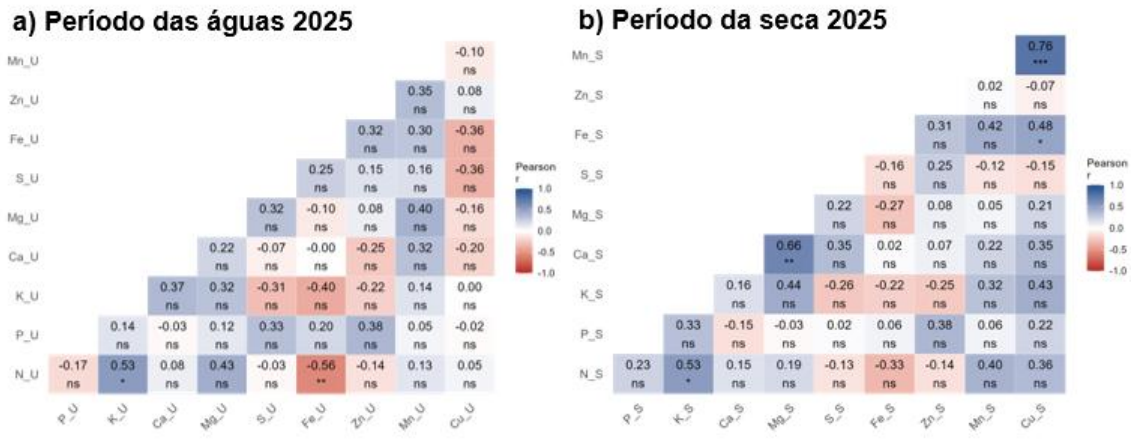
Fonte: Própria autora.

Na estação chuvosa de 2025, a matriz de correlação de Pearson indicou predomínio de associações não significativas entre os nutrientes avaliados, sugerindo baixa interdependência geral entre os elementos no tecido da parte aérea do capim-marandu (Figura 4a). No entanto, foram observadas correlações relevantes envolvendo nitrogênio. Houve correlação positiva entre N e K ($r = 0,53$; $p \leq 0,05$), sugerindo variação acoplada desses nutrientes. Por outro lado, observou-se correlação negativa entre N e Fe ($r = -0,56$; $p \leq 0,01$), sugerindo que aumentos em

N estiveram associados a menores valores de Fe no tecido avaliado. As demais combinações apresentaram correlações baixas a moderadas, sem significância estatística ($p > 0,05$), e devem ser interpretadas como tendências pontuais, sem evidência robusta de associação sob condições de estação chuvosa.

Na estação seca de 2025, a matriz de correlação de Pearson também mostrou predomínio de associações não significativas entre nutrientes, sugerindo que, sob restrição hídrica, a maioria dos elementos variou de forma relativamente independente (Figura 4b). Ainda assim, algumas correlações foram estatisticamente significativas e indicaram relações mais consistentes entre determinados nutrientes. Destacou-se uma forte correlação positiva entre Mn e Cu ($r = 0,76$; $p \leq 0,001$), sugerindo variação coordenada desses micronutrientes no tecido da parte aérea durante a estação seca. Também foi observada correlação positiva entre Ca e Mg ($r = 0,66$; $p \leq 0,01$), indicando comportamento conjunto desses cátions, bem como correlação positiva entre N e K ($r = 0,53$; $p \leq 0,05$), sugerindo associação entre o estado de N e o acúmulo de K. Além disso, observou-se correlação positiva entre Fe e Cu ($r = 0,48$; $p \leq 0,05$), reforçando a tendência de covariação entre micronutrientes ligados a processos redox e enzimáticos. As demais combinações não atingiram significância ($p > 0,05$) e devem ser interpretadas como tendências pontuais, sem evidência robusta de associação nas condições avaliadas.

Figura 4 - Matriz de correlação de Pearson entre os nutrientes na parte aérea do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no ano de 2025, sob inoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6) e adubação nitrogenada. (a) Período das águas referente ao corte 7 (U) e (b) período da seca referente ao corte 9 (S). Os valores nas células representam o coeficiente de correlação (r), e os asteriscos indicam significância estatística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns = não significativo). A escala de cores indica a direção e intensidade da correlação (azul = positiva; vermelho = negativa), sendo cores mais intensas associadas a maior magnitude de |r|



Fonte: Própria autora.

3.3.7 Capacidade fotossintética

No segundo corte da estação chuvosa, as trocas gasosas do capim-marandu apresentaram respostas pontuais aos tratamentos (Tabela 8). Em 2024, não houve efeito sobre fotossíntese (A), transpiração (E), Ci, WUEt ou CE, mas a condutância estomática (gs) e a eficiência intrínseca do uso da água (WUEi) diferiram; T2 (80 kg N ha^{-1}) apresentou os maiores valores de gs e WUEi, sugerindo maior abertura estomática e maior eficiência intrínseca. Em 2025, E, Ci, WUEi e CE diferiram entre os tratamentos, com destaque para 40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense*, que apresentou menor Ci e maiores WUEi e eficiência de carboxilação (CE), sugerindo maior eficiência fisiológica na assimilação de carbono, enquanto A não diferiu entre os tratamentos.

Tabela 8 - Fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), CO_2 na câmara subestomática (Ci), eficiência do uso da água instantânea (WUEt), eficiência do uso da água intrínseca (WUEi) e eficiência de carboxilação (CE) do capim-marandu, cultivado a campo, sob inoculação foliar ou não com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 (AZ), em associação a adubação nitrogenada, realizado no segundo corte, no período das águas. Dracena, SP

	Período das águas 2024						
Tratamento	*A*	*E*	*gs*	*Ci*	*WUEt*	*WUEi*	*CE*
	μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}			μmol mol^{-1}	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O	μmol CO_2 m^{-2} s^{-1} μmol CO_2 mol ar^{-1}
T1- controle	21,9	2,3	0,2 b	201,0	10,1	57,2 ab	0,1
T2- 80 kg N ha^{-1}	25,6	3,0	1,7 a	251,0	8,5	66,6 a	0,1
T3- 40 kg N ha^{-1}	20,2	2,2	0,3 b	218,0	9,1	15,4 c	0,1
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	22,0	2,4	0,5 b	242,0	9,0	37,2 bc	0,1
T5- *Azospirillum brasilense*	21,8	2,4	0,3 b	252,0	9,9	28,4 c	0,08
Média	22,3	2,4	0,6	232,8	9,3	40,9	0,1
Pr>F	ns	ns	*	ns	ns	*	ns
C.V. (%)	9,8	23,6	30,2	14,1	32,4	20,3	20,5
	Período das águas 2025						
Tratamento	*A*	*E*	*gs*	*Ci*	*WUEt*	*WUEi*	*CE*
	μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}			μmol mol^{-1}	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O	μmol CO_2 m^{-2} s^{-1} μmol CO_2 mol ar^{-1}
T1- controle	18,5	2,1 ab	0,3	236,0 a	8,6	48,4 b	0,07 ab
T2- 80 kg N ha^{-1}	16,0	1,9 ab	0,3	225,0 ab	8,6	58,1 ab	0,07 b
T3- 40 kg N ha^{-1}	15,8	1,3 b	0,2	207,0 ab	14,8	52,6 ab	0,07 b
T4- T3 + *Azospirillum brasilense*	20,1	1,7 ab	0,2	170,0 b	12,3	84,0 a	0,12 a
T5- *Azospirillum brasilense*	18,4	2,7 a	0,4	221,0 ab	6,6	41,4 b	0,08 ab
Média	17,7	1,9	0,2	211,8	10,1	56,9	0,08
Pr>F	ns	*	ns	*	ns	*	*
C.V. (%)	14,11	20,7	28,0	10,2	45,5	21,7	17,3

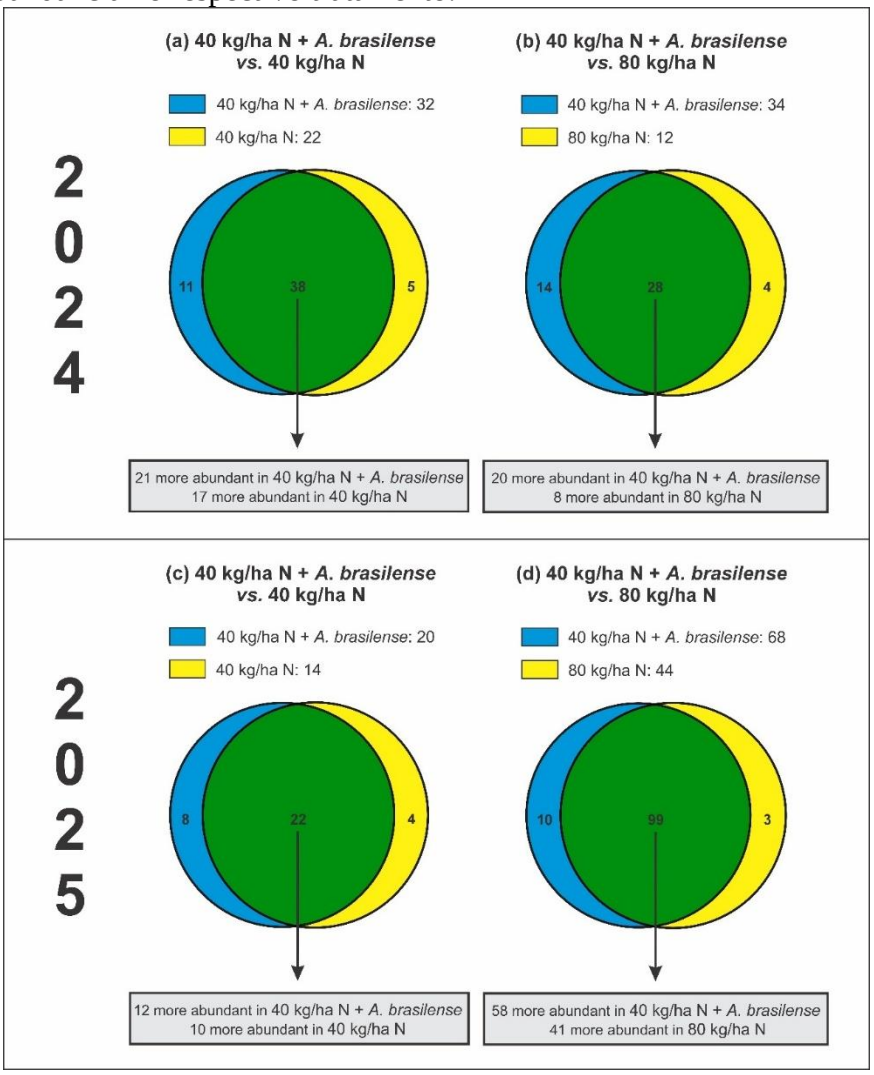
Nota: Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste Tukey. *Significativo a $p \leq 0,05$. **Significativo a $p \leq 0,01$. ns = não significativo. Fonte de N: ureia. Período das Águas refere ao corte 2 em 2024, e ao corte 7 em 2025. Fonte: Própria autora.

3.3.8 Visão geral da análise proteômica

Durante o primeiro ano agrícola (segundo corte), a análise proteômica da parte aérea do capim-marandu identificou um total de 597 proteínas ao comparar o tratamento 40 kg ha^{-1} N suplementado com *A. brasilense* com o tratamento 40 kg ha^{-1} N isolado. Dessas, 54 proteínas (9,0%) foram detectadas exclusivamente ou apresentaram abundância diferencial entre os tratamentos (Figura 5a). Comparação semelhante entre os tratamentos 40 kg ha^{-1} N + *A.*

brasilense e 80 kg ha^{-1} N resultou em 596 proteínas identificadas, das quais 46 (7,7%) foram exclusivas ou diferencialmente abundantes (Figura 5b).

Figura 5 - Diagramas de Venn mostrando a distribuição das proteínas diferencialmente abundantes na parte aérea de Urochloa brizantha cv. Marandu em 2024 (a, b) e 2025 (c, d). O tratamento com 40 kg ha^{-1} de N associado à inoculação com *Azospirillum* brasilense foi comparado aos tratamentos com 40 kg ha^{-1} de N (a, c) e 80 kg ha^{-1} de N (b, d). As regiões não sobrepostas em azul e amarelo indicam as proteínas exclusivamente mais abundantes em cada tratamento, enquanto a região sobreposta em verde representa as proteínas compartilhadas entre os tratamentos comparados. Os números no interior dos círculos indicam as quantidades de proteínas exclusivas e compartilhadas. As caixas abaixo de cada diagrama mostram, entre as proteínas compartilhadas, quantas apresentaram maior abundância em cada tratamento. Os valores apresentados nas legendas correspondem ao número total de proteínas mais abundantes em cada tratamento, obtido pela soma das proteínas exclusivas e das proteínas compartilhadas com maior abundância no respectivo tratamento.



Fonte: Própria autora.

No segundo ano agrícola (sétimo corte), foi detectado um proteoma maior. Um total de 631 proteínas foi identificado na parte aérea ao comparar os tratamentos 40 kg ha^{-1} N + *A. brasilense* e 40 kg ha^{-1} N, com 34 proteínas (5,4%) diferindo entre os tratamentos ou ocorrendo exclusivamente em uma condição (Figura 5c). Quando o mesmo tratamento inoculado foi comparado com a maior dose de nitrogênio (80 kg ha^{-1} N), 630 proteínas foram identificadas, e 112 delas (17,8%) foram exclusivas ou diferencialmente abundantes (Figura 5d).

As sequências proteicas foram comparadas com o banco de dados NCBI utilizando BLASTp para identificar domínios conservados, funções moleculares e anotações funcionais. Com base nessas informações e com apoio da literatura existente, as proteínas foram posteriormente agrupadas em categorias funcionais de acordo com seus papéis biológicos presumidos. Para facilitar a interpretação da variação na abundância proteica entre categorias funcionais, uma visão geral resumida é apresentada na Tabela 9.

Durante o segundo corte, emergiram seis padrões distintos com base na abundância relativa de proteínas entre os tratamentos. As categorias funcionais mais representadas sob o tratamento *A. brasilense* + 40 kg ha^{-1} N, em comparação com 40 kg ha^{-1} N isolado, incluíram metabolismo de carboidratos e produção de energia, organização do citoesqueleto e processos relacionados à metilação. Resposta ao estresse e manutenção da estrutura do DNA foram super-representadas sob *A. brasilense* + 40 kg ha^{-1} N em relação aos tratamentos com 40 e 80 kg ha^{-1} N, enquanto sistemas antioxidantes e sinalização por cálcio foram mais abundantes quando comparados especificamente à condição de 80 kg ha^{-1} N. Em contraste, proteínas associadas à fotossíntese, fotorrespiração e transcrição foram menos representadas sob *A. brasilense* + 40 kg ha^{-1} N em relação a 40 kg ha^{-1} N, enquanto categorias agrupadas como “outras” foram menos representadas em comparação aos dois tratamentos apenas com N. Proteínas relacionadas à tradução apresentaram padrão misto, sendo menos representadas em relação a 40 kg ha^{-1} N, mas mais representadas em comparação com 80 kg ha^{-1} N.

Classificação semelhante foi aplicada ao sétimo corte, no qual também foram identificados seis padrões de abundância. Proteínas relacionadas ao sistema antioxidante foram super-representadas sob *A. brasilense* + 40 kg ha^{-1} N em comparação com 40 kg ha^{-1} N isolado. As categorias agrupadas como “outras”, juntamente com biossíntese de clorofila e processos relacionados a hormônios, foram mais abundantes sob *A. brasilense* + 40 kg ha^{-1} N em relação aos dois tratamentos apenas com N. Resposta ao estresse, organização do citoesqueleto e tradução foram super-representadas quando comparadas especificamente à condição de 80 kg ha^{-1} N. Por outro lado, proteínas envolvidas em modificação e degradação proteica foram

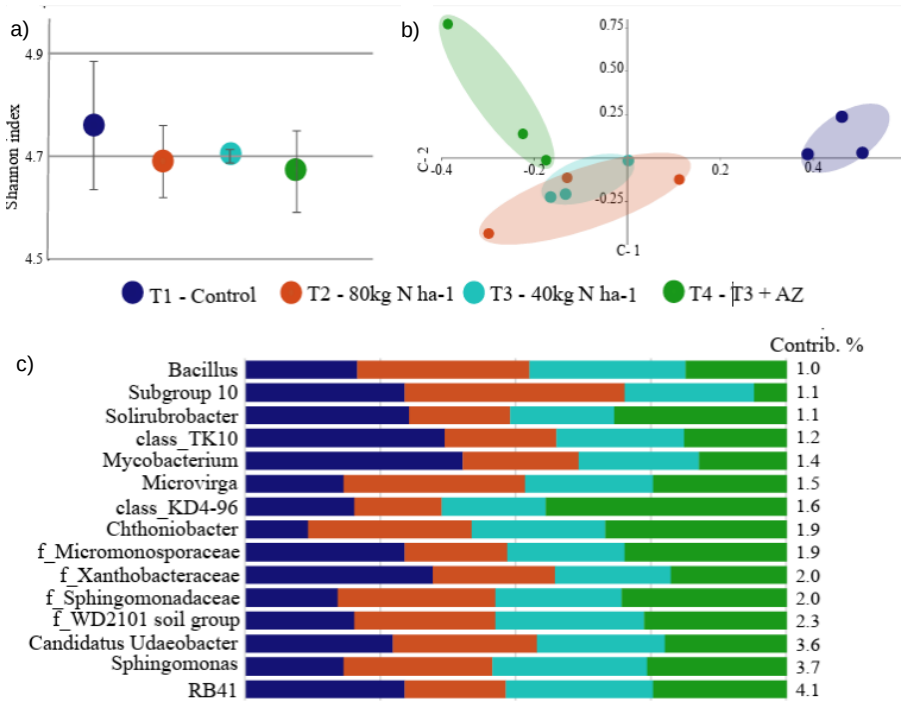
menos representadas em relação a 40 kg ha^{-1} N, enquanto proteínas relacionadas à parede celular foram menos representadas em comparação aos dois níveis de N. Por fim, proteínas associadas à fotossíntese e aquelas com função desconhecida foram menos representadas sob *A. brasilense* + 40 kg ha^{-1} N quando comparadas ao tratamento com 80 kg ha^{-1} N.

3.3.9 Comunidades procarióticas do solo

Para avaliar o impacto da fertilização nitrogenada (N) e da inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre as comunidades procarióticas do solo, foi realizado sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA em amostras de solo rizosférico. Um total de 23.314 variantes de sequência de amplicons (ASVs), abrangendo 793 gêneros putativos, foi identificado em todos os tratamentos. Embora a diversidade alfa (índice de Shannon) tenha permanecido consistente entre os tratamentos, a análise de diversidade beta (PCoA) revelou alterações estruturais distintas nas comunidades procarióticas (Figura 6 A e B). Os tratamentos fertilizados com N (T2 e T3) agruparam-se independentemente, enquanto T1 (controle) e T4 (N+AZ) formaram dois grupos adicionais.

O teste SIMPER identificou os táxons procarióticos que mais contribuíram para a dissimilaridade total entre as amostras avaliadas. A inoculação com *A. brasilense* enriqueceu famílias como *Sphingomonadaceae*, *Pyrinomonadaceae*, *Micromonosporaceae*, classe_KD4-96, *Solirubrobacteraceae*, *Chthoniobacteraceae*, o grupo de solo WD2101 e *Beijerinckiaceae*. Em nível de gênero (Figura 6 C), sequências não classificadas dentro da classe Chloroflexi KD4-96 foram fortemente estimuladas no tratamento com *A. brasilense*. Além disso, a abundância relativa de *Sphingomonas* spp. e *Chthoniobacter* spp. aumentou sob fertilização nitrogenada (T2, T3 e T4), enquanto sequências de *Mycobacterium* spp. foram significativamente reduzidas.

Figura 6 - Análise das comunidades microbianas de solos cultivados com Urochloa brizantha cv. Marandu sob diferentes doses de N e inoculação com *Azospirillum* brasilensis. (A) Diversidade alfa, (B) Diversidade beta e (C) 15 famílias procarióticas que mais contribuíram para a diversidade total de acordo com o teste SIMPER.



Fonte: Própria autora.

Tabela 9 - Representação esquemática das categorias funcionais diferencialmente representadas na parte aérea de capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) sob condições de 40 kg N ha^{-1} + *Azospirillum brasilense*, 40 kg N ha^{-1} e 80 kg N ha^{-1}, durante o segundo (2024) e sétimo (2025) cortes do capim. Diferentes tons de cinza representam os diferentes padrões de resposta. O número de setas refere-se ao nível de representação, que se baseia no número de sequências diferencialmente abundantes

	Segundo corte (2024)				**Sétimo corte (2025)**			
	40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* vs. 40 kg N ha^{-1}		**40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* vs. 80 kg N ha^{-1}**		**40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* vs. 40 kg N ha^{-1}**		**40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* vs. 80 kg N ha^{-1}**	
Categorias funcionais	**40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense***	**40 kg N ha^{-1}**	**40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense***	**80 kg N ha^{-1}**	**40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense***	**40 kg N ha^{-1}**	**40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense***	**80 kg N ha^{-1}**
Metabolismo de carboidratos e produção de energia	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑↑
Resposta ao estresse	↑↑	↑	↑	-	↑	↑	↑↑	↑
Metabolismo de aminoácidos	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Modificação ou degradação de proteínas	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑
Sistema antioxidante	↑	↑	↑	-	↑	-	↑	↑
Divisão celular	↑	↑	-	-	-	-	-	-
Citoesqueleto	↑	-	-	-	-	-	↑	-
Manutenção da estrutura do DNA	↑	-	↑	-	-	-	-	-
Metilação	↑	-	-	-	-	-	-	-
Tradução	↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑	↑	↑↑↑↑	-
Fotossíntese	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑↑↑
Fotorrespiração	-	↑	-	-	-	-	-	-
Transcrição	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Outros	-	↑	-	↑	↑	-	↑↑	↑
Sinalização de cálcio	-	-	↑	-	-	-	↑	↑
Síntese de clorofila	-	-	-	-	↑	-	↑	-
Hormônio	-	-	-	-	↑	-	↑	-
Parede celular	-	-	-	-	-	↑	-	↑
Transporte	-	-	-	-	-	-	↑	↑
Desconhecido	-	-	-	-	-	-	-	↑

Nota: (-): categoria funcional não detectada como diferencialmente representada. Fonte: Própria autora.

3.4 Discussão

3.4.1 Resposta à fertilização nitrogenada

Os resultados mostram que a fertilização nitrogenada foi o principal fator responsável pelos aumentos na produtividade acumulada de massa seca do capim-marandu em ambos os anos agrícolas. No ano agrícola 1, o tratamento com 80 kg N ha^{-1} apresentou a maior produtividade acumulada (7.943,9 kg ha^{-1}), formando o grupo superior, enquanto no ano agrícola 2 essa superioridade foi ainda mais pronunciada (10.233,6 kg ha^{-1}), diferindo de todos os demais tratamentos. Esse padrão é fisiologicamente esperado, pois o N é componente estrutural do aparato fotossintético (por exemplo, proteínas associadas à Rubisco e ao transporte de elétrons), acelera o perfilhamento e aumenta o acúmulo de biomassa ao ampliar a área foliar e a atividade metabólica. Portanto, em gramíneas tropicais, a resposta produtiva costuma ser consistente quando a disponibilidade de água e outros nutrientes não é limitante (Cassimiro *et al*., 2023; Rodrigues *et al*., 2021).

Entretanto, a magnitude dessa resposta é modulada pela sazonalidade hídrica, que regula tanto a absorção de N (fluxo de massa/difusão no solo) quanto sua assimilação e remobilização no dossel. A análise temporal reforça esse efeito: durante a estação seca, a responsividade ao manejo diminuiu, culminando no corte 9 (estação seca) sem diferenças estatísticas entre os tratamentos, o que é consistente com o princípio de que, sob restrição hídrica, o potencial de resposta ao N diminui porque a planta prioriza manutenção e sobrevivência, reduzindo crescimento e eficiência de uso do fertilizante. Além disso, a literatura sobre Marandu indica que, mesmo quando ocorrem ganhos produtivos com N, perdas por volatilização e/ou menor recuperação pelas plantas podem limitar a eficiência agronômica, especialmente sob condições de manejo e ambiente propensas a perdas, reforçando a importância do parcelamento das aplicações e do momento adequado de fornecimento de N (Cassimiro *et al*., 2023).

Esse comportamento é consistente com a literatura para gramíneas tropicais, na qual o N aumenta a taxa de alongamento foliar, a interceptação luminosa e a atividade fotossintética do dossel, resultando em maior produção de forragem e respostas mais intensas durante períodos de crescimento ativo (Heinrichs *et al*., 2020).

3.4.2 Microrganismos

A inoculação foliar com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), quando aplicada isoladamente, não sustentou incrementos produtivos comparáveis aos tratamentos fertilizados: nos anos agrícolas 1 e 2, o tratamento apenas com inoculação (T5) permaneceu entre as menores produtividades acumuladas de massa seca (5.610,2 e 4.624,8 kg ha^{-1}, respectivamente). Esse comportamento é consistente com o papel típico das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP): elas tendem a intensificar processos fisiológicos (arquitetura radicular, absorção de nutrientes, tolerância a estresses, sinalização hormonal), mas raramente substituem totalmente a necessidade de N mineral em sistemas de alta demanda e alta remoção, como pastagens intensificadas, especialmente quando o objetivo é maximizar o acúmulo de forragem (Castro *et al*., 2025; Leite *et al*., 2018).

A densidade radicular, por exemplo, foi maior no tratamento 40 kg N ha^{-1} + *A. brasilense* (29,8 g dm^{-3}), diferindo do controle e da inoculação isolada, o que sustenta um mecanismo-chave frequentemente atribuído ao gênero *Azospirillum*: o estímulo ao crescimento radicular via produção/indução de fitormônios (como auxinas), aumentando a exploração do solo e a capacidade de adquirir água e nutrientes (Leite *et al*., 2018).

Além disso, estudo recente com *U. brizantha* indicam que estratégias de coinoculação envolvendo *Azospirillum* e *Bacillus* podem aumentar a biomassa e indicadores de eficiência fotossintética, reforçando que os “ganhos microbianos” tendem a aparecer de forma mais clara em variáveis fisiológicas e relacionadas ao vigor, que posteriormente se traduzem em produtividade quando o ambiente (especialmente água e N) permite (Terra *et al*., 2024).

3.4.3 Interação entre microrganismos e eficiência de uso do nitrogênio

A interação entre microrganismos e eficiência de uso do nitrogênio (EUN) no presente estudo torna-se mais clara quando os resultados de ^{15}N e trocas gasosas são interpretados em conjunto. De modo geral, a dose de N foi decisiva para aumentar a quantidade de N derivado do fertilizante absorvida durante períodos de maior crescimento (estação chuvosa). Entretanto, a inoculação tende a atuar como moduladora de processos (arquitetura radicular e desempenho fisiológico) que favorecem melhor captura e uso do N sob suprimento moderado de nutrientes e condições ambientais favoráveis. Esse comportamento é consistente com o papel de BPCP, como *Azospirillum*, que podem intensificar o crescimento radicular e ajustar o metabolismo

vegetal, resultando em maior eficiência agronômica do N, especialmente quando o suprimento do nutriente não é excessivo (Cassán; Diaz-Zorita, 2016; Leite *et al*., 2019; Vacheron *et al*., 2013).

Os dados isotópicos também indicam que, sob restrição hídrica, a contribuição do N do fertilizante para o N da parte aérea tende a diminuir, e a participação do N derivado do solo passa a predominar, reduzindo a magnitude das diferenças entre os tratamentos. Nessas condições, mesmo que a inoculação tenha potencial para melhorar atributos de tolerância e exploração do solo, os efeitos do fertilizante e do microrganismo podem ser "mascarados" pela limitação hídrica, que restringe a absorção, o transporte e a assimilação de N. Assim, a inoculação deve ser interpretada como estratégia complementar, com maior probabilidade de expressar ganhos de eficiência quando há crescimento ativo e sincronia entre suprimento de N e demanda da planta (Galindo *et al*., 2021b, 2024; Heinrichs *et al*., 2020).

Além disso, a maior densidade radicular observada sob a combinação com uma dose moderada de N sugere um mecanismo coerente de eficiência: um sistema radicular mais desenvolvido aumenta o volume de solo explorado, favorece a aquisição de N e água e pode contribuir para melhor desempenho fisiológico, refletido em variáveis como WUEi sob condições específicas. Esse tipo de resposta está alinhado à literatura que mostra que as interações planta–microrganismo e o destino do N no sistema podem ser regulados pela dose de N e pelo ambiente, influenciando a eficiência de recuperação do fertilizante e o particionamento do N no dossel (Terra *et al*., 2024; Thiengo *et al*., 2024c).

*3.4.4 **Proteínas do capim-marandu afetadas pela inoculação com Azospirillum brasilense durante o segundo** corte*

Durante o segundo corte (2024), a inoculação com *A. brasilense* combinada com 40 kg N ha^{-1} induziu um estado regulatório distinto na parte aérea, diferente dos dois tratamentos apenas com N, refletindo reprogramação precoce das prioridades metabólicas após a desfolha. Nessa fase, quando as plantas estão reconstruindo a capacidade fotossintética e metabólica, a assinatura proteômica do tratamento inoculado indica uma estratégia centrada na eficiência metabólica, na estabilização do proteoma e na coordenação C-N, em vez de estimulação direta da capacidade fotossintética ou de biossíntese generalizada.

Em relação às plantas que receberam 40 kg N ha^{-1} sem inoculação, *A. brasilense* + 40 kg N ha^{-1} apresentou enriquecimento consistente de enzimas associadas ao metabolismo central

de C e à produção de energia respiratória, incluindo componentes glicolíticos, enzimas do ciclo de Krebs e o complexo piruvato desidrogenase. Esse perfil indica maior capacidade de geração de ATP e equilíbrio redox, fornecendo a base energética necessária para a rápida reconstrução dos tecidos durante o rebrote inicial (Rodríguez-Vázquez; Mesa-Marín, 2023a). Notavelmente, esse reforço metabólico ocorreu sem enriquecimento concomitante de proteínas fotossintéticas, indicando que o acúmulo de biomassa foi conduzido principalmente pelo uso mais eficiente de C e N disponíveis, e não pelo aumento da fixação de C, em consonância com relatos de que BPCP promovem o crescimento vegetal por meio de melhor integração metabólica e eficiência de uso de nutrientes, em vez de aumentar diretamente a capacidade fotossintética (Andrade *et al*., 2023).

Essa interpretação é fortemente sustentada pelos dados fisiológicos de 2024, nos quais as plantas inoculadas apresentaram maior massa seca da parte aérea (Figura 2) e maior eficiência de recuperação de N do fertilizante (Tabela 6). O enriquecimento concomitante de proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e na integração C-N fornece uma explicação mecanística para essas respostas, indicando que o N derivado do fertilizante foi assimilado de forma mais eficiente e redirecionado ao metabolismo relacionado ao crescimento. Melhorias semelhantes na produção de biomassa e assimilação de nutrientes sob inoculação com BPCP foram relatadas mesmo sob menores aportes de fertilizante mineral (Ikiz; Dasgan; Gruda, 2024), reforçando a ligação entre a reprogramação metabólica induzida por microrganismos e a maior eficiência de uso de N. Em vez de aumentar apenas a absorção total de N, a inoculação parece otimizar a alocação e a utilização interna do N, permitindo maior produção de biomassa por unidade de fertilizante aplicado, em consonância com evidências de que BPCP podem aumentar a aquisição de N e a eficiência de uso interna por meio da modulação da função radicular e do metabolismo vegetal (Navarro; Machado; Figueira, 2025).

Uma característica marcante do proteoma inoculado em 2024 foi o enriquecimento de vias de controle de qualidade proteica e relacionadas ao estresse, incluindo chaperonas moleculares (Hsp70, Hsp90), componentes da protease Clp, prohibitinas e enzimas associadas ao redox. Esse conjunto de proteínas sugere que *A. brasilense* aumenta a capacidade da parte aérea de estabilizar proteínas recém-sintetizadas, prevenir dobramentos incorretos e remover seletivamente proteínas danificadas durante a fase de rebrote energeticamente exigente (Jeran *et al*., 2025). Tal proteção provavelmente reduz os custos metabólicos associados ao turnover proteico e ao estresse celular (Bathe *et al*., 2023), contribuindo indiretamente para maior eficiência de crescimento e recuperação de N.

Em contraste, plantas supridas apenas com 40 kg N ha^{-1} apresentaram maior abundância de proteínas ribossomais, componentes relacionados à fotossíntese e subunidades do proteassoma, indicando uma estratégia mais compensatória e intensiva em recursos. O maior investimento em tradução e maquinaria fotossintética sob o mesmo aporte de N sugere que plantas não inoculadas tentam superar limitações fisiológicas amplificando processos biossintéticos centrais, potencialmente com maior custo energético (Bathe *et al*., 2023). A maior representação de vias generalizadas de degradação proteica reforça ainda mais a ideia de menor estabilidade do proteoma e maiores demandas de manutenção na ausência de inoculação (Ganapathy; Hand; Shabek, 2024).

A comparação com o tratamento de alto N (80 kg N ha^{-1}) destaca ainda mais a especificidade do efeito da inoculação. Enquanto a condição de 80 kg N ha^{-1} promoveu enriquecimento de vias fotossintéticas e biossintéticas típicas de uma estratégia de crescimento de alto insumo, *A. brasilense* + 40 kg N ha^{-1} não convergiu para esse perfil. Em vez disso, as plantas inoculadas mantiveram uma configuração proteômica mais equilibrada, combinando metabolismo energético eficiente com fortes mecanismos regulatórios e protetores. Essa distinção explica por que a inoculação aumentou a eficiência de recuperação de N (Tabela 6) sem simplesmente reproduzir os custos fisiológicos e metabólicos associados ao maior suprimento de N.

As correlações nutricionais observadas em 2024 também se alinham estreitamente aos dados proteômicos. A correlação negativa entre N e P (Figura 3a) sob inoculação é consistente com melhor eficiência de uso de N e demanda alterada dos drenos, na qual o acúmulo de P não aumenta proporcionalmente ao crescimento impulsionado por N, refletindo mudanças na homeostase nutricional e na regulação cruzada entre macro e micronutrientes (Fan *et al*., 2021). Ao mesmo tempo, as correlações positivas entre K e Fe, Ca e Fe, e Zn e Cu (Figura 3a) sugerem regulação coordenada da homeostase de cátions, uma vez que as plantas mantêm redes de micronutrientes fortemente integradas para equilibrar absorção, transporte e utilização (Assunção *et al*., 2022). Esse padrão é mecanicamente sustentado pelo enriquecimento de proteínas envolvidas no equilíbrio redox, na sinalização por cálcio, na organização do citoesqueleto e em respostas ao estresse associadas a metais, indicando maior integração entre estado nutricional e regulação celular em plantas inoculadas (Singh; Gupta; Singh, 2024).

Em conjunto, os dados de 2024 indicam que a inoculação com *A. brasilense* sob suprimento moderado de N estabelece um fenótipo de parte aérea no rebrote inicial caracterizado por maior eficiência metabólica, dinâmica proteômica estabilizada e utilização

otimizada de N. Enquanto plantas não inoculadas dependem de aumentos compensatórios em tradução e fotossíntese e plantas com alto N adotam uma estratégia de alto fluxo de crescimento, as plantas inoculadas alcançam maior biomassa e recuperação de nutrientes por meio de regulação coordenada e redução do desperdício metabólico. Esse estabelecimento precoce de um estado fisiológico orientado à eficiência provavelmente fornece a base para o fenótipo mais orientado à fotossíntese e eficiente no uso da água observado em cortes posteriores.

3.4.5 Proteínas do capim-marandu afetadas pela inoculação com Azospirillum brasilense durante o sétimo corte (2025)

Durante o sétimo corte (2025), a inoculação com *A. brasilense* combinada com 40 kg N ha^{-1} induziu um estado regulatório da parte aérea que diferiu marcadamente dos dois tratamentos apenas com N, refletindo uma mudança na estratégia da planta em relação ao estágio de rebrote anterior. Em contraste com o segundo corte, quando a inoculação reforçou principalmente o metabolismo respiratório e a homeostase proteica, o perfil proteômico de 2025 indica maior ênfase na eficiência fotossintética, no controle da assimilação de C e na otimização do uso da água, consistente com o estado fisiológico mais maduro das plantas.

Quando comparado ao tratamento não inoculado com 40 kg ha^{-1} N, *A. brasilense* + 40 kg ha^{-1} N resultou em enriquecimento de proteínas que sustentam a fixação de C e o processamento subsequente de C, incluindo PEPC, ativadores e proteínas de ligação da RuBisCO, componentes luminais do NDH, proteínas associadas à clorofila e enzimas que conectam o metabolismo de triose-fosfato à biossíntese. Essa configuração proteômica é consistente com uma estrutura mecanística que conecta as reduções observadas na concentração subestomática de CO_2 (Ci), os aumentos na eficiência de carboxilação (CE) e a maior eficiência intrínseca de uso da água (iWUE) (Tabela 8). Em vez de aumentar a abertura estomática ou simplesmente expandir o aparato fotossintético, as plantas inoculadas parecem fortalecer a capacidade bioquímica de fixação de CO_2 e o processamento subsequente de C, permitindo uso mais efetivo do CO_2 internamente disponível para fixação de C. O aumento da eficiência de etapas das reações de C, como atividade da PEPC, ativação da RuBisCO e suporte ao transporte de elétrons, é conhecido por elevar CE e WUEi sem aumentos proporcionais na maquinaria fotossintética (Behera *et al*., 2023; Croce *et al*., 2024). Em consonância com essa estrutura, estudos recentes mostraram que BPCP podem modular atributos de trocas gasosas, dinâmica interna de CO_2 e WUE sob menores aportes de nutrientes, vinculando a inoculação microbiana

a uma regulação fotossintética mais eficiente, em vez de maior condutância estomática *per se* (Liu *et al*., 2025; Piñero *et al*., 2024).

Esse estado fotossinteticamente eficiente é ainda sustentado pelo enriquecimento de enzimas geradoras de ATP e do metabolismo de C, indicando forte acoplamento entre transporte de elétrons, assimilação de C e suprimento de energia, mecanismo demonstrado como capaz de aumentar a produção de ATP e o desempenho fotossintético quando componentes do transporte de elétrons e ATP sintase são regulados positivamente (Nazari *et al*. 2024). Essa coordenação provavelmente sustenta os aumentos na altura de plantas (Tabela 4) e o desempenho geral da parte aérea observado em 2025, uma vez que o ganho sustentado de C torna-se o principal impulsionador do acúmulo de biomassa durante estágios posteriores de rebrote (Smith *et al*., 2023). Importante destacar que esses efeitos ocorrem sem a ampla intensificação respiratória e o turnover metabólico generalizado observados no tratamento não inoculado com 40 kg N ha^{-1}, que apresentou maior representação de enzimas mitocondriais, carreadores ADP/ATP e proteínas associadas à ubiquitina, indicativos de uma estratégia mais orientada à manutenção e energeticamente custosa (Igamberdiev; Bykova, 2023).

Paralelamente, a inoculação intensificou vias relacionadas à estabilidade proteica, ao tamponamento redox e à sinalização regulatória, incluindo chaperonas moleculares, peroxirredoxinas, complexos de prohibitina e proteínas plastidiais associadas a lipídios. Em conjunto, esses componentes estão bem posicionados para preservar a integridade de enzimas fotossintéticas e a função de membranas sob desfolha repetida e estresse sazonal, processos nos quais proteínas plastidiais associadas a lipídios/fibrilinas são cada vez mais reconhecidas como contribuintes centrais para a estabilidade dos plastídios e a resiliência ao estresse (El-Sappah *et al*., 2024). O aparecimento de proteínas associadas a hormônios e sinalização, incluindo componentes ligados a ABA e JA, sugere ainda que a inoculação fortalece a integração em nível de parte aérea entre metabolismo de C, sinalização de estresse e regulação do crescimento, em consonância com evidências de que ABA e JA coordenam o equilíbrio redox dos cloroplastos e respostas fotoprotetoras durante o estresse (Zarbakhsh *et al*., 2026).

Do ponto de vista nutricional, os dados proteômicos são plenamente consistentes com o aumento da contribuição de N derivado do solo para a planta (Tabela 7) observado sob *A. brasilense* + 40 kg N ha^{-1} em 2025. O enriquecimento de enzimas do metabolismo de aminoácidos e de maquinaria translacional direcionada indica que o N absorvido é assimilado de forma eficiente e incorporado a proteínas metabólicas e estruturais, em vez de impulsionar síntese proteica indiscriminada, uma característica de maior eficiência de uso de N e

metabolismo C-N coordenado (Navarro; Machado; Figueira, 2025). Esse uso eficiente de N fornece uma explicação mecanística para a correlação positiva entre N e K (Figura 4a), uma vez que K desempenha papel central na ativação enzimática, regulação osmótica e controle estomático, processos fortemente acoplados ao desempenho fotossintético e à eficiência de uso da água (Cao *et al*., 2025). A correlação negativa concomitante entre N e Fe (Figura 4a) sugere ainda que o crescimento e a assimilação impulsionados por N estão desacoplados de aumentos proporcionais no acúmulo de Fe, provavelmente refletindo efeitos de diluição pelo crescimento e/ou regulação mais rígida da homeostase de Fe sob um regime metabólico orientado à eficiência (Ito *et al*., 2024).

A comparação com o tratamento de alto N (80 kg ha^{-1} N) reforça a conclusão de que *A. brasilense* não reproduz simplesmente um fenótipo de crescimento de alto insumo. A condição de 80 kg N ha^{-1} foi dominada por forte enriquecimento da maquinaria fotossintética central e do ciclo de Calvin, componentes do transporte de elétrons contendo agrupamentos Fe–S e enzimas antioxidantes, refletindo uma estratégia clássica de alto fluxo, na qual o maior suprimento de N aumenta a capacidade fotossintética ao mesmo tempo em que eleva demandas redox e regulatórias, conforme documentado em regimes de alto N que estimulam tanto o desempenho fotossintético quanto a atividade de enzimas antioxidantes (Liu *et al*., 2025). Em contraste, o tratamento inoculado com 40 kg N ha^{-1} enfatizou coordenação regulatória e eficiência funcional, combinando maior ativação da RuBisCO e processamento de C com redes de sinalização, incluindo fatores relacionados a ABA e proteínas regulatórias, que sustentam o controle fino do comportamento estomático e da alocação metabólica, consistente com evidências de que a inoculação com BPCP modula a sinalização hormonal e atributos de relação hídrica, em vez de simplesmente aumentar a capacidade fotossintética (Parastesh; Lajayer; Dell, 2025). Esse fenótipo regulatório e orientado à eficiência fornece uma explicação mecanística para os maiores valores de WUEi e CE observados sob inoculação, em linha com relatos experimentais que mostram que BPCP, incluindo *Azospirillum*, podem melhorar a fotossíntese e o desempenho de trocas gasosas em sistemas de gramíneas sem os custos metabólicos mais amplos associados a altos aportes de N (Habermann *et al*., 2025).

Em conjunto, os dados de 2025 indicam que a inoculação com *A. brasilense* sob suprimento moderado de N estabelece um fenótipo de parte aérea otimizado para assimilação sustentada de C, uso eficiente de N e melhor economia de água, sustentado por robusta proteção do proteoma e integração regulatória. Enquanto o tratamento não inoculado com 40 kg ha^{-1} N depende de atividade metabólica compensatória e o tratamento com 80 kg ha^{-1} N promove

capacidade fotossintética de alto fluxo, as plantas inoculadas adotam uma estratégia centrada em eficiência, coordenação e resiliência. Essa mudança provavelmente reflete os efeitos cumulativos do maior desenvolvimento do sistema radicular (Tabela 4) e da sinalização raiz–parte aérea ao longo de sucessivos cortes, posicionando *A. brasilense* como modulador do desempenho fisiológico de longo prazo, e não como simples substituto do N.

3.5 Conclusão

A fertilização nitrogenada foi o principal fator para o aumento da produtividade do capim-marandu, com 80 kg N ha^{-1} apresentando o melhor desempenho em ambos os anos. Considerando exclusivamente a produtividade de massa seca de forragem a melhor dose foi de 80 kg N ha^{-1}. No entanto, para a diversidade do microbioma a inoculação com *A. brasilense* associado a 40 kg ha^{-1} N é o recomendado.

REFERÊNCIAS

ALMADANIM, M. Cecília *et al.* Rice calcium-dependent protein kinase OsCPK17 targets plasma membrane intrinsic protein and sucrose-phosphate synthase and is required for a proper cold stress response. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 7, p. 1197–1213, jul. 2017.

ANDRADE, Luana Alves de *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agricultural Production. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, 20 abr. 2023.

ASSUNÇÃO, Ana G. L. *et al.* Micronutrient homeostasis in plants for more sustainable agriculture and healthier human nutrition. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 6, p. 1789–1799, 15 mar. 2022.

BARRIE, A.; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. **Mass spectrometry of soils.**, p. 1–46, 1996.

BATHE, Ulschan *et al.* Respiratory energy demands and scope for demand expansion and destruction. **Plant Physiology**, v. 191, n. 4, p. 2093–2103, 1 abr. 2023.

BEHERA, Deeptirekha *et al.* Overexpression of *Setaria italica* phosphoenolpyruvate carboxylase gene in rice positively impacts photosynthesis and agronomic traits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 194, p. 169–181, 1 jan. 2023.

BOKULICH, Nicholas A. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 17 maio 2018.

BOLYEN, Evan *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, ago. 2019.

CALLAHAN, Benjamin J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2016.

CAO, Weiyu *et al.* Progress in the Study of Plant Nitrogen and Potassium Nutrition and Their Interaction Mechanisms. **Horticulturae**, v. 11, n. 8, 6 ago. 2025.

CAPORASO, J. Gregory *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 1 ago. 2012.

CASSÁN, Fabricio; DIAZ-ZORITA, Martín. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 1 dez. 2016.

CASSIMIRO, Juliana Bonfim *et al.* Ammonia Volatilization and Marandu Grass Production in Response to Enhanced-Efficiency Nitrogen Fertilizers. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 837, 13 mar. 2023.

CASTRO, José Wilker Leal *et al. Azospirillum* brasilense associated with nitrogen fertilization in Urochloa humidicola pastures cultivated in the Amazonian savanna. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, v. 26, 13 ago. 2025.

CROCE, Roberta *et al.* Perspectives on improving photosynthesis to increase crop yield. **The Plant Cell**, v. 36, n. 10, p. 3944–3973, 1 out. 2024.

EL-SAPPAH, Ahmed H. *et al.* Fibrillin gene family and its role in plant growth, development, and abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 29 out. 2024.

FAN, Xiaoning *et al.* Cross-Talks Between Macro- and Micronutrient Uptake and Signaling in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 15 out. 2021.

FERREIRA, Eric Batista; CAVALCANTI, Portya Piscitelli; NOGUEIRA, Denismar Alves. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues)**. , 5 out. 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/index.html>. Acesso em: 3 nov. 2025

FREITAS, Gabriela da Silva *et al.* Foliar Spray Inoculation with Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Nitrogen Doses in Megathyrsus maximus cv. BRS Zuri. **Agronomy**, v. 13, n. 4, 30 mar. 2023.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103764, 1 jan. 2021a.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Nitrogen use efficiency and recovery in a wheat-corn rotation under tropical savannah conditions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, n. 3, p. 291–305, 1 abr. 2021b.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Unveiling contribution and fate of nitrogen with 15N techniques affected by microbial co-inoculation on field-grown maize: A novel approach to optimize N-fertilizer use efficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 217, p. 109261, 1 dez. 2024.

GANAPATHY, Jagadeesan; HAND, Katherine A.; SHABEK, Nitzan. Analysis of 26S Proteasome Activity across Arabidopsis Tissues. **Plants**, v. 13, n. 12, 18 jun. 2024.

GUIMARÃES, Gabriel Silva *et al.* Pointing Out Opportunities to Increase Grassland Pastures Productivity via Microbial Inoculants: Attending the Society's Demands for Meat Production with Sustainability. **Agronomy**, v. 12, n. 8, 24 jul. 2022.

HABERMANN, Eduardo *et al.* Inoculation with plant growth-promoting bacteria mitigates the negative impacts of 2 °C warming on the photosynthesis, growth, and nutritional value of a tropical C4 grassland under field conditions. **Science of The Total Environment**, v. 967, p. 178769, 1 mar. 2025.

HEINRICHS, Reges *et al. Azospirillum* inoculation of "Marandu" palisade grass seeds: effects on forage production and nutritional status. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 2, p. 465–478, 6 mar. 2020.

IGAMBERDIEV, Abir U.; BYKOVA, Natalia V. Mitochondria in photosynthetic cells: Coordinating redox control and energy balance. **Plant Physiology**, v. 191, n. 4, p. 2104–2119, 1 abr. 2023.

IKIZ, Boran; DASGAN, Hayriye Yildiz; GRUDA, Nazim S. Utilizing the power of plant growth promoting rhizobacteria on reducing mineral fertilizer, improved yield, and nutritional quality of Batavia lettuce in a floating culture. **Scientific Reports**, v. 14, p. 1616, 18 jan. 2024.

ITO, Momoyo *et al.* IMA peptides regulate root nodulation and nitrogen homeostasis by providing iron according to internal nitrogen status. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 733, 29 jan. 2024.

JERAN, Nicolaj *et al.* Proteostasis and protein quality control in chloroplasts: mechanisms and novel insights related to protein mislocalization. **Journal of Experimental Botany**, v. 76, n. 15, p. 4294–4312, 1 out. 2025.

KASSAMBARA, Alboukadel. **ggcorrplot: Visualization of a Correlation Matrix using "ggplot2"**. , 12 jan. 2016. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ggcorrplot>. Acesso em: 3 nov. 2025

LEITE, Rubson da C. *et al.* Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (Urochloa brizantha) with *Azospirillum* brasilense. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n. 1, p. 61–67, 17 dez. 2018.

LEITE, Rubson da C. *et al.* Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (Urochloa brizantha) with *Azospirillum* brasilense. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n. 1, p. 61, 2019.
LIU, Kewei *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria improve drought tolerance of crops: a review. **Plant Growth Regulation**, v. 105, n. 3, p. 567–581, 1 jun. 2025.

MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

NAVARRO, Bruno B.; MACHADO, Mauricio J.; FIGUEIRA, Antonio. Nitrogen Use Efficiency in Agriculture: Integrating Biotechnology, Microbiology, and Novel Delivery Systems for Sustainable Agriculture. **Plants**, v. 14, n. 19, 24 set. 2025.

PARASTESH, Faezeh; LAJAYER, Behnam Asgari; DELL, Bernard. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Biochar as Drought Defense Tools: A Comprehensive Review of Mechanisms and Future Directions. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 47, n. 12, 11 dez. 2025.

PAULO, Ezio Nalin de *et al.* **Nitrification Inhibitor 3,4-dimethylpyrazole Phosphate Improves Nitrogen Recovery and Accumulation in Cotton Plants by Reducing NO3- Leaching Under 15N-urea Fertilization**. Research Square, , 10 mar. 2021. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-297839/v1>. Acesso em: 14 mar. 2025

PEREZ-RIVEROL, Yasset *et al.* The PRIDE database at 20 years: 2025 update. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D543–D553, 6 jan. 2025.

PIÑERO, María Carmen *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Tools to Improve the Growth of Kohlrabi (Brassica oleracea var. gongylodes) Plants in an Aquaponics System. **Plants**, v. 13, n. 5, 21 fev. 2024.

QUAST, Christian *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 1 jan. 2013.

RODRIGUES, Luan F. *et al.* Canopy characteristics of 'Mavuno' hybrid brachiariagrass and 'Marandu' palisadegrass harvested at different harvest intensities. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 9, n. 3, p. 249–255, 30 set. 2021.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Raquel; MESA-MARÍN, Jennifer. Plant responses to plant growth promoting bacteria: Insights from proteomics. **Journal of Plant Physiology**, v. 287, p. 154031, 1 ago. 2023.

ROSCHER, Christiane *et al.* Adjustment to the light environment in small-statured forbs as a strategy for complementary resource use in mixtures of grassland species. p. 965–979, 2011.

SAKAI, Hidemitsu *et al.* Yield responses to elevated CO2 concentration among Japanese rice cultivars released since 1882. **Plant Production Science**, v. 22, n. 3, p. 352–366, 3 jul. 2019.

SANTOS, H. G. dos *et al*. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 6. ed. *[S.l.]*: Embrapa Solos, 2025.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, Augusto César de. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed.- ed. Viçosa: UFV, 2002.

SINGH, Kratika; GUPTA, Shreya; SINGH, Amar Pal. Review: Nutrient-nutrient interactions governing underground plant adaptation strategies in a heterogeneous environment. **Plant Science**, v. 342, p. 112024, 1 maio 2024.

SMITH, Edward N. *et al.* Improving photosynthetic efficiency toward food security: Strategies, advances, and perspectives. **Molecular Plant**, Special Issue on Climate Change and Food Security: Plant Science Roles. v. 16, n. 10, p. 1547–1563, 2 out. 2023.

TERRA, Lorena Emanuelle da Mata *et al.* Co-Inoculation of *Azospirillum* brasilense and *Bacillus* sp. Enhances Biomass and Photosynthetic Efficiency in Urochloa brizantha. **Agriculture**, v. 14, n. 12, 19 dez. 2024.

THIENGO, Cassio Carlette *et al.* Nitrogen fertilization regulates crosstalk between marandu palisadegrass and *Herbaspirillum seropedicae*: An investigation based on 15N isotopic analysis and root morphology. **Environmental Research**, v. 249, p. 118345, 15 maio 2024.

TRIVELIN, P. C. O. *et al.* Evaluation of a 15N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 226–234, ago. 1994.

VACHERON, Jordan *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 17 set. 2013.

VAN RAIJ, Bernardo. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. *[S.l.]*: International Plant Nutrition Institute, 2011.

ZARBAKHSH, Saeedeh *et al.* Phytohormonal regulation of photosynthesis in response to light stress. **Plant Stress**, v. 19, p. 101169, 1 jan. 2026.

4 INTERAÇÃO ENTRE ADUBAÇÃO NITROGENADA E *BACILLUS* SPP. NA EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE N E DESEMPENHO FISIOLÓGICO DE U*ROCHLOA BRIZANTHA* CV. MARANDU

Resumo

A inoculação com bactérias promotoras de crescimento representa uma estratégia promissora para aumentar a eficiência do uso de nitrogênio (N) em pastagens tropicais. Este estudo avaliou os efeitos da inoculação foliar com *Bacillus* sp. S26 e N72, associada à adubação nitrogenada (0, 40 e 80 kg N ha^{-1}), sobre o crescimento, a eficiência de recuperação do N fertilizante, o estado nutricional, a fotossíntese, o proteoma da parte aérea e o microbioma do solo rizosférico do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu), em dois anos agrícolas sob condições de campo. A inoculação com Bacillus sp. N72 associada a 40 kg N ha^{-1} aumentou a eficiência de recuperação do nitrogênio, a fotossíntese e o desempenho fisiológico das plantas, com resultados semelhantes ou superiores aos da maior dose de N em determinadas avaliações. A proteômica evidenciou alterações no metabolismo energético, na resposta ao estresse e no suporte fotossintético, enquanto a análise do microbioma demonstrou mudanças na composição da comunidade bacteriana, favorecendo grupos associados à ciclagem de nutrientes e à promoção do crescimento vegetal. Em conjunto, os resultados indicam que Bacillus sp. N72 é uma estratégia promissora para aumentar a eficiência do uso do N e reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados nas condições estudadas.

Palavras – chave: Fixação biológica de nitrogênio, bioinsumos, proteômica, microbioma bacteriano, metabolismo vegetal.

4.1 Introdução

O crescimento populacional exige maior produção de alimentos, mas a expansão de novas áreas de cultivo está próxima ao seu limite e a degradação do solo é preocupante. De acordo com projeções da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) em parceria com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), o consumo global de carne deve apresentar crescimento significativo na próxima década, estimando-se aumento total de 47,9 milhões de toneladas. Além disso, o consumo anual per capita está projetado para crescer, em média, 0,9 kg por pessoa ao ano, considerando o peso de varejo comestível (OECD; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022).

Segundo dados do Atlas de Pastagens publicado pelo Laboratório de Processamento de Imagens e Geoprocessamento (LAPIG) da Universidade Federal de Goiás (UFG), a área ocupada por pastagens representa 20,87% do território brasileiro, atingindo 177 milhões de hectares. A baixa disponibilidade e aproveitamento de nutrientes e a redução da matéria

orgânica impactam a produção forrageira e favorecem a infestação de plantas daninhas, acelerando o processo de degradação da pastagem e do solo (Teles *et al*., 2025).

Embora essencial ao desenvolvimento das gramíneas, o nitrogênio (N) apresenta curta permanência no solo e alto custo de aplicação, especialmente em regiões tropicais (Branco; Júnior, 2022). No entanto, o aproveitamento do N-fertilizante é baixo. Estima-se que, aproximadamente, 50% do N aplicado é perdido por volatilização ou lixiviação, contribuindo para impactos ambientais como acidificação do solo e eutrofização da água (Galindo *et al*., 2022).

Dentre os principais mecanismos de perda de nitrogênio em sistemas tropicais, destacam-se a volatilização da amônia, favorecida por altas temperaturas, pH elevado e ausência de incorporação da ureia ao solo; a lixiviação do nitrato em solos arenosos sob chuvas intensas; e a desnitrificação em condições anaeróbias, como em solos encharcados ou compactados, resultando na emissão de gases como N_2 e N_2O. Além disso, a imobilização microbiana reduz temporariamente a disponibilidade de N quando há resíduos orgânicos com alta relação C/N. Essas perdas podem comprometer a eficiência agronômica e ambiental do nitrogênio, demandando o uso de estratégias mitigadoras como fertilizantes estabilizados e inibidores de urease e nitrificação (Sarkis *et al*., 2023).

A ureia, principal fertilizante nitrogenado, representa 60% do mercado brasileiro. Possui alta concentração de N e baixo custo, mas apresenta elevadas perdas por volatilização quando aplicada na superfície sem incorporação (Cantarella *et al*., 2018b). Para aumentar a eficiência do N-fertilizante, em especial da ureia, a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal pode ser uma estratégia viável. Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem promover o crescimento radicular, aumentando a absorção de nutrientes e produzindo fitohormônios (Heinrichs *et al*., 2020).

A inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas, como *Bacillus* sp., tem se mostrado uma alternativa eficaz para melhorar o desempenho agronômico de gramíneas forrageiras, especialmente em condições tropicais com alta demanda por nitrogênio. Em Marandu, a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* proporcionou contribuição de N fixado de até 21,5% no tratamento sem N mineral e aumento de até 32% na massa seca da parte aérea, além de melhorias na morfologia radicular e maior exploração do solo (Thiengo *et al*., 2024b). Esses resultados indicaram que o uso de BPCP pode contribuir substancialmente para a sustentabilidade das pastagens tropicais, otimizando o uso de fertilizantes e melhorando a qualidade da forragem, especialmente em sistemas com restrições econômicas ou ambientais.

A associação de BPCP e doses N pode otimizar a eficiência de uso e aumentar a recuperação do N-fertilizante aplicado, otimizando o manejo sustentável de N em sistemas de produção de pastagens em solo arenoso. A hipótese do presente estudo é que a inoculação com *Bacillus* sp. estirpes S26 e N72 associadas a doses de fertilizante nitrogenado melhoram a eficiência de uso e recuperação do N aplicado, beneficiando os parâmetros morfológicos relacionados a nutrição, refletindo em maior crescimento vegetativo da *Urochloa brizantha* cv. Marandu.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi conduzido em condições de campo, em área de formação de pastagem de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, cultivado anteriormente com *U. decumbens* cv. Basilisk sem manejo, durante os anos agrícolas 2023/2024 e 2024/2025, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP, Campus de Dracena (21º 27’ S, 51º 36’ O; 421 m). O solo da área foi classificado como Argissolo Vermelho Amarelo distrófico, com textura arenosa (Santos *et al*., 2025). Os atributos químicos na camada de 0-0,20 m são apresentados na Tabela 1. Após a análise inicial, foram aplicadas uniformemente 1 t ha^{-1} de calcário dolomítico para correção da acidez do solo, a fim de elevar V a 70%. Em meados de novembro de 2023 foi realizada a semeadura da *Urochloa brizantha* cv. Marandu, reconhecida pela alta produtividade de massa seca, e foram aplicados 8 kg de N, 60 kg de P_2O_5 e 20 kg de K2O por hectare para o estabelecimento da forrageira, com densidade de semeadura de 10 kg ha^{-1} de sementes puras e viáveis. Todas as análises laboratoriais seguiram os protocolos descritos por (Van Raij, 2011).

Tabela 1 - Atributos químicos e físicos do solo na instalação do experimento coletado na camada de 0-20 cm, Dracena - SP

pH	M.O	P	K	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al	H +Al	SB	CTC	V	m
$CaCl_2$	mg/dm^3		----------$mmol_c/dm^3$----------							---% ---	
4,6	12	1,0	1,7	8,5	1,7	2,0	21,0	12	33	36	14

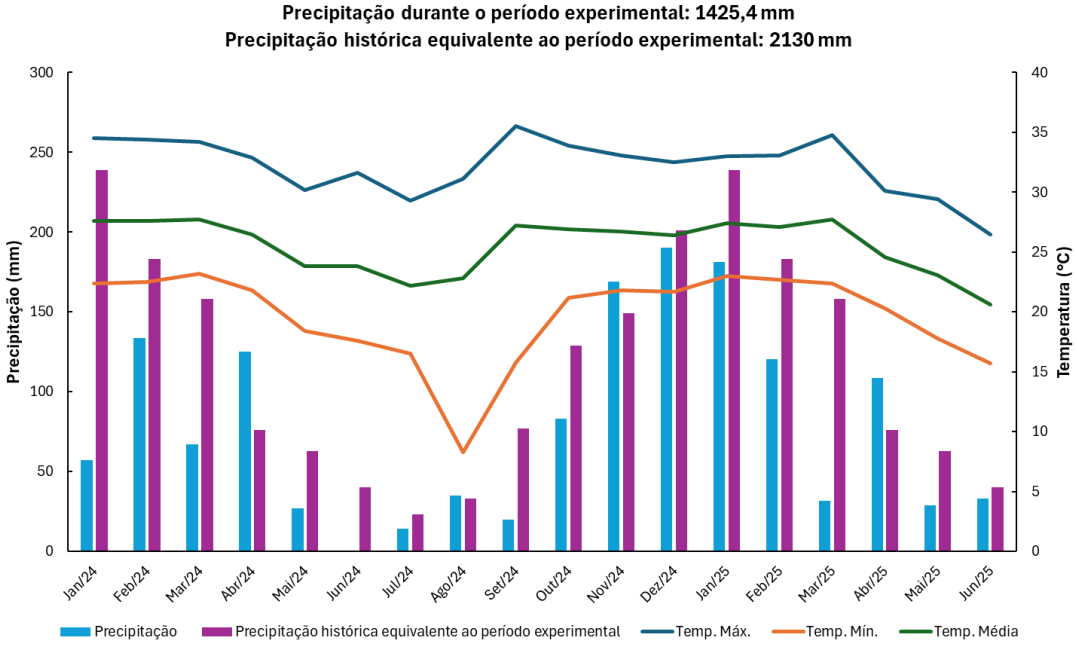
Cu	Fe	Mn	S	Zn	B	Areia	Argila	Silte
		mg/dm^3					g/kg	
1,6	25,1	30,5	2,6	0,7	0,48	859	90	51

Nota: pH ($CaCl_2$) (0,01 mol L^{-1}) na relação solo: solução de 1:2,5; H+Al foi determinado pelo método Shoemaker–McLean–Pratt (SMP); P, Ca^{2+}, Mg^{2+} e K^+: extração por resina trocadora de íons; MO: teor de matéria orgânica do solo (Walkley-Black); S–SO_4^{2-}: extração com $Ca(H_2PO_4)_2$ 0,01 mol L^{-1}; B: ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 0,125%) foi extraído com água quente; Cu, Fe, Mn e Zn: extração com DTPA; soma de bases (SB): $Ca^{2+} + Mg^{2+} + K^+$; CTC: capacidade de troca de cátions a pH 7 (SB + H+Al); V% (saturação por bases): [(SB/CTC) × 100]; e distribuição granulométrica (areia, silte e argila) pelo método do densímetro. Fonte: Própria autora.

4.2.2 Condições climáticas

A região possui clima tropical úmido (Aw; classificação de Köppen), com verão chuvoso e inverno seco. A precipitação acumulada e a temperatura média anual foram de 922 mm/26°C no ano agrícola 1 (2023/24), e 503 mm/25°C no ano agrícola 2 (2024/25) sendo que as temperaturas mínimas e máximas foram de 19°C e 33°C, respectivamente. Os dados meteorológicos foram obtidos de uma estação automatizada no centro de climatologia da UNESP/FCATem Dracena (Figura 1).

Figura 1 - Precipitação pluvial mensal e médias históricas, e temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período experimental. Dracena, SP, 2024/2025. Dados obtidos da estação meteorológica da UNESP/FCAT – Dracena.



Fonte: Própria autora.

4.2.3 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições e 7 tratamentos (controle sem adubação e sem inoculação, 80 kg N ha^{-1}, 40 kg N ha^{-1} sem e com inoculação e sem adubação com aplicação das estirpes), totalizando 28 unidades experimentais. Cada parcela media 4,0 m comprimento e 3,0 m de largura, totalizando 12 m^2. A fonte de N foi ureia natural (45% N), sendo que as doses de 40 e 80 kg N ha^{-1} foram parceladas em duas aplicações iguais, totalizando quatro aplicações durante os dois anos agrícolas (dez/2023, jan/2024, dez/2024 e jan/2025).

O estudo abrangeu nove cortes: fev/2024, abr/2024, mai/2024, out/2024, dez/2024, jan/2025, fev/2025, abr/2025 e mai/2025. Para determinar a origem do N (solo e fertilizante) e a absorção pelas plantas, aplicou-se a técnica de diluição isotópica com ^{15}N. Assim, foram utilizadas ureia marcada com ^{15}N (1,19% de excesso de átomos de ^{15}N) e ureia não marcada (controle isotópico). Todas as unidades experimentais receberam a ureia marcada e a ureia natural. O isótopo ^{15}N foi aplicado em uma microparcela de 0,5 m x 1,0 m demarcada com estacas de madeira, após primeiro corte (fev/2024), dentro da área útil da parcela experimental. No quinto corte (dez/2024) foi realizado aplicação a lanço de 60 kg P_2O_5 ha^{-1} na forma de superfosfato simples (18%) e 40 kg K_2O ha^{-1} na forma de cloreto de potássio (60%), logo após o corte de padronização do capim para início da condução do segundo ano experimental.

4.2.4 Produto aplicado

Os *Bacillus* sp. S26 e N72 utilizadas neste estudo foram isoladas no Laboratório da Universidade do Vale do Taquari (Univates), localizada em Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil (Debastiani *et al*., 2023). Os microrganismos foram cultivados em nutriente Agar e mantidos sob condições controladas a 20 °C. As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente KASVI (Kasvi®, Paraná, Brasil, código K12-500), preparado conforme instruções do fabricante (5,0 g L^{-1} de peptona, 3,0 g L^{-1} de extrato de carne, 5,0 g L^{-1} de NaCl, pH final 7,2 ± 0,2). O meio foi esterilizado por autoclavação (121 °C, 15 min) e inoculado com as cepas bacterianas previamente isoladas. As culturas foram incubadas sob agitação (120 rpm) a 28 °C por 24 h. As doses da solução com bactérias para aplicação foliar foram de 400 mL ha^{-1}. A concentração mínima, das duas bactérias avaliadas, foi de 2 x 10^8 UFC mL^{-1}. O volume de calda para aplicação foi de 200 L ha^{-1}. As aplicações foram realizadas dez dias após o corte de

uniformização e do primeiro corte (jan/2024 e mar/2024, respectivamente) sob condições amenas de temperatura no final do dia. Para o segundo ano de avaliações, seguiu-se a mesma metodologia e foram aplicadas em dez/2024. Para o segundo ano de avaliações, seguiu-se a mesma metodologia e foram aplicadas em dez/2024 e jan/2025. A aplicação dos tratamentos foi realizada com pulverizador costal elétrico, utilizando pressão constante e volume de calda de 200 L ha^{-1}.

4.2.5 Amostragem de plantas e concentração de nutrientes

Antes de cada corte, a altura das plantas foi medida com uma régua milimetrada. Foram realizados nove cortes durante as estações seca e chuvosa para determinar a massa seca da planta quando as parcelas atingiram parcialmente a altura de 40 cm e quando os brotos foram colhidos a 20 cm acima da superfície do solo. As amostras para estimativa da massa seca da parte aérea foram coletadas com um quadrado amostrador de área de 0,5 m^2, e para o corte das plantas internas foi utilizada uma ceifadeira. Após a colheita, o material vegetal foi pesado. Uma amostra de aproximadamente 200 g das frações da lâmina foliar foi separada, e o colmo + bainha foram identificados, pesados e secos em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 65°C até peso constante (Silva; Queiroz, 2002b). O material seco foi pesado em balança de precisão para quantificar o rendimento de massa seca da forragem, e as amostras foram moídas em um micro-moinho tipo Wiley R-TE-648 através de uma peneira de 1 mm. O teor de N total foi determinado pela digestão sulfúrica seguido por destilação pelo Método semi-micro Kjeldahl. As concentrações dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Zn, Fe, Mn e Cu) foram determinadas de acordo com (Malavolta, 1997). O acúmulo de nutrientes na forragem foi calculado multiplicando a concentração pela quantidade de massa seca produzida nos períodos das águas (abr/2024, fev/2025) e nos períodos das secas (out/2024, mai/2025).

4.2.6 Quantificação do N fixado e proveniente do fertilizante e do solo

A colheita do material vegetal para determinação do isótopo ^{15}N foram realizadas na parte aérea da forragem cortada a 20 cm da superfície do solo, nos cortes 2, 4, 7 e 9, com um quadro amostrador de 25 cm de largura e 50 cm de comprimento, utilizou uma foice de arroz para fazer o corte. Amostras secas da parte aérea foram finamente moídas e passadas por peneira

de 2 mm, acondicionadas em cápsulas de estanho e pesadas em balança analítica ultrassensível, com precisão de cinco casas decimais. Um espectrômetro de massas acoplado a um analisador elementar de N foi utilizado para a análise de ^{15}N (*Isotope Ratio Mass Spectrometry* — IRMS, modelo HYDRA 20-20 ANCA–GLS, Sercon, Cheshire, Reino Unido) (Barrie; Prosser, 1996). Uma amostra controle, com variação natural do isótopo estável ^{15}N (0,366%), foi utilizada a cada dez amostras analisadas, para controle de qualidade. Assim, a quantidade de ^{15}N acumulada pela *Urochloa brizantha* cv. Marandu e o enriquecimento obtido (biomassa da parte aérea, em kg ha^{-1}) foram calculados considerando-se a abundância isotópica do material marcado (ureia-^{15}N) e a variação natural do isótopo estável ^{15}N (0,3663% de átomos de ^{15}N: 99,6637% de átomos de ^{14}N) (International Atomic Energy Agency – IAEA, 2001). A partição de N na parte aérea das plantas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu foi calculada seguindo a sequência de procedimentos proposta por (Galindo *et al*., 2021a; Paulo *et al*., 2021; Trivelin *et al*., 1994):

a) Nitrogênio acumulado: AN (kg ha^{-1}):

$$AN = (N \times MSPA) \quad (1)$$

em que *N* é a concentração de nitrogênio no tecido (kg ha^{-1}) e MSPA é a massa seca da parte aérea (kg ha^{-1}).

b) Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Fertilizante (NPFF):

As porcentagens de átomos de ^{15}N em excesso na planta e no fertilizante foram obtidas utilizando a Equação (2), baseada no princípio da diluição isotópica, para o cálculo de %Ndff.

$$\%\, NPFF = \left(\frac{\%\ de\ átomos\ de\ ^{15}N\ em\ excesso\ na\ planta}{\%\ de\ átomos\ de\ ^{15}N\ em\ excesso\ no\ fertilizante} \right) \times 100 \quad (2)$$

em que % de átomos de ^{15}N em excesso na planta corresponde ao percentual de átomos de ^{15}N na planta menos a abundância natural de ^{15}N (0,3663%), e % de átomos de ^{15}N em excesso no fertilizante corresponde ao percentual de átomos de ^{15}N no fertilizante menos a abundância natural de ^{15}N (0,3663%).

c) Quantidade de N derivado do fertilizante (QNPFF, kg ha^{-1}):

$$QNPFF = (\%\, NPFF \times AN) \div 100\text{Ndff} \quad (3)$$

em que *AN* é o nitrogênio acumulado (kg ha^{-1}) e %NPFF é a porcentagem de N na planta derivado do fertilizante.

d) Quantidade de N derivado do solo (material orgânico remanescente e outros) (QNPFS, kg ha^{-1}):

$$QNPFS = AN - QNPFF \quad (4)$$

em que *AN* é o nitrogênio acumulado (kg ha^{-1}) e *QNPFF* é a quantidade de N na planta derivado do fertilizante (kg ha^{-1}).

e) Porcentagem de nitrogênio derivado do solo (material orgânico remanescente e outros) (%NPFS):

$$\%\, NPFS = (QNPFS \div AN) \times 100 \quad (5)$$

em que *AN* é o nitrogênio acumulado (kg ha^{-1}) e *QNPFS* é a quantidade de N na planta derivado do solo (material orgânico remanescente e outros).

f) Recuperação de nitrogênio (NRFF%) do fertilizante associada ou não a *Azospirillum brasilense, Bacillus* sp. estirpes S26 e N72:

$$\%\, NRFF = (QNPFF \div DOSE) \times 100 \quad (6)$$

em que *QNPFF* é a quantidade de nitrogênio na planta derivado do fertilizante (kg ha^{-1}) e *DOSE* é a quantidade de nitrogênio aplicada como fertilizante marcado (kg ha^{-1}).

4.2.7 Capacidade fotossintética

As avaliações das trocas gasosas nas folhas consistiram de análises não destrutivas, usando um analisador de gás infravermelho (LI-6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE, EUA) sob uma densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de 1.800 μmol m^{-2} s^{-1} e concentração de CO_2 no ar de 380 μmol mol^{-1}, a uma temperatura foliar entre 21 e 25ºC, de acordo com (Sakai *et al*., 2019). As medidas coletadas foram: taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (*A* - μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), transpiração (*E* - μmol H_2O m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (*g*s - mol H_2O m^{-2} s^{-1}), concentração interna de CO_2 na câmara subestomática (*Ci* - μmol mol^{-1}) e eficiência do uso da água istantânea e intrínseca (*WUEt* e *WUEi* - mmol CO_2 mol^{-1} H_2O). Foram realizadas duas leituras por parcela, usando a terceira folha recém expandida.

4.2.8 Análise Proteômica

As análises de proteômica diferencial foram realizadas em tecidos da parte aérea de plantas de capim-marandu submetidas à inoculação foliar com *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1}, em comparação com plantas tratadas com diferentes doses de N mineral, 40 e 80 kg N ha^{-1}, sem inoculação bacteriana. As proteínas diferencialmente abundantes foram avaliadas após o tratamento de inoculação foliar, aproximadamente 30 dias após a aplicação. Três amostras de tecido vegetal de cada tratamento avaliado, cada uma contendo aproximadamente 250 mg de massa fresca, foram submetidas à extração proteica utilizando o Total Plant Protein Extraction Kit (Sigma-Aldrich). As concentrações de proteínas foram determinadas pelo ensaio BCA, utilizando albumina sérica bovina como padrão (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Os extratos proteicos de cada tratamento foram digeridos com tripsina e preparados para posterior análise proteômica por espectrometria de massas (LC–MS/MS), conforme da (Da Paschoa *et al.*, 2026), utilizando bancos de dados específicos para Poaceae provenientes do NCBI Reference Sequence Database (RefSeq).

O software PatternLab foi utilizado para identificar proteínas diferencialmente abundantes ou exclusivas de cada condição avaliada. As comparações pareadas entre as condições foram realizadas utilizando dados de contagem espectral em uma versão atualizada do módulo TFold do PatternLab. A seleção e filtragem das proteínas foram baseadas nos seguintes critérios: proteínas não detectadas nas três corridas por tratamento foram excluídas; foram aplicados um limiar de q-value de 0,05 e F-stringency de 0,01. Proteínas de baixa abundância que apresentaram baixos valores de p e alteração significativa de fold change, mas baixas contagens espectrais, foram removidas utilizando L-stringency de 0,4. Além disso, um fold change absoluto superior a 2 foi utilizado para definir proteínas diferencialmente abundantes (DAPs). Os dados de proteômica por espectrometria de massas foram depositados no ProteomeXchange Consortium por meio do repositório parceiro PRIDE (Perez-Riverol *et al.*, 2025), com o identificador do conjunto de dados PXD073460.

4.2.9 Microbioma do solo

O solo aderido às raízes do capim marandu foi coletado e mantido a -80°C até o início dos procedimentos moleculares. Comunidades procarióticas foram avaliadas em: solo rizosférico de capim Marandu não inoculado e inoculado com as estirpes bacterianas. O DNA

genômico total foi extraído a partir de 200 mg de solo rizosférico usando o PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, EUA). Uma PCR inicial foi realizada com os primers 341F e 806R (CAPORASO *et al*., 2012), que amplificam a região V3-V4 do gene 16S rRNA. Os produtos de PCR foram sequenciados usando o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após o sequenciamento, as leituras brutas (formato fastq) foram processadas e analisadas usando o pacote Quantitative Insights into Microbial Ecology QIIME2 (Bolyen *et al*., 2019) versão 2020.8 e seus plugins. O plug-in DADA2 (Callahan *et al*., 2016) foi usado para cortar sequências, remover quimeras (método de consenso) e agrupá-las em sequências representativas chamadas variantes de sequência de amplicon (ASVs). A taxonomia foi atribuída aos ASVs usando um plug-in classificador de recursos q2 (Bokulich *et al*., 2018) contra a sequência de referência Silva138 99% OTUs (QUAST *et al*., 2013). Análises downstream foram realizadas em R v4.0 (R Core Team, 2023) com Phyloseq (McMurdie; Holmes, 2013) e pacotes Vegan (Oksanen *et al*., 2026). A cobertura do sequenciamento foi avaliada por análise de rarefação.

4.2.10 Densidade de raiz

Foi avaliado a densidade de raízes do sistema radicular ao final do segundo ano agrícola. A profundidade de amostragem foi de 0 – 20 cm por meio da coleta do solo + raízes com trado holandês. Após, as raízes foram lavadas sobre uma peneira para remoção do solo e secas a 65ºC até peso constante. Os dados foram expressos em g dm^{-3}.

4.2.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R, versão 4.3.1 (R Core Team, 2023). Os dados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial, considerando os efeitos principais dos fatores avaliados e sua interação. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram testados usando Shapiro–Wilk e O'Neill–Mathews, respectivamente. O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$; pacote ExpDes.pt) foi utilizado para agrupar as médias dos tratamentos (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2021). A análise discriminante canônica (ADC) para avaliar a separação multivariada dos tratamentos com base no conjunto de variáveis avaliadas. Antes da análise, as variáveis foram padronizadas, a fim de minimizar o efeito das diferenças de escala e unidade de medida entre os atributos. A significância

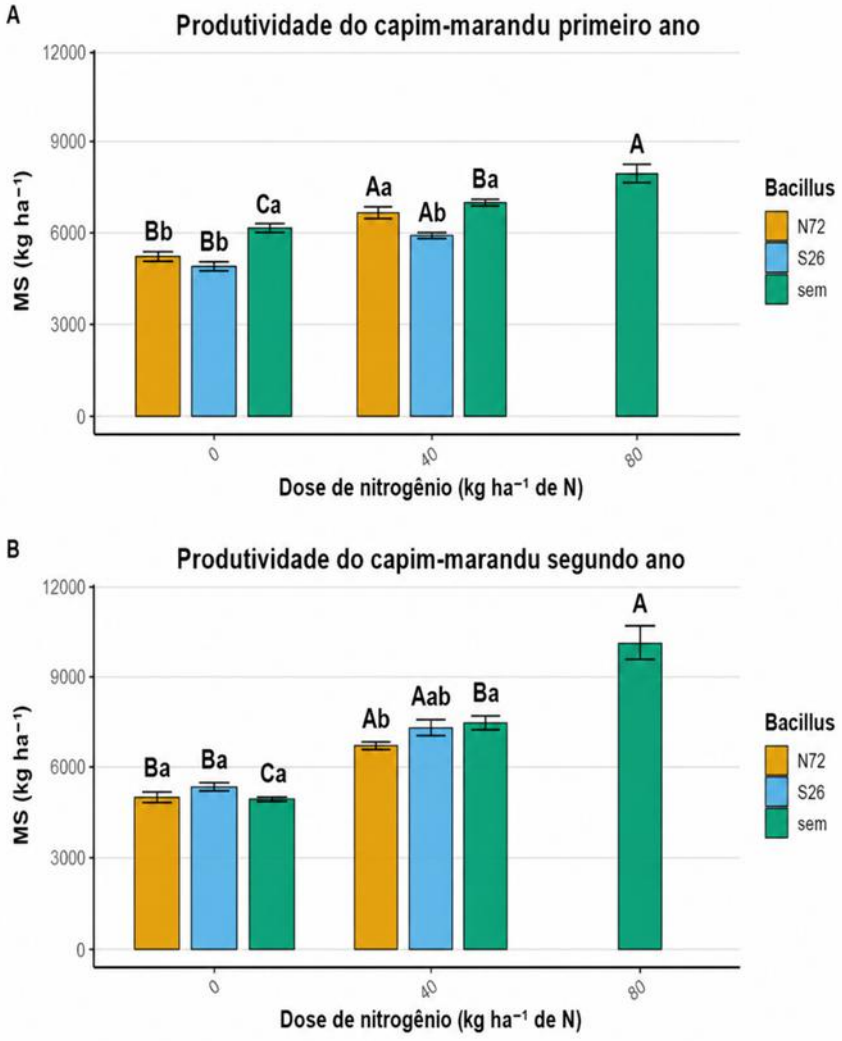
multivariada dos tratamentos foi verificada por meio de análise multivariada de variância (MANOVA), utilizando o traço de Pillai como critério estatístico. Em seguida, foram obtidos os escores canônicos, os coeficientes de estrutura e os biplots canônicos, permitindo identificar as variáveis com maior contribuição para a discriminação entre os tratamentos. A ADC foi conduzida com auxílio dos pacotes car e candisc.

4.3 Resultados

4.3.1 Produtividade de massa seca

A produtividade acumulada de massa seca do capim-marandu apresentou maior resposta à adubação nitrogenada mineral do que à inoculação foliar com *Bacillus* spp (Figura 2). Em ambos os anos agrícolas, o tratamento sem inoculação associado à dose de 80 kg ha^{-1} N resultou nas maiores produtividades, evidenciando o efeito positivo da maior disponibilidade de N sobre o acúmulo de biomassa. No primeiro ano, na ausência de N, o tratamento sem inoculação superou os tratamentos inoculados com S26 e N72, enquanto, na dose de 40 kg ha^{-1} N, N72 e o tratamento sem inoculação apresentaram desempenho superior ao S26. No segundo ano, a aplicação de 40 kg ha^{-1} N elevou a produtividade em relação à ausência de adubação, independentemente da condição de inoculação, porém o tratamento sem inoculação apresentou desempenho igual ou superior aos inoculados.

Figura 2 - Produtividade acumulada de massa seca (MS) do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no primeiro ano agrícola (2023/2024) (A) segundo ano agrícola (2024/2025) (B) — sob doses de nitrogênio mineral e inoculação foliar com *Bacillus* spp. estirpes S26 e N72. Tratamentos: sem inoculação e sem N; sem inoculação + 40 kg N ha⁻¹; sem inoculação + 80 kg N ha⁻¹; S26 sem N; S26 + 40 kg N ha⁻¹; N72 sem N; e N72 + 40 kg N ha⁻¹. Barras representam as médias e linhas verticais indicam o erro padrão da média. Letras maiúsculas comparam as doses de N dentro de cada condição de inoculação, enquanto letras minúsculas comparam as condições de inoculação dentro de cada dose de N, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



Fonte: Própria autora.

4.3.2 Análise temporal da produtividade e massa seca raiz

A produtividade acumulada de massa seca do capim-marandu foi influenciada pela interação entre inoculação e doses de nitrogênio nos dois anos agrícolas (Tabela 2). No ano agrícola 1, na ausência de adubação nitrogenada, o tratamento sem inoculação apresentou maior produtividade que os tratamentos inoculados com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, os quais

não diferiram entre si. Na dose de 40 kg N ha^{-1}, os tratamentos sem inoculação e inoculado com N72 apresentaram as maiores produtividades, enquanto S26 resultou em menor acúmulo de massa seca. Dentro de cada condição de inoculação, a aplicação de 40 kg N ha^{-1} aumentou significativamente a produtividade em relação à ausência de N.

No ano agrícola 2, na ausência de N, não houve diferença entre os tratamentos sem inoculação, S26 e N72. Entretanto, na dose de 40 kg N ha^{-1}, os tratamentos sem inoculação e inoculado com S26 apresentaram maior produtividade que N72. Assim como observado no primeiro ano, a aplicação de 40 kg N ha^{-1} aumentou significativamente a produtividade acumulada de massa seca em todas as condições de inoculação.

Tabela 2 - Produtividade acumulada de massa seca do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, nos anos agrícolas 1 e 2, sob ausência de inoculação ou inoculação com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1}

Tratamento	Ano agrícola 1 Fevereiro a Dezembro/2024		Ano agrícola 2 Janeiro a Maio/2025	
	kg ha^{-1}			
F1/F2	0	40	0	40
sem	6166,93 Ab	6998,69 Aa	4939,76 Ab	7476,20 Aa
S26	4921,67 Bb	5907,40 Ba	5333,21 Ab	7311,08 Aa
N72	5234,76 Bb	6656,68 Aa	4941,55 Ab	6711,15 Ba
C.V. (%)	5,01		4,53	

Nota: F1 = inoculação (sem inoculação, *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72); F2 = doses de nitrogênio (0 e 40 kg N ha^{-1}). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna, dentro de cada ano agrícola e dose de N, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na linha, dentro de cada ano agrícola e condição de inoculação, diferem entre as doses de N pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Ano agrícola 1 compreende os cortes 1, 2, 3, 4 e 5; ano agrícola 2 compreende os cortes 6, 7, 8 e 9. C.V. = coeficiente de variação. Fonte: Própria autora.

A densidade de raízes do capim-marandu, avaliada em maio de 2025, apresentou diferença entre as condições de inoculação apenas na ausência de adubação nitrogenada (Tabela 3). Na dose de 0 kg N ha^{-1}, o tratamento inoculado com *Bacillus* sp. N72 apresentou maior densidade radicular que o tratamento sem inoculação, enquanto S26 apresentou comportamento intermediário, não diferindo estatisticamente dos demais. Esse resultado sugere que N72 favoreceu a densidade de raízes em condição de ausência de N mineral.

Tabela 3 - Densidade de raízes do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, avaliada em maio de 2025, sob ausência de inoculação ou inoculação com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1}.

Tratamento	Maio/2025	
	g dm^{-3}	
F1/F2	0	40
sem	20,35 Ba	26,30 Aa
S26	25,89 ABa	23,36 Aa
N72	29,88 Aa	30,35 Aa
C.V. (%)	19,82	

Nota: F1 = inoculação (sem inoculação, *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72); F2 = doses de nitrogênio (0 e 40 kg N ha^{-1}). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na linha diferem entre as doses de N pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). Maio de 2025 refere-se ao corte 9. C.V. = coeficiente de variação. Raízes coletadas na camada de 0-20 cm. Fonte: Própria autora.

4.3.3 Altura de plantas

A altura do capim-marandu não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos no primeiro ano agrícola (2023/2024), tanto no período das águas quanto no período da seca (Tabela 4). No segundo ano agrícola (2024/2025), foram observadas diferenças pontuais apenas no período das águas. Na primeira avaliação, sob 0 kg N ha^{-1}, o tratamento com N72 apresentou menor altura que os tratamentos sem inoculação e com S26. Na segunda avaliação, também sob ausência de N, S26 apresentou maior altura que os demais tratamentos. Contudo, na dose de 40 kg N ha^{-1}, não houve diferença entre as condições de inoculação. Além disso, não houve diferença entre as doses de N dentro de cada condição de inoculação.

Tabela 4 - Altura do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, nos períodos de 2024 e 2025, sob ausência de inoculação ou inoculação com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1}

Ano Agrícola 1										
Tratamento	Período das Águas						Período da Seca			
	cm									
F1/F2	0	40	0	40	0	40	0	40	0	40
sem.0	49,20	50,90	56,33	54,07	43,60	43,70	37,10	33,80	46,50	47,75
S26.0	53,20	47,30	55,33	53,00	44,60	43,70	35,05	37,80	46,55	48,95
N72.0	46,70	50,65	55,60	54,87	42,65	43,00	37,20	35,85	46,10	48,70
C.V. (%)	12,02		6,79		3,34		7,63		10,14	

Ano Agrícola 2								
Tratamento	Período das Águas						Período da Seca	
	cm							
F1/F2	0	40	0	40	0	40	0	40
sem.0	39,35 Aa	45,00 Aa	66,07 Ba	75,33 Aa	39,10	40,55	49,95	50,80
S26.0	38,55 Aa	42,85 Aa	66,87 Aa	82,00 Aa	37,70	38,75	47,45	48,70
N72.0	39,05 Ba	42,40 Aa	66,20 Ba	73,53 Aa	40,10	39,50	49,35	48,80
C.V. (%)	11,63		10,13		5,78		10,56	

Nota: F1 = inoculação (sem inoculação, *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72); F2 = doses de nitrogênio (0 e 40 kg N ha^{-1}). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna e letras minúsculas diferentes na linha, dentro de cada avaliação, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Em ano agrícola 1, o período das águas compreende os cortes 1, 2 e 3, e o período da seca os cortes 4 e 5. Em ano agrícola 2, o período das águas compreende os cortes 6, 7 e 8, e o período da seca o corte 9. C.V. = coeficiente de variação. Fonte: Própria autora.

4.3.4 Lâmina foliar

A razão lâmina foliar/colmo e a porcentagem de lâmina foliar não diferiram entre os tratamentos no período das águas de 2024 (Tabela 5). Na seca de 2024, houve diferença para LF/CM: sem N, o tratamento sem inoculação apresentou maior valor que S26, enquanto N72 foi intermediário; com 40 kg N ha^{-1}, S26 apresentou maior LF/CM que os demais tratamentos. Para % LF, não houve diferença significativa em 2024.

Em 2025, no período das águas, sob ausência de N, o tratamento sem inoculação apresentou maior LF/CM e % LF que N72, com S26 em posição intermediária. Com 40 kg N ha^{-1}, não houve diferença entre as condições de inoculação. Na seca de 2025, sob ausência de N, N72 apresentou maior LF/CM e % LF que o tratamento sem inoculação, enquanto S26 manteve comportamento intermediário. Com 40 kg N ha^{-1}, os tratamentos não diferiram. Assim, as variáveis morfológicas apresentaram resposta pontual aos tratamentos, com maior diferenciação entre inoculantes sob ausência de adubação nitrogenada.

Tabela 5 - Razão lâmina foliar/colmo (LF/CM) e porcentagem de lâmina foliar (% LF) do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, nos períodos das águas e da seca, em 2024 e 2025, sob ausência de inoculação ou inoculação com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1}

Ano Agrícola 1								
	Período das Águas				Período da Seca			
Tratamento	LF/CM		% LF		LF/CM		% LF	
F1/F2	0	40	0	40	0	40	0	40
sem.0	2,31	2,16	67,64	65,48	7,36 Aa	3,00 Bb	83,02	77,64
S26.0	3,03	2,6	71,11	60,36	4,61 Bb	6,87 Aa	85,96	85
N72.0	2,54	2,21	69,36	68,26	4,88 ABa	3,28 Ba	81,17	74,63
C.V. (%)	19,77		11,39		28,4		11,39	

Ano Agrícola 2								
	Período das Águas				Período da Seca			
Tratamento	LF/CM		% LF		LF/CM		% LF	
F1/F2	0	40	0	40	0	40	0	40
sem.0	1,59 Aa	1,36 Aa	60,92 Aa	57,38 Aa	2,19 Ba	2,67 Aa	65,96 Ba	72,47 Aa
S26.0	1,12 ABa	1,07 Aa	51,31 ABa	51,32 Aa	2,85 ABa	2,57 Aa	71,65 ABa	71,78 Aa
N72.0	0,79 Ba	1,24 Aa	43,78 Bb	54,97 Aa	3,27 Aa	3,48 Aa	76,48 Aa	75,37 Aa
C.V. (%)	25,05		10,94		17,67		6,23	

Nota: F1 = inoculação (sem inoculação, *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72); F2 = doses de nitrogênio (0 e 40 kg N ha^{-1}). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna e letras minúsculas diferentes na linha, dentro de cada avaliação, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Em Ano Agrícola 1, o período das águas compreende os cortes 1, 2 e 3, e o período da seca os cortes 4 e 5. Em Ano Agrícola 2, o período das águas compreende os cortes 6, 7 e 8, e o período da seca o corte 9. C.V. = coeficiente de variação. Fonte: Própria autora.

4.3.5 Eficiência de uso e recuperação do N

No período das águas de 2024, o acúmulo de N foi maior nos tratamentos com 80 kg N ha^{-1}, 40 kg N ha^{-1} e 40 kg N ha^{-1} + N72, enquanto S26 apresentou menor valor (Tabela 6). A porcentagem de N proveniente do fertilizante não diferiu entre os tratamentos; entretanto, a quantidade de N derivada do fertilizante foi maior em 40 kg N ha^{-1} e 40 kg N ha^{-1} + N72. A maior eficiência de recuperação do N fertilizante foi observada no tratamento com N72, sugerndo maior aproveitamento do N aplicado nesse período. A porcentagem de N proveniente do solo não diferiu entre os tratamentos e representou a principal fonte de N acumulado pelas plantas.

No período da seca, os tratamentos inoculados com S26 e N72 apresentaram maior acúmulo total de N e maior quantidade de N proveniente do solo. Em contrapartida, o tratamento com 40 kg N ha^{-1} sem inoculação apresentou maior porcentagem e quantidade de N

proveniente do fertilizante. A eficiência de recuperação do N fertilizante foi maior com S26, seguida por N72, porém os valores foram baixos em todos os tratamentos.

Tabela 6 - Dados isótopos N15 do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, sob inoculação ou não, com *Bacillus* sp. (S26 e N72), em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Período das Águas 2024					
	AN	NPFF	QNPFF	NRFF	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	35,9 a	7,76 a	2,4 ab	12,2 ab	30,2 ab	92,2 a
T3- 40 kg N ha^{-1}	36,7 a	11,4 a	4,1 a	10,4 b	32,6 a	88,6 a
T4- T3 + S26	24,2 b	7,5 a	1,9 b	9,9 b	23,6 b	92,5 a
T5- T3 + N72	37,3 a	10,6 a	3,9 a	19,5 a	32,5 ab	89,3 a
Média	33.5	9.3	3.1	13.0	29.7	90.7
Pr>F	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	6.0	24.4	25.6	25.6	13.6	2.5
Tratamento	Período da Seca 2024					
	AN	NPFF	QNPFF	NRFF	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	15,6 b	1,4 b	0,2 b	1,1 c	15,4 b	98.8 a
T3- 40 kg N ha^{-1}	15,1 b	2,0 a	0,4 a	1,0 c	15,5 b	97.7 b
T4- T3 + S26	18,1 a	1,4 b	0,2 b	1,4 a	17,5 a	98,6 a
T5- T3 + N72	18,5 a	1,3 b	0,2 b	1,2 b	18,2 a	98,7 a
Média	16.88	1.58	0.30	1.22	16.70	98.74
Pr>F	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	5.65	9.68	8.30	3.16	3.95	0.32

Nota: Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey. **Significativo a $p \leq 0,01$. ns = não significativo. Fonte de N: ureia. AN: Acúmulo de N; NPFF: Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Fertilizante; QNPFF: Quantidade de Nitrogênio Fornecido pelo Fertilizante; NRFF: Nitrogênio Recuperado Fornecido pelo Fertilizante; QNPFS: Quantidade do Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Solo; NPFS: Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Solo. Técnica de diluição isotópica com 15N enriquecido a 1,19%. Período das Águas de 2024 refere-se ao corte 2, enquanto o período da seca ao corte 4. Fonte: Própria autora.

No período das águas de 2025, o tratamento com 80 kg N ha^{-1} proporcionou maior acúmulo de N na parte aérea do capim-marandu, diferindo dos tratamentos com 40 kg N ha^{-1}, inoculados ou não com *Bacillus* sp. (Tabela 7). A porcentagem e a quantidade de N proveniente do fertilizante também foram maiores com 80 kg N ha^{-1}. Entre os tratamentos com 40 kg N ha^{-1}, a inoculação com N72 apresentou maior recuperação do N fertilizante que S26, enquanto os tratamentos sem inoculação apresentaram comportamento intermediário. A quantidade de N proveniente do solo foi maior no tratamento com 80 kg N ha^{-1}, acompanhando o maior acúmulo total de N. No período da seca de 2025, não houve diferença significativa entre os tratamentos para nenhuma das variáveis isotópicas avaliadas.

Tabela 7 - Dados isótopos N15 do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, sob inoculação ou não, com *Bacillus* sp. (S26 e N72), em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Período das Águas 2025					
	AN	NPFF	QNPFF	NRFF	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	30 ,8 a	29 ,6 a	9,12 a	22,7 a	21,7 a	70,4 c
T3- 40 kg N ha^{-1}	20 ,3 b	18 ,1 bc	3,66 b	18,3 ab	16,6 b	81,9 ab
T4- T3 + S26	16 ,6 b	17 ,1 c	2,83 b	14,1 b	13,8 b	82,9 a
T5- T3 + N72	16 ,5 b	20 ,9 b	3,44 b	17,2 b	13,0 b	79,0 b
Média	21 ,1	21,4	4,76	18,12	16,27	78,55
Pr>F	**	**	**	*	**	*
C.V. (%)	12,16	7,14	14,26	12,91	12,26	1,95
Tratamento	Período da Seca 2025					
	AN	NPFF	QNPFF	NRFF	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	13,4	4,39	0,5	1,5	12,8	95,6
T3- 40 kg N ha^{-1}	11,3	3,33	0,4	1,9	10,9	96,7
T4- T3 + S26	11,6	4,61	0,5	2,7	11,1	95,4
T5- T3 + N72	13,5	4,03	0,5	2,7	12,9	96,0
Média	12,5	4,1	0,5	2,2	11,9	95,9
Pr>F	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	17,85	21,73	35,81	37,51	17,17	0,93

Nota: Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey. *Significativo a $p \leq 0,05$. ns = não significativo. Fonte de N: ureia. AN: Acúmulo de N; NPFF: Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Fertilizante; QNPFF: Quantidade de Nitrogênio Fornecido pelo Fertilizante; NRFF: Nitrogênio Recuperado Fornecido pelo Fertilizante; QNPFS: Quantidade do Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Solo; NPFS: Nitrogênio na Planta Fornecido pelo Solo. Técnica de diluição isotópica com 15N enriquecido a 1,19%. Período das Águas, parte aérea e resíduo, de 2025 refere-se ao corte 7. Fonte: Própria autora.,

4.3.6 Estado nutricional

A análise discriminante canônica evidenciou separação multivariada entre os tratamentos em função dos teores foliares de nutrientes do capim-marandu, com padrão de discriminação variável entre cortes e períodos sazonais (Figura 3). No 2º corte, correspondente ao período das águas, os dois primeiros eixos canônicos explicaram a maior parte da variação multivariada, com predominância da Can1. Nesse corte, os tratamentos com adubação nitrogenada mineral, especialmente T2, T3 e T5, posicionaram-se no lado positivo da Can1,

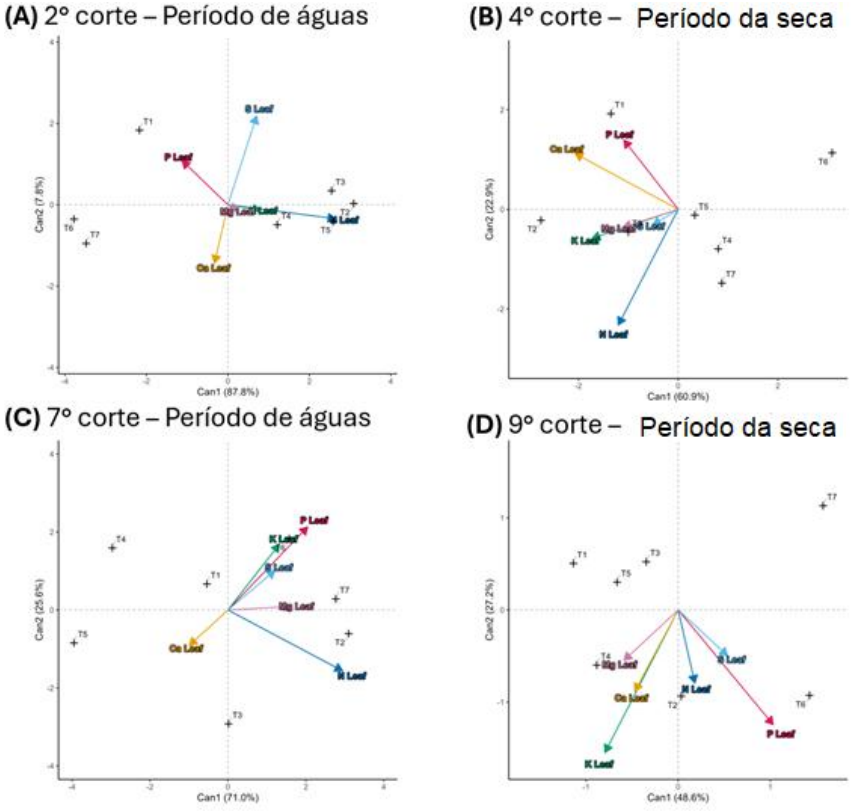
sugerindo maior associação com os vetores de nutrientes localizados nessa direção, principalmente N, Mg, S e B foliar. Em contraste, os tratamentos sem N ou apenas inoculados tenderam a se posicionar no lado negativo da Can1, demonstrando menor associação com esse conjunto nutricional. Esse padrão sugere que, no período inicial das águas, a adubação nitrogenada foi o principal fator associado à diferenciação nutricional das plantas.

No 4º corte, referente ao período da seca, a separação dos tratamentos também foi explicada majoritariamente pela Can1. Os vetores de Ca e P foliar apresentaram maior contribuição no sentido negativo da Can1, enquanto o vetor de B foliar foi direcionado para o quadrante oposto. Nessa avaliação, observou-se maior dispersão dos tratamentos, demonstrando alteração no padrão nutricional sob condição de menor disponibilidade hídrica. Os tratamentos inoculados e adubados apresentaram posicionamentos distintos entre si, sugerindo que a resposta nutricional às estirpes S26 e N72 foi condicionada pelo período seco, sem formação de um agrupamento único associado à inoculação.

No 7º corte, novamente no período das águas, a discriminação multivariada foi mais evidente, com os vetores de P, K, Mg e S foliar orientados na mesma direção e contribuindo para a separação dos tratamentos localizados no quadrante positivo da Can1 e Can2. O tratamento T2 apresentou maior associação com B foliar, enquanto os tratamentos posicionados próximos aos vetores de P, K, Mg e S mostraram maior contribuição desses nutrientes para a diferenciação nutricional nesse corte. A maior organização dos vetores nesse período sugere que, sob condições favoráveis de crescimento, os tratamentos expressaram diferenças mais claras no balanço nutricional foliar.

No 9º corte, correspondente ao período da seca, a separação entre tratamentos foi menos concentrada nos dois primeiros eixos canônicos em comparação aos demais cortes, indicando maior complexidade ou menor definição da resposta nutricional multivariada. Nesse corte, os vetores de K, Ca, Mg e S foliar direcionaram-se para o lado negativo da Can1, enquanto P foliar apresentou maior contribuição no sentido positivo da Can1. O tratamento T7 ficou mais afastado dos demais, indicando resposta nutricional distinta na associação entre N72 e 40 kg N ha^{-1}. Entretanto, de modo geral, a dispersão dos tratamentos sugere que, no período seco, a composição nutricional foliar foi menos uniforme e mais dependente das condições específicas de cada combinação entre inoculação e adubação nitrogenada.

Figura 3 - Análise discriminante canônica (ADC) dos teores foliares de nutrientes do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) em cortes representativos dos períodos de águas e seca, sob doses de nitrogênio mineral e inoculação foliar com *Bacillus* spp. estirpes S26 e N72. (A) 2º corte — período das águas; (B) 4º corte — período de seca; (C) 7º corte — período das águas; e (D) 9º corte — período de seca. Tratamentos: T1 = sem inoculação e sem N; T2 = sem inoculação + 40 kg N ha⁻¹; T3 = sem inoculação + 80 kg N ha⁻¹; T4 = S26 sem N; T5 = S26 + 40 kg N ha⁻¹; T6 = N72 sem N; e T7 = N72 + 40 kg N ha⁻¹. Os vetores indicam a contribuição dos nutrientes foliares para a discriminação dos tratamentos, enquanto a proximidade entre tratamentos e vetores indica maior associação multivariada com os respectivos nutrientes



Fonte: Própria autora

4.3.7 Capacidade fotossintética

No período das águas de 2024, a adubação com 40 kg N ha⁻¹ aumentou o índice SPAD em todas as condições de inoculação, sem diferença entre os tratamentos dentro de cada dose de N (Tabela 8).

As variáveis A, E, gs, Ci e WUEt não apresentaram diferenças significativas. Para WUEi, S26 apresentou maior valor que o tratamento sem inoculação na dose de 40 kg N ha⁻¹, enquanto N72 foi intermediário. A eficiência de carboxilação diferiu apenas na ausência de N, com maior valor no tratamento sem inoculação e menor em S26. Em 2025, as respostas foram mais pronunciadas. A inoculação com N72 proporcionou maior fotossíntese líquida,

condutância estomática e eficiência de carboxilação na ausência de N. Com 40 kg N ha^{-1}, os tratamentos inoculados com S26 e N72 apresentaram maior fotossíntese líquida que o tratamento sem inoculação. S26 também apresentou maior SPAD e maior eficiência instantânea do uso da água sob adubação nitrogenada.

Tabela 8 - Índice de clorofila (SPAD), fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), concentração interna de CO_2 (Ci), eficiência instantânea do uso da água (WUEt), eficiência intrínseca do uso da água (WUEi) e eficiência de carboxilação (CE) do capim-marandu cultivado a campo, em Dracena, SP, nos períodos das águas de 2024 e 2025, sob ausência de inoculação foliar ou inoculação foliar com *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72, associadas à adubação nitrogenada nas doses de 0 e 40 kg N ha^{-1}

Período das Águas 2024								
	SPAD		*A*		*E*		*gs*	
Tratamento			μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}					
F1/F2	0	40	0	40	0	40	0	40
sem	33,85 Ab	38,85 Aa	21,95 Aa	20,18 Aa	2,71 Aa	2,54 Aa	0,30 Aa	0,35 Aa
S26	33,37 Ab	36,20 Aa	17,21 Aa	18,55 Aa	2,28 Aa	2,40 Aa	0,51 Aa	0,38 Aa
N72	31,57 Ab	36,30 Aa	21,80 Aa	20,76 Aa	2,62 Aa	2,54 Aa	0,38 Aa	0,60 Aa
C.V. (%)	3,78		10,56		12,59		35,35	
	Ci		*WUEt*		*WUEi*		*CE*	
Tratamento	μmol mol^{-1}		mmol CO_2 mol^{-1} H_2O				μmol CO2 m^{-2} s^{-1} μmol CO_2 mol ar^{-1}	
F1/F2	0	40	0	40	0	40	0	40
sem	172,50 Aa	191,25 Aa	8,10 Aa	7,49 Aa	52,09 Aa	16,21 Bb	0,13 Aa	0,11 Aa
S26	238,00 Aa	239,00 Aa	7,66 Aa	8,14 Aa	41,68 Aa	55,26 Aa	0,07 Ba	0,08 Aa
N72	203,50 Aa	237,50 Aa	8,34 Aa	8,15 Aa	59,66 Aa	34,87 ABa	0,11 ABa	0,09 Aa
C.V. (%)	15,93		11,7		38,93		22,33	
Período das Águas 2025								
	SPAD		*A*		*E*		*gs*	
Tratamento			μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}					
F1/F2	0	40	0	40	0	40	0	40
sem	29,47 Aa	30,17 Ba	21,11 Ba	16,98 Bb	2,24 Aa	1,64 Bb	0,34 Ba	0,26 Bb
S26	30,97 Ab	34,07 Aa	16,37 Cb	22,49 Aa	2,36 Aa	1,61 Bb	0,34 Bb	0,41 Aa
N72	28,87 Ab	32,20 Aba	25,58 Aa	22,87 Aa	2,52 Aa	2,49 Aa	0,51 Aa	0,47 Aa
C.V. (%)	5,24		7,71		9,2		9,64	
	Ci		*WUEt*		*WUEi*		*CE*	
Tratamento	μmol mol^{-1}		mmol CO_2 mol^{-1} H_2O				μmol CO2 m^{-2} s^{-1} μmol CO_2 mol ar^{-1}	
F1/F2	0	40	0	40	0	40	0	40
sem	235,67 Aa	206,67 Bb	10,01 Aa	9,42 Ba	44,31 Ab	48,84 Aa	0,08 Ba	0,07 Aa
S26	184,00 Cb	211,50 Ba	7,00 Bb	17,22 Aa	48,54 Aa	50,90 Aa	0,08 Ba	0,10 Aa
N72	220,00 Ba	224,00 Aa	7,53 ABa	6,54 Ca	47,22 Aa	37,28 Bb	0,13 Aa	0,08 Ab
C.V. (%)	2,27		11,98		4,87		18,36	

Nota: F1 = inoculação foliar (sem inoculação, *Bacillus* sp. S26 e *Bacillus* sp. N72); F2 = doses de nitrogênio (0 e 40 kg N ha^{-1}). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna e letras minúsculas diferentes na linha, dentro de cada variável e ano de avaliação, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O período das águas refere-se ao corte 2 em 2024 e ao corte 7 em 2025. C.V. = coeficiente de variação. Fonte de N: ureia. Fonte: Própria autora

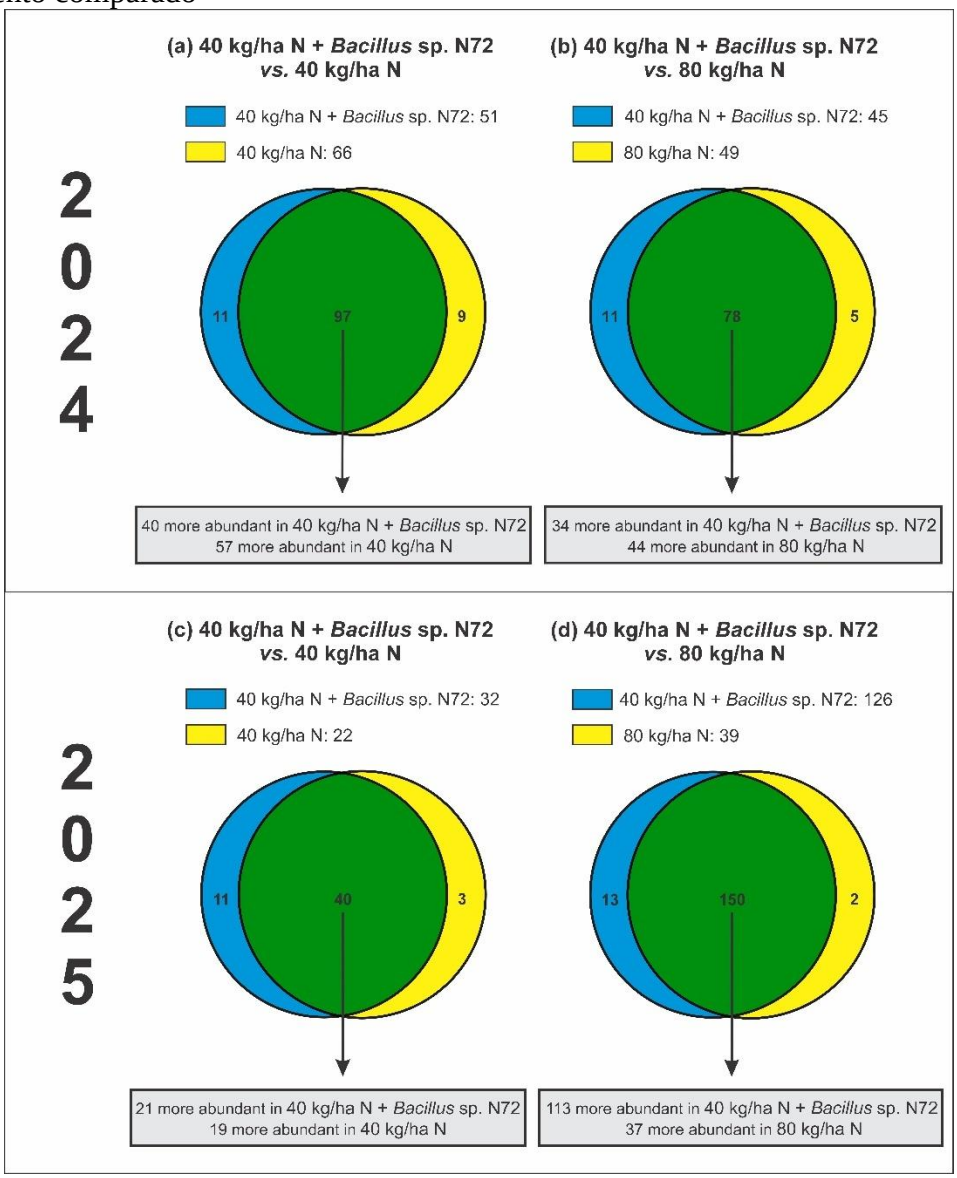
4.3.8 Visão geral da análise proteômica

Durante o primeiro ano de avaliação, em 2024, no segundo corte, a análise proteômica da parte aérea do capim-marandu identificou um total de 597 proteínas ao comparar o tratamento com 40 kg N ha^{-1} inoculado com *Bacillus* sp. N72 com o tratamento contendo apenas 40 kg N ha^{-1}. Desse total, 117 proteínas, correspondentes a 19,6%, foram detectadas exclusivamente ou apresentaram abundância diferencial entre os tratamentos (Figura 4a). Em comparação semelhante entre os tratamentos 40 kg N ha^{-1} + *Bacillus* sp. N72 e 80 kg N ha^{-1}, foram identificadas 593 proteínas, das quais 94, correspondentes a 15,8%, foram exclusivas ou diferencialmente abundantes (Figura 4b).

No segundo ano, em 2025, no sétimo corte, foi detectado um proteoma mais amplo. Um total de 634 proteínas foi identificado na parte aérea ao comparar os tratamentos 40 kg N ha^{-1} + *Bacillus* sp. N72 e 40 kg N ha^{-1}, com 54 proteínas, ou 8,5%, diferindo entre os tratamentos ou ocorrendo exclusivamente em uma das condições (Figura 4c). Quando o mesmo tratamento inoculado foi comparado com a maior dose de nitrogênio, 80 kg N ha^{-1}, foram identificadas 633 proteínas, das quais 165, correspondentes a 26,0%, foram exclusivas ou diferencialmente abundantes (Figura 4d).

As sequências proteicas foram comparadas ao banco de dados do NCBI utilizando BLASTp, a fim de identificar domínios conservados, funções moleculares e anotações funcionais. Com base nessas informações e com suporte da literatura existente, as proteínas foram posteriormente agrupadas em categorias funcionais de acordo com seus prováveis papéis biológicos. As listas completas das proteínas detectadas exclusivamente ou com abundância diferencial durante o segundo corte, em 2024, e o sétimo corte, em 2025, são apresentadas nas Tabelas Suplementares 1, 2, 3 e 4. Para facilitar a interpretação
da variação na abundância proteica entre as categorias funcionais, uma visão geral resumida é apresentada na Tabela 9.

Figura 4 - Diagramas de Venn representando proteínas diferencialmente abundantes identificadas na parte aérea do capim-marandu inoculado com *Bacillus* sp. N72 associado a 40 kg N ha⁻¹, em comparação aos tratamentos sem inoculação com 40 e 80 kg N ha⁻¹, nos anos de 2024 e 2025. Os círculos azuis representam proteínas identificadas no tratamento inoculado com *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha⁻¹, enquanto os círculos amarelos representam proteínas identificadas nos tratamentos sem inoculação com 40 ou 80 kg N ha⁻¹. A região de interseção indica proteínas compartilhadas entre os tratamentos comparados, e as regiões exclusivas representam proteínas diferencialmente abundantes específicas de cada condição. (a) Comparação entre *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha⁻¹ e 40 kg N ha⁻¹ em 2024; (b) comparação entre *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha⁻¹ e 80 kg N ha⁻¹ em 2024; (c) comparação entre *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha⁻¹ e 40 kg N ha⁻¹ em 2025; e (d) comparação entre *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha⁻¹ e 80 kg N ha⁻¹ em 2025. Os números centrais representam proteínas compartilhadas entre os tratamentos, enquanto os números externos correspondem às proteínas exclusivas de cada condição. As setas indicam o número de proteínas com maior abundância relativa em cada tratamento comparado



Fonte: Própria autora

Tabela 9 - Representação esquemática das categorias funcionais diferencialmente representadas na parte aérea de plantas de capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) sob as condições 40 kg ha^{-1} de N + *Bacillus* sp. N72, 40 kg ha^{-1} de N e 80 kg ha^{-1} de N, durante o segundo (2024) e o sétimo (2025) ciclos de rebrota

	Segundo corte (2024)				**Sétimo corte (2025)**			
	40 kg ha^{-1} N + *Bacillus* sp. N72 vs. 40 kg ha^{-1} N		**40 kg ha^{-1} N + *Bacillus* sp. N72 vs. 80 kg ha^{-1} N**		**40 kg ha^{-1} N + *Bacillus* sp. N72 vs. 40 kg ha^{-1} N**		**40 kg ha^{-1} N + *Bacillus* sp. N72 vs. 80 kg ha^{-1} N**	
Categorias funcionais	**40 kg ha^{-1} N + *Bacillus* sp. N72**	**40 kg ha^{-1} N**	**40 kg ha^{-1} N + *Bacillus* sp. N72**	**80 kg ha^{-1} N**	**40 kg ha^{-1} N + *Bacillus* sp. N72**	**40 kg ha^{-1} N**	**40 kg ha^{-1} N + *Bacillus* sp. N72**	**80 kg ha^{-1} N**
	↑↑	↑	↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑	↑↑↑↑↑	↑
Metabolismo de carboidratos e produção de energia	↑↑	↑	↑	↑↑	↑↑↑↑↑	↑	↑↑↑↑↑	-
Resposta ao estresse	↑↑	↑	↑	-	-	-	↑↑↑↑↑	↑
Transporte ou tráfego intracelular	↑	↑↑	↑↑↑↑↑	↑	-	-	↑↑↑↑	↑
Tradução	↑	↑	↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑	↑↑↑↑↑	-
Metabolismo de aminoácidos	↑	↑↑	↑	↑	↑↑	↑	↑	↑↑
Fotossíntese	↑	-	-	-	↑	-	-	↑
Proteínas associadas a lipídios plastidiais	↑	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑↑	↑	↑↑↑↑↑	↑
Modificação ou degradação proteica	↑	↑↑↑↑↑	↑	↑↑	↑	-	↑	↑
Sistema antioxidante	↑	↑	-	↑	-	-	-	-
Metabolismo lipídico	↑	-	-	-	-	-	-	-
Via das pentoses-fosfato	↑	↑	-	↑	-	-	↑	-
Fotorrespiração	↑	↑	↑	-	-	↑	↑↑↑	-
Transcrição	↑	-	↑	-	-	-	-	-
Síntese de vitaminas	↑	↑↑↑	↑	↑↑	↑↑	-	↑↑↑↑↑	↑
Outras categorias	-	↑	↑	-	-	-	↑↑↑	-
Manutenção da estrutura do DNA	-	↑	-	-	-	-	-	-
Divisão celular	-	↑	-	-	↑	↑	-	↑
Parede celular	-	↑	-	↑	-	-	-	-
Assimilação de sulfato	-	↑	↑	-	-	-	-	↑↑
Função desconhecida	-	-	↑	-	↑	↑	-	↑
Sinalização por cálcio	-	-	↑	-	-	-	↑↑	-
Metabolismo de nucleotídeos	-	-	-	↑	-	-	↑	-
Hormônios	-	-	-	↑	-	-	-	-
Metabolismo secundário	-	-	-	-	↑	-	↑↑↑↑	-
Citoesqueleto	-	-	-	-	-	↑	-	-
Síntese de clorofila	-	-	-	-	-	-	↑	-

Nota: (-): categoria funcional não detectada como diferencialmente representada. As diferentes cores representam os distintos padrões de resposta. O número de setas indica o nível de representação, determinado com base no número de sequências diferencialmente abundantes. Verde: categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg ha^{-1} de N em comparação com 40 kg ha^{-1} de N e menos representadas em comparação com 80 kg ha^{-1} de N; azul: categorias funcionais menos representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg ha^{-1} de N em comparação com 40 kg ha^{-1} de N e mais representadas em comparação com 80 kg ha^{-1} de N; rosa: categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg ha^{-1} de N em comparação com ambas as doses de 40 e 80 kg ha^{-1} de N; amarelo: categorias funcionais menos representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg ha^{-1} de N em comparação com ambas as doses de 40 e 80 kg ha^{-1} de N; laranja: categorias funcionais menos representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg ha^{-1} de N em comparação apenas com 40 ou 80 kg ha^{-1} de N; e cinza: categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg ha^{-1} de N em comparação apenas com 40 ou 80 kg ha^{-1} de N. Fonte: Própria autora.

Durante o segundo corte, em 2024, seis padrões distintos foram observados com base na abundância relativa das proteínas entre os tratamentos (Tabela 10): 1) categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação com 40 kg N ha^{-1}, porém menos representadas em relação a 80 kg N ha^{-1}, incluindo metabolismo de carboidratos/produção de energia e resposta ao estresse; 2) categorias funcionais menos representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação com 40 kg N ha^{-1}, mas mais representadas em relação a 80 kg N ha^{-1}, incluindo tradução, manutenção da estrutura do DNA e proteínas de função desconhecida; 3) categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação com ambas as doses de 40 e 80 kg N ha^{-1}, incluindo transporte ou tráfego intracelular e síntese de vitaminas; 4) categorias funcionais menos representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação com ambas as doses de 40 e 80 kg N ha^{-1}, incluindo modificações/degradação proteica, sistema antioxidante, assimilação de sulfato e outras categorias; 5) categorias funcionais menos representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação apenas com 40 ou 80 kg N ha^{-1}, incluindo metabolismo de aminoácidos, fotossíntese, metabolismo lipídico, fotorrespiração, divisão celular, parede celular, hormônios e metabolismo secundário; e 6) categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg ha^{-1} de N em comparação apenas com 40 ou 80 kg N ha^{-1}, incluindo proteínas associadas a lipídios plastidiais, via das pentoses-fosfato, transcrição, sinalização por cálcio e metabolismo de nucleotídeos.

O perfil proteômico da parte aérea do capim-marandu durante o segundo corte, em 2024, revelou uma reprogramação consistente e funcionalmente coerente em resposta à inoculação com *Bacillus* sp. N72 combinada com 40 kg N ha^{-1}, especialmente quando comparada aos tratamentos não inoculados com 40 e 80 kg N ha^{-1}. De modo geral, o tratamento inoculado foi caracterizado pelo enriquecimento coordenado de proteínas associadas ao metabolismo central do carbono, à geração mitocondrial de energia, à síntese e renovação proteica e ao tráfego intracelular, enquanto os tratamentos não inoculados apresentaram assinaturas mais intensas de mitigação do estresse oxidativo, interconversão de aminoácidos e ajuste metabólico compensatório (Tabelas Suplementares 1 e 2). Essa mudança global sugere que a inoculação com *Bacillus* não apenas atenuou a limitação de N, mas promoveu um estado da parte aérea metabolicamente mais eficiente e funcionalmente integrado, coerente com os aumentos observados na eficiência de recuperação do N fertilizante e no acúmulo de N (Tabela 7).

Classificação semelhante foi aplicada ao sétimo corte, em 2025, permitindo a identificação de menor número de categorias funcionais em relação ao segundo corte, em 2024 (Tabela X). A partir dessa análise, foram detectados cinco padrões de abundância: 1) categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação com 40 kg N ha^{-1}, porém menos representadas em relação a 80 kg N ha^{-1}, incluindo fotossíntese e proteínas associadas a lipídios plastidiais; 2) uma categoria funcional menos representada no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação com 40 kg N ha^{-1}, mas mais representada em relação a 80 kg N ha^{-1}, correspondente à transcrição; 3) categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação com ambas as doses de 40 e 80 kg N ha^{-1}, incluindo metabolismo de carboidratos/produção de energia, resposta ao estresse, metabolismo de aminoácidos, modificações/degradação proteica, citoesqueleto e outras categorias; 4) categorias funcionais menos representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação apenas com 40 ou 80 kg N ha^{-1}, incluindo parede celular, sinalização por cálcio, síntese de clorofila e proteínas de função desconhecida; e 5) categorias funcionais mais representadas no tratamento *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1} em comparação apenas com 40 ou 80 kg N ha^{-1}, incluindo transporte ou tráfego intracelular, tradução, sistema antioxidante, fotorrespiração, manutenção da estrutura do DNA, metabolismo de nucleotídeos, hormônios e agrupamentos Fe-S.

O perfil proteômico da parte aérea do capim-marandu durante o sétimo corte, em 2025, novamente indicou uma reprogramação metabólica consistente em resposta à inoculação com *Bacillus* sp. N72 combinada com 40 kg N ha^{-1}, porém com características distintas daquelas observadas em 2024. Nesse corte, o tratamento inoculado foi caracterizado pelo enriquecimento de proteínas associadas ao metabolismo do carbono, à geração respiratória de energia, ao suporte fotossintético, à assimilação de aminoácidos, à manutenção do proteoma, à organização do citoesqueleto e ao transporte de membrana (Tabelas Suplementares 3 e 4). Esse padrão mais amplo sugere que, em 2025, a inoculação com *Bacillus* esteve associada não apenas à eficiência metabólica nos tecidos da parte aérea, mas também a processos compatíveis com maior atividade fonte, maior organização tecidual e melhor fluxo de água e nutrientes. Essa configuração é altamente coerente com as respostas fisiológicas observadas sob *Bacillus* sp. N72 + 40 kg N ha^{-1}, incluindo elevada densidade radicular (Tabela 4), eficiência de recuperação do N fertilizante (Tabela 8), fotossíntese líquida e condutância estomática (Tabela 9). Em conjunto, os dados proteômicos sugerem que a inoculação sustentou um estado fisiológico mais integrado da parte aérea, no qual a maior assimilação de carbono, a produção de energia e a

renovação proteica foram coordenadas com a melhoria da funcionalidade da planta como um todo.

4.3.9 Microbioma do solo

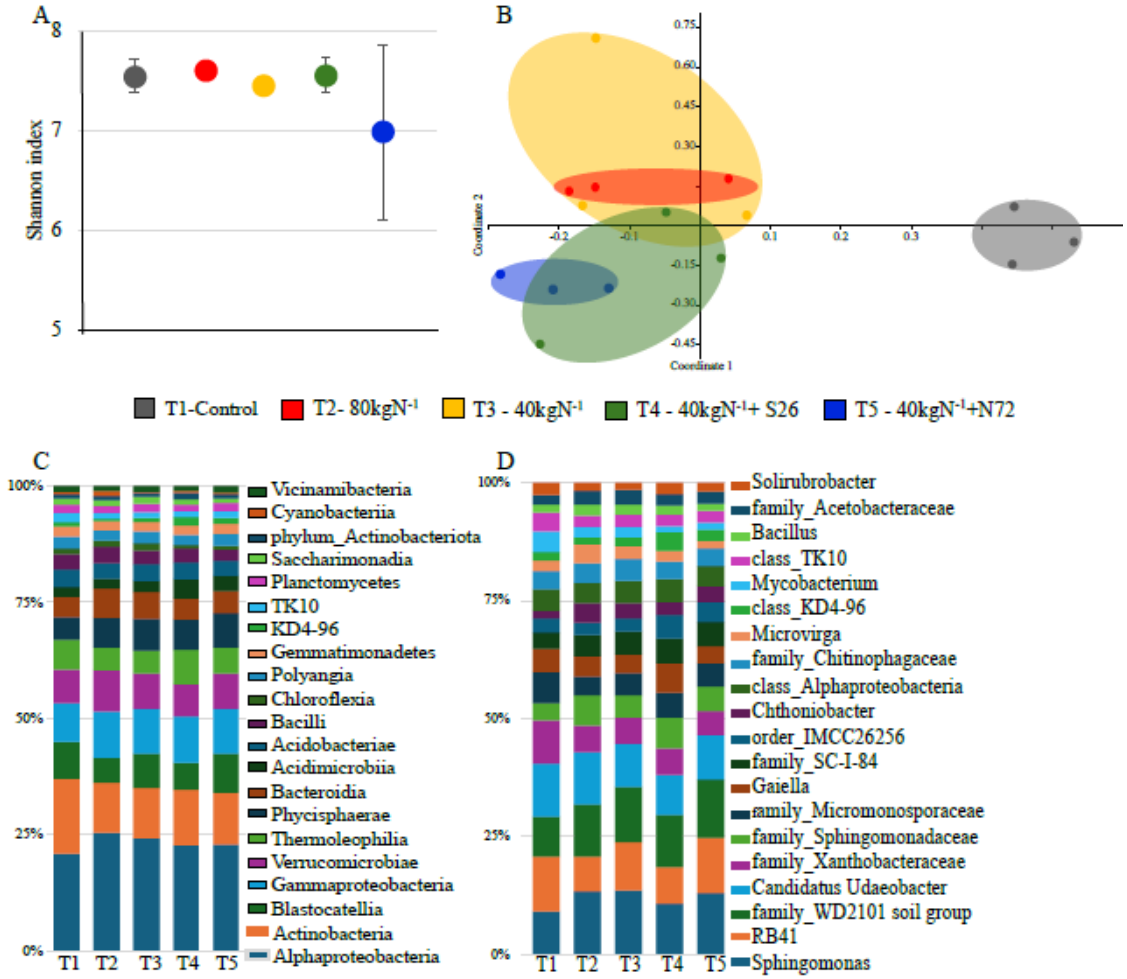
Para avaliar o impacto da inoculação foliar com *Bacillus* spp. e da adubação nitrogenada sobre a comunidade bacteriana do solo rizosférico do capim-marandu, foi realizado o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA em amostras coletadas sob diferentes condições de manejo. A diversidade alfa, estimada pelo índice de Shannon, apresentou baixa variação entre os tratamentos, indicando que a riqueza e a uniformidade da comunidade microbiana permaneceram relativamente estáveis independentemente da inoculação ou da dose de N aplicada (Figura 5A). Entretanto, a análise de coordenadas principais (PCoA) revelou alterações estruturais na composição das comunidades bacterianas, demonstrando separação parcial entre os tratamentos avaliados (Figura 5B). O tratamento controle (T1) apresentou agrupamento distinto dos demais tratamentos fertilizados, enquanto os tratamentos inoculados com S26 e N72 formaram agrupamentos parcialmente sobrepostos aos tratamentos adubados sem inoculação, sugerindo que tanto a adubação nitrogenada quanto a inoculação influenciaram a estrutura taxonômica da microbiota do solo.

Em nível de classe bacteriana, *Alphaproteobacteria* foi o grupo predominante em todos os tratamentos, seguido por *Actinobacteria, Blastocatellia, Gammaproteobacteria* e *Verrucomicrobiae* (Figura 5C). Os tratamentos inoculados apresentaram alterações relativas em grupos associados à ciclagem de nutrientes e adaptação ao ambiente rizosférico, incluindo *Acidobacteriae, Bacilli, Chloroflexia* e KD4-96. Além disso, observou-se maior representatividade relativa de *Bacilli* nos tratamentos inoculados, especialmente em T4 e T5, indicando possível favorecimento de grupos relacionados à promoção de crescimento vegetal sob inoculação com *Bacillus* spp.

Em nível de gênero e famílias bacterianas (Figura 5D), destacaram-se mudanças na abundância relativa de *Sphingomonas, Solirubrobacter, Microvirga, Chthoniobacter, Gaiella* e membros das famílias *Sphingomonadaceae, Micromonosporaceae* e *Xanthobacteraceae*. Os tratamentos inoculados com S26 e N72 apresentaram maior participação relativa de grupos frequentemente associados à decomposição de matéria orgânica, ciclagem de carbono e nitrogênio e interação rizosférica. Além disso, a presença de *Bacillus* aumentou nos tratamentos inoculados, refletindo possível estabelecimento ou estímulo indireto de microrganismos

relacionados funcionalmente ao inoculante aplicado. Em contraste, alguns grupos como RB41 e membros de *Acidobacteriota* mantiveram abundância relativamente constante entre os tratamentos, sugerindo maior estabilidade ecológica frente às alterações de manejo.

Figura 5 - Análise das comunidades microbianas de solos cultivados com *Urochloa brizantha* cv. Marandu sob diferentes doses de N e inoculação com *Bacillus* spp. A- Índice de diversidade de Shannon; B - Beta diversidade; C - Classes mais importantes; D Gêneros mais importantes que contribuíram para a diversidade total de acordo com o teste SIMPER.



Fonte: Própria autora.

4.4 Discussão

4.4.1 Resposta à adubação nitrogenada

A adubação nitrogenada foi o principal fator determinante do acúmulo de forragem no capim-marandu, com superioridade consistente do tratamento com 80 kg N ha^{-1} na

produtividade acumulada nos dois anos, sobretudo no período das águas, quando a disponibilidade hídrica e a maior taxa de crescimento ampliam a resposta ao N. Esse padrão é coerente com a premissa de que a intensificação de pastagens tropicais depende de manejo de N ajustado a cultivar/ambiente, pois o aumento de dose tende a elevar produção e proteína, mas também pode aumentar perdas e reduzir a "eficiência" em alguns cenários (Bastidas *et al*., 2024).

Além da produção, os dados fisiológicos (SPAD e trocas gasosas) reforçam a função central do N na manutenção do aparato fotossintético: no período das águas, tratamentos adubados mostraram maiores valores de SPAD e melhorias em parâmetros associados à assimilação de CO_2, o que é esperado porque N sustenta clorofila e enzimas do metabolismo fotossintético. Mesmo em estudos com outras espécies, a literatura converge ao mostrar que níveis adequados de N elevam SPAD e atividade fotossintética, refletindo maior capacidade de captação e uso de luz (Nasar *et al*., 2022).

A variação sazonal observada é plausível, porque déficits hídricos restringem expansão foliar, condutância estomática e absorção de nutrientes, limitando o retorno agronômico do N aplicado. Em sistemas forrageiros, a água atua como "fator controlador" do aproveitamento do N: quando a água restringe crescimento, parte do N tende a permanecer no sistema solo-planta ou ser redirecionada a processos de perda, reduzindo a conversão em biomassa (Amaral *et al*., 2025).

4.4.2 Eficiência de uso do N (EUN) e recuperação do fertilizante (^{15}N)

O uso de ^{15}N permitiu separar N proveniente do fertilizante e N proveniente do solo, evidenciando que a eficiência do sistema não depende apenas de "produzir mais", mas de recuperar melhor o N aplicado. Essa distinção é importante porque "EUN" possui múltiplas definições (agronômica, fisiológica, de recuperação, balanços), e a interpretação correta exige explicitar qual métrica está sendo discutida (Di Sario *et al*., 2025).

A combinação 40 kg N ha^{-1} + N72 elevou a eficiência de recuperação do N (NRFF) e o N acumulado na parte aérea no período das águas, sugerindo que existe uma "janela" em que dose moderada de N + microrganismo favorece maior captura do N aplicado, aumento de N disponível para a planta e redução de perdas/transformações no solo. Esse achado é especialmente relevante para pastagens tropicais, onde a ureia, embora economicamente atraente, pode ter perdas por volatilização de NH_3 e baixa recuperação em condições

específicas; por isso, estratégias para reter N e sincronizar oferta-demanda são frequentemente discutidas como caminhos para elevar a eficiência do N (Bastidas *et al*., 2024).

A queda de NPFF/NRFF no período de seca, com maior participação relativa do N do solo, é compatível com o efeito do estresse hídrico na absorção e no acúmulo de biomassa, o que reduz o "aproveitamento" do N aplicado naquele intervalo. Em termos de manejo, isso reforça que a eficiência do N em pastagens tropicais tende a ser maior quando a aplicação coincide com fases de crescimento ativo e condições ambientais favoráveis, e que o desenho de dose/fonte/época deve buscar maximizar a recuperação e minimizar perdas (Cassimiro *et al*., 2023).

4.4.3 O papel do Bacillus e interação com N

A inoculação com *Bacillus* (especialmente N72) não substituiu o N mineral em produtividade acumulada, mas modulou componentes fisiológicos e, em combinação com dose moderada de N, melhorou variáveis ligadas à eficiência de uso do fertilizante. Os *Bacillus* spp. são BPCP com ampla capacidade de promover crescimento e tolerância a estresses via produção de fitormônios, modulação de rotas hormonais e metabólitos, melhoria de aquisição de nutrientes e respostas antioxidantes; além disso, a formação de esporos favorece persistência em condições adversas, o que pode aumentar a estabilidade do efeito em campo (Etesami; Jeong; Glick, 2023).

Em capim-marandu a inoculação envolvendo *Bacillus* e outros BPCP demonstra aumento da biomassa e melhora de parâmetros fotossintéticos, inclusive com aplicação em área total, e em gramíneas tropicais como *Megathyrsus maximus* a inoculação foliar associada a doses de N pode elevar produção e atributos agronômicos/nutritivos, reforçando o conceito de "complemento ao N" (Freitas *et al*., 2023).

O fato de N72 isolado elevar fotossíntese/condutância/eficiência de carboxilação em um dos anos (águas 2025) sugere que o microrganismo pode ter atuado como bioestimulante, ampliando a capacidade funcional da folha; porém, sem suprimento adequado de N, esse ganho fisiológico pode não se converter integralmente em produtividade acumulada, porque a limitação de N (e/ou água) permanece como gargalo estrutural para expansão de área foliar, perfilhamento e acúmulo de MS (Bastidas *et al*., 2024). O melhor "custo-benefício fisiológico e de recuperação do N" tende a emergir quando BPCP é integrado a doses moderadas e bem

sincronizadas de N, visando aumentar a fração do N aplicado efetivamente internalizada pela planta (Di Sario *et al*., 2025).

4.4.4 *Reprogramação proteômica induzida por Bacillus* sp. N72 *ao longo dos cortes*

Ao longo de ambos os cortes, em 2024 e 2025, a inoculação com *Bacillus* sp. N72 em combinação com 40 kg N ha^{-1} promoveu consistentemente uma reprogramação proteômica coordenada na parte aérea do capim-marandu, caracterizada pelo enriquecimento de proteínas associadas ao metabolismo central do carbono, à geração mitocondrial de energia e à biossíntese proteica. Em 2024 e 2025, as plantas inoculadas apresentaram maior abundância de enzimas envolvidas na glicólise e no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), incluindo frutose-bisfosfato aldolase, enolase, fosfoglicerato quinase, piruvato desidrogenase, malato e isocitrato desidrogenases, aconitato hidratase e NADH desidrogenases (Tabelas Suplementares 1–4). Esse padrão indica reforço do metabolismo respiratório e do fluxo de carbono, sustentando a produção de ATP e a geração de esqueletos de carbono necessários para a assimilação de N (Aquino *et al*., 2021; Zhang *et al*., 2025). Paralelamente, o aumento na abundância de fosfoenolpiruvato carboxilase, RuBisco activase e proteínas relacionadas à montagem da Rubisco sugere maior capacidade fotossintética e funcionalidade cloroplastidial (Zayed *et al*., 2023; Zhou *et al*., 2022). Em conjunto, essas respostas indicam que a inoculação com *Bacillus* estabelece um núcleo metabólico conservado, centrado no acoplamento eficiente entre assimilação de carbono, produção de energia e metabolismo do N.

Além do metabolismo primário, as plantas inoculadas em ambos os anos exibiram enriquecimento de proteínas relacionadas à tradução, ao dobramento proteico e ao tráfego intracelular, incluindo proteínas ribossomais, fatores de iniciação e elongação da tradução, importinas, componentes de importação mitocondrial, como TOM40, e transportadores de metabólitos, juntamente com chaperonas como Hsp90/HSP83, CPN60, proteases Clp e proteínas ligantes luminais. Esse perfil reflete maior plasticidade do proteoma e controle de qualidade proteica, sustentando a atividade biossintética contínua em vez de uma resposta generalizada ao estresse (Siviya *et al*., 2025; Wei *et al*., 2023). O aumento coordenado da maquinaria traducional e da capacidade de maturação proteica sugere incorporação mais eficiente do N absorvido em proteínas funcionais, fornecendo uma base mecanística para a elevada eficiência de recuperação do N fertilizante observada em ambos os anos (Tabelas 7 e

8), uma vez que o uso efetivo do N depende da integração entre assimilação de N, metabolismo do carbono e síntese proteica (Navarro; Machado; Figueira, 2025; Ren *et al*., 2022).

Apesar dessa resposta central conservada, diferenças importantes emergiram entre os ciclos de rebrota. Em 2024, no segundo corte, o perfil proteômico das plantas inoculadas foi caracterizado principalmente pela otimização metabólica, com menor abundância de proteínas associadas à defesa contra estresse oxidativo e ao metabolismo compensatório de N em relação ao tratamento não inoculado com 40 kg N ha^{-1}. De fato, as plantas que receberam 40 kg N ha^{-1} sem inoculação apresentaram maior abundância de catalases, peroxidases, superóxido dismutase, glutationa transferase e enzimas envolvidas na remobilização de aminoácidos e na interconversão de N (Tabela Suplementar 1), sugerindo maior investimento em homeostase redox e ajuste metabólico (Tariq *et al*., 2025; Tsotetsi *et al*., 2022). Em contraste, as plantas inoculadas com *Bacillus* apresentaram uma configuração metabólica mais eficiente, com menor dependência de mecanismos de mitigação do estresse e maior alocação de recursos para processos associados ao crescimento. Essa mudança é coerente com o alto acúmulo de N (Tabela 4) e a elevada eficiência de recuperação do N fertilizante (Tabela 7) observados em 2024, indicando que a inoculação melhorou não apenas a disponibilidade de N, mas também sua utilização metabólica (Wei *et al*., 2023).

Em 2025, no sétimo corte, a resposta proteômica à inoculação com *Bacillus* expandiu-se para além da otimização metabólica, incluindo processos associados ao transporte de membrana, à organização estrutural e à sinalização. As plantas inoculadas apresentaram maior abundância de ATPases de membrana plasmática, bombas de prótons vacuolares, aquaporina PIP2.1, proteínas do citoesqueleto, como actina e tubulina, e enzimas relacionadas à parede celular (Tabelas Suplementares 3 e 4). Essas proteínas estão diretamente ligadas ao transporte de íons, à regulação do turgor, à condutividade hidráulica e à organização celular (Kumar *et al*., 2023; Liu *et al*., 2022; Tyerman *et al*., 2021), fornecendo uma base mecanística para a elevada condutância estomática e fotossíntese líquida observadas em 2025 (Tabela 9). O enriquecimento de proteínas relacionadas ao cálcio e de componentes de sinalização sugere ainda maior coordenação entre crescimento e respostas ambientais (Allan; Morris; Meisrimler, 2022). Notavelmente, essas alterações na parte aérea são coerentes com a elevada densidade radicular observada (Tabela 4), indicando que *Bacillus* sp. N72 promoveu maior integração entre a função radicular e o metabolismo da parte aérea, conectando a aquisição de nutrientes e água com a assimilação de carbono e o crescimento.

A comparação com o tratamento de 80 kg N ha^{-1} evidencia ainda mais a natureza distinta do estado metabólico induzido por *Bacillus*. Em ambos os anos, as plantas supridas com a maior dose de N apresentaram maior abundância de proteínas associadas ao metabolismo de aminoácidos, à interconversão de N, à desintoxicação redox e à renovação metabólica, incluindo aminotransferases, glutamina sintetase, aldeído desidrogenases, peroxirredoxinas e proteínas relacionadas à ubiquitina (Tabelas Suplementares 2 e 4). Esse maior investimento em processamento metabólico e manutenção relacionada ao estresse sugere que a maior disponibilidade de N aumenta a demanda por regulação bioquímica e homeostase, sem necessariamente intensificar a eficiência metabólica (Qaderi; Evans; Spicer, 2025). Em contraste, as plantas inoculadas com *Bacillus*, mesmo sob menor suprimento de N, exibiram um perfil proteômico mais coordenado, caracterizado pelo forte enriquecimento de proteínas relacionadas à tradução, sistemas de manutenção do proteoma e metabolismo carbono–energia. Isso indica uma mudança de um metabolismo dominado por renovação e ajuste para um metabolismo otimizado para biossíntese e crescimento (Chiaranunt; White, 2023; Turino Mattos; Valgas; Martins, 2023).

Em conjunto, esses resultados indicam que a inoculação com *Bacillus* sp. N72 promove uma estrutura metabólica conservada, centrada no metabolismo do carbono, na produção de energia e na síntese proteica, a qual é posteriormente integrada, em estádios mais avançados de rebrota, a processos de transporte de membrana, organização do citoesqueleto e sinalização. Essa integração progressiva fornece uma explicação mecanística para as respostas fisiológicas observadas ao longo dos anos, incluindo a elevada eficiência de recuperação do N fertilizante e o acúmulo de N em 2024, bem como o aumento da densidade radicular, da fotossíntese líquida e da condutância estomática em 2025. Nesse sentido, *Bacillus* sp. N72 melhora não apenas a eficiência de uso do N, mas também a coordenação mais ampla entre processos metabólicos, hidráulicos e estruturais que sustentam a produtividade vegetal sob menor aporte de N.

4.4.5 Integração entre proteômica vegetal e microbioma do solo

Os resultados obtidos indicam que a inoculação com bactérias promotoras de crescimento atuou de forma mais complexa do que um simples aumento direto da produtividade, promovendo ajustes metabólicos na planta e alterações na estrutura da comunidade microbiana do solo. Na análise proteômica, os tratamentos inoculados apresentaram mudanças na abundância de proteínas associadas ao metabolismo energético,

resposta ao estresse, transporte, metabolismo de aminoácidos, fotossíntese, modificação/degradação proteica e sistema antioxidante. Esse padrão sugere que a inoculação com *Bacillus* spp. modulou rotas fisiológicas relacionadas à eficiência metabólica e à aclimatação da planta, especialmente sob condições contrastantes de disponibilidade hídrica e suprimento nitrogenado. Essa resposta é coerente com estudos que demonstram que bactérias promotoras de crescimento podem alterar o proteoma vegetal por meio da regulação de proteínas ligadas à fotossíntese, metabolismo de carbono, defesa antioxidante, processamento proteico e tolerância ao estresse (Alberton *et al*., 2020; Rodríguez-Vázquez; Mesa-Marín, 2023b).

A maior abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo central e à resposta ao estresse nos tratamentos inoculados indica que o efeito das bactérias pode estar associado à reorganização das prioridades metabólicas da planta, favorecendo manutenção celular, estabilidade proteica e uso mais eficiente de recursos, em vez de necessariamente promover incrementos imediatos de crescimento. Esse comportamento ajuda a explicar a ausência de resposta produtiva uniforme à inoculação em algumas avaliações, uma vez que a atuação das BPCP pode ser fortemente dependente do estádio de crescimento, da disponibilidade de N e das condições ambientais. Em gramíneas, respostas proteômicas induzidas por bactérias benéficas frequentemente envolvem mecanismos de tolerância, homeostase redox e ajustes no metabolismo energético, os quais podem melhorar a resiliência fisiológica sem necessariamente resultar em aumento proporcional de biomassa em todos os ciclos (Alberton *et al*., 2020; Rodríguez-Vázquez; Mesa-Marín, 2023b).

A análise do microbioma do solo reforça essa interpretação. Embora o índice de Shannon tenha permanecido relativamente estável entre os tratamentos, a PCoA indicou alterações estruturais na comunidade bacteriana, com separação parcial entre o controle, os tratamentos fertilizados e os tratamentos inoculados com *Bacillus* spp. Além disso, foram observadas mudanças na abundância relativa de grupos como *Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Blastocatellia, Bacilli, Acidobacteriae, Chloroflexia* e KD4-96, bem como de gêneros e famílias como *Sphingomonas, Solirubrobacter, Microvirga, Chthoniobacter, Gaiella, Sphingomonadaceae, Micromonosporaceae e Xanthobacteraceae*. Esse padrão indica que a inoculação não necessariamente aumentou a diversidade total, mas modulou a composição relativa da comunidade rizosférica, o que é comum em sistemas nos quais o inoculante atua por seleção ecológica de grupos funcionais específicos.

Essas alterações são consistentes com estudos recentes demonstrando que a inoculação com bactérias promotoras de crescimento pode remodelar o microbioma rizosférico, afetando bactérias e fungos associados à ciclagem de nutrientes, crescimento vegetal e interação planta-solo (Cunha *et al*., 2024). Além disso, a adubação nitrogenada também pode modificar a estrutura da comunidade bacteriana, favorecendo determinados grupos microbianos e reduzindo a estabilidade ou diversidade em condições de maior entrada de N (Li *et al*., 2023). Assim, no presente estudo, a combinação entre inoculação e fertilização nitrogenada provavelmente atuou como filtro ecológico, alterando a composição do microbioma sem necessariamente modificar de forma expressiva a diversidade alfa.

4.5 Conclusão

A aplicação de 80 kg ha^{-1} N proporcionou maior produtividade de massa seca do capim-marandu, enquanto a associação de Bacillus sp. N72 com 40 kg ha^{-1} N aumentou a eficiência de recuperação do nitrogênio do fertilizante. Recomenda-se avaliar essa associação como alternativa para equilibrar produtividade e eficiência de uso do N, considerando a necessidade de validação de seus efeitos sobre a produção acumulada e a viabilidade econômica antes de sua adoção em escala comercial.

REFERÊNCIAS

ALBERTON, Dayane *et al.* What Did We Learn From Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)-Grass Associations Studies Through Proteomic and Metabolomic Approaches? **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 23 dez. 2020.

ALLAN, Claudia; MORRIS, Richard J.; MEISRIMLER, Claudia-Nicole. Encoding, transmission, decoding, and specificity of calcium signals in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 11, p. 3372–3385, 2 jun. 2022.

AMARAL, Danilo Silva *et al.* Nutritional imbalances and reduced forage production under intra-seasonal drought are alleviated by irrigation in tropical forage grasses. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 34925, 7 out. 2025.

AQUINO, João Pedro Alves *et al.* Plant growth-promoting bacteria improve growth and nitrogen metabolism in maize and sorghum. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 33, n. 3, p. 249–260, 1 set. 2021.

BARRIE, A.; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. **Mass spectrometry of soils.**, p. 1–46, 1996.

BASTIDAS, Mike *et al.* Optimizing nitrogen use efficiency of six forage grasses to reduce nitrogen loss from intensification of tropical pastures. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 367, p. 108970, 15 jun. 2024.

BOKULICH, Nicholas A. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 17 maio 2018.

BOLYEN, Evan *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, ago. 2019.

BRANCO, Jaisson dos Santos; JÚNIOR, Paulo Prates. Fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável de forragem. **Revista Edutec**, v. 3, n. 1, 23 jun. 2022.

CALLAHAN, Benjamin J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2016.

CANTARELLA, Heitor *et al.* Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. **Journal of Advanced Research**, Biotechnological and medical relevance of ureases. v. 13, p. 19–27, 1 set. 2018.

CASSIMIRO, Juliana Bonfim *et al.* Ammonia Volatilization and Marandu Grass Production in Response to Enhanced-Efficiency Nitrogen Fertilizers. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 837, 13 mar. 2023.

CHIARANUNT, Peerapol; WHITE, James F. Plant Beneficial Bacteria and Their Potential Applications in Vertical Farming Systems. **Plants**, v. 12, n. 2, p. 400, jan. 2023.

CUNHA, Izadora de Cássia Mesquita da *et al.* The interplay between the inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria and the rhizosphere microbiome and their impact on plant phenotype. **Microbiological Research**, v. 283, p. 127706, 1 jun. 2024.

DA PASCHOA, Roberta Pena *et al.* Early regulatory networks driving somatic embryogenesis in Saccharum spp. L. revealed by time-resolved proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 326, p. 105602, 20 abr. 2026.

DEBASTIANI, Giovana Lara *et al.* Biotechnological potential of *Bacillus* sp. S26 for alleviation of abiotic and biotic stresses in vine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 150, 7 abr. 2023.

DI SARIO, Luciana *et al.* Plant Biostimulants to Enhance Abiotic Stress Resilience in Crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 3, p. 1129, jan. 2025.

ETESAMI, Hassan; JEONG, Byoung Ryong; GLICK, Bernard R. Potential use of *Bacillus* spp. as an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. **Current Research in Biotechnology**, v. 5, p. 100128, 1 jan. 2023.

FERREIRA, Eric Batista; CAVALCANTI, Portya Piscitelli; NOGUEIRA, Denismar Alves. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues)**. , 5 out. 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/index.html>. Acesso em: 3 nov. 2025

FREITAS, Gabriela da Silva *et al.* Foliar Spray Inoculation with Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Nitrogen Doses in Megathyrsus maximus cv. BRS Zuri. **Agronomy**, v. 13, n. 4, 30 mar. 2023.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103764, 1 jan. 2021.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Enhancing agronomic efficiency and maize grain yield with *Azospirillum brasilense* inoculation under Brazilian savannah conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 134, p. 126471, 1 mar. 2022.

HEINRICHS, Reges *et al. Azospirillum* inoculation of "Marandu" palisade grass seeds: effects on forage production and nutritional status. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 2, p. 465–478, 6 mar. 2020.

KUMAR, Vipin *et al.* Effect of polyhalite on yield, nutrient uptake by wheat and soil properties (Annals of Plant and Soil Research). v. Annals of Plant and Soil Research 25, p. 59–63, 1 abr. 2023.

LI, Yuekun *et al.* Effects of nitrogen input on soil bacterial community structure and soil nitrogen cycling in the rhizosphere soil of Lycium barbarum L. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 10 jan. 2023.

LIU, Xiandong *et al.* Molecular-level understanding of metal ion retention in clay-rich materials. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 3, n. 7, p. 461–476, 14 jun. 2022.

MALAVOLTA, Eurípides. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira. **Piracicaba: Potafos**, 1997.

MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

NASAR, Jamal *et al.* Nitrogen fertilization coupled with foliar application of iron and molybdenum improves shade tolerance of soybean under maize-soybean intercropping. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 4 out. 2022.

NAVARRO, Bruno B.; MACHADO, Mauricio J.; FIGUEIRA, Antonio. Nitrogen Use Efficiency in Agriculture: Integrating Biotechnology, Microbiology, and Novel Delivery Systems for Sustainable Agriculture. **Plants**, v. 14, n. 19, 24 set. 2025.

OECD; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031**. *[S.l.]*: OECD, 2022.

OKSANEN, J. *et al.* **vegan: Community Ecology Package**. , 2026. Disponível em: <https://vegandevs.github.io/vegan/>

PAULO, Ezio Nalin de *et al.* **Nitrification Inhibitor 3,4-dimethylpyrazole Phosphate Improves Nitrogen Recovery and Accumulation in Cotton Plants by Reducing NO3- Leaching Under 15N-urea Fertilization**. Research Square, , 10 mar. 2021. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-297839/v1>. Acesso em: 14 mar. 2025

PEREZ-RIVEROL, Yasset *et al.* The PRIDE database at 20 years: 2025 update. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D543–D553, 6 jan. 2025.

QADERI, Mirwais M.; EVANS, Cameryn C.; SPICER, Madeleine D. Plant Nitrogen Assimilation: A Climate Change Perspective. **Plants**, v. 14, n. 7, p. 1025, jan. 2025.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. , 2023. Disponível em: <http://www.R-project.org/>

REN, Wen *et al.* iTRAQ-based quantitative proteomic analysis provides insight into the drought-stress response in maize seedlings. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9520, 9 jun. 2022.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Raquel; MESA-MARÍN, Jennifer. Plant responses to plant growth promoting bacteria: Insights from proteomics. **Journal of Plant Physiology**, v. 287, p. 154031, 1 ago. 2023.

SAKAI, Hidemitsu *et al.* Yield responses to elevated CO2 concentration among Japanese rice cultivars released since 1882. **Plant Production Science**, v. 22, n. 3, p. 352–366, 3 jul. 2019.

SANTOS, H. G. dos *et al.* **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 6. ed. *[S.l.]*: Embrapa Solos, 2025.

SARKIS, Leonardo Fernandes *et al.* Ammonia volatization from conventional and stabilized fertilizers, agronomic aspects and microbiological attributes in a Brazilian coffee crop system. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 8 dez. 2023.

SILVA, Dirceu Jorge; QUEIROZ, Augusto césar. **Análises de Alimentos - Métodos Químicos e Biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002.

SIVIYA, L. E. *et al.* Proteomic insights on root and tuber crops' response to abiotic stress—A review. **Crop Science**, v. 65, n. 6, p. e70193, 2025.

TARIQ, H. *et al.* Plant growth-promoting *Bacillus* strains modulate early soybean development via proteome remodeling. **BMC Plant Biology**, v. 26, n. 1, p. 178, 27 dez. 2025.

TELES, Nathalia *et al.* Pasture Degradation Estimates Through Field Data in the State of Goiás, Brazil. **Land Degradation & Development**, v. n/a, n. n/a, 2025.

THIENGO, Cassio Carlette *et al.* Nitrogen fertilization regulates crosstalk between marandu palisadegrass and Herbaspirillum seropedicae: An investigation based on 15N isotopic analysis and root morphology. **Environmental Research**, v. 249, p. 118345, 15 maio 2024.

TRIVELIN, P. C. O. *et al.* Evaluation of a 15N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 226–234, ago. 1994.

TSOTETSI, Teboho *et al. Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2482, jan. 2022.

TURINO MATTOS, Maria Laura; VALGAS, Ricardo Alexandre; MARTINS, José Francisco da Silva. Coinoculation with Growth-Promoting Bacteria Increases the Efficiency of Nitrogen Use by Irrigated Rice. **ACS Omega**, v. 8, n. 51, p. 48719–48727, 26 dez. 2023.

TYERMAN, Stephen D. *et al.* Adaptable and Multifunctional Ion-Conducting Aquaporins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 72, p. 703–736, 17 jun. 2021.

VAN RAIJ, Bernardo. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. *[S.l.]*: International Plant Nutrition Institute, 2011.

WEI, Lirong *et al.* A Proteomics Insight into Advancements in the Rice–Microbe Interaction. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1079, jan. 2023.

ZAYED, Omar *et al.* Nitrogen Journey in Plants: From Uptake to Metabolism, Stress Response, and Microbe Interaction. **Biomolecules**, v. 13, n. 10, p. 1443, out. 2023.

ZHANG, Xinwang *et al.* Proteomics analysis of nitrogen stress on the influence of carbon and nitrogen metabolism of flue-cured tobacco. **BMC Genomics**, v. 26, n. 1, p. 961, 27 out. 2025.

ZHOU, Ming *et al.* Proteomic Analysis Dissects Molecular Mechanisms Underlying Plant Responses to Phosphorus Deficiency. **Cells**, v. 11, n. 4, p. 651, jan. 2022.

5 SINERGISMO DA COINOCULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE E BACILLUS* SP. VIA FOLIAR E DOSES DE NITROGÊNIO NA PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA DE USO DO N EM *UROCHLOA BRIZANTHA* CV. MARANDU

Resumo

A adoção de práticas sustentáveis na pecuária exige maior eficiência no uso do nitrogênio (N), especialmente em pastagens tropicais como *Urochloa brizantha* cv. Marandu. O estudo teve como objetivo avaliar o sinergismo da coinoculação de *Azospirillum brasilense*, estirpes Ab-V5 + Ab-V6, e *Bacillus* spp., estirpes S26 e N72, associada às doses de 40 e 80 kg N ha^{-1} na forma de ureia (45% de N). O experimento foi conduzido em condições de campo durante dois anos agrícolas, em delineamento de blocos casualizados, com cinco tratamentos. Os tratamentos influenciaram significativamente o acúmulo de massa seca, com maior produtividade na dose de 80 kg N ha^{-1}. A associação da coinoculação com 40 kg N ha^{-1} manteve elevada produção, enquanto a coinoculação sem aplicação de N resultou em menor acúmulo. As variáveis determinadas por meio do ^{15}N apresentaram respostas dependentes do período de avaliação, com diferenças em NPFF, QNPFF e NRFF principalmente na seca de 2024 e nas águas de 2025. Observou-se maior participação do N-fertilizante nos tratamentos com maior dose de N e ganhos específicos na recuperação do nutriente com a coinoculação. Conclui-se que a coinoculação associada a 40 kg N ha^{-1} apresenta potencial para conciliar produtividade e eficiência de recuperação do N-fertilizante, embora seus efeitos variem conforme as condições ambientais e o período de avaliação.

Palavras – chave: Bactérias promotoras de crescimento de plantas; bioinsumos; nutrição mineral; biomassa forrageira; sustentabilidade agropecuária.

5.1 Introdução

A pecuária brasileira é fortemente dependente de pastagens, e espécies do gênero *Urochloa* ocupam grande parte das áreas cultivadas, sustentando sistemas extensivos e semi-intensivos. Entretanto, uma parcela expressiva dessas pastagens apresenta algum grau de degradação, geralmente associada ao manejo inadequado e à baixa reposição de nutrientes, o que limita a produtividade e compromete a sustentabilidade do sistema Nesse cenário, *Urochloa brizantha* cv. Marandu destaca-se pela ampla adaptação edafoclimática e elevada responsividade à adubação, sendo amplamente utilizada para a produção de forragem em diferentes regiões do Brasil (Hungria *et al*., 2021).

Entre os nutrientes, o nitrogênio (N) é o principal fator associado ao incremento de acúmulo de biomassa e à melhoria do valor nutritivo da forragem em gramíneas tropicais, por sustentar processos fisiológicos relacionados à expansão foliar, perfilhamento e eficiência

fotossintética. Contudo, a intensificação baseada em N enfrenta limitações econômicas e ambientais: além do custo, a ureia pode apresentar baixa eficiência devido a perdas por volatilização de amônia (NH_3), especialmente quando aplicada superficialmente em pastagens, afetando a recuperação do fertilizante e elevando o risco de impactos ambientais (Corrêa *et al*., 2021). Assim, apesar da adubação nitrogenada elevar a produtividade, existe um ponto de resposta marginal decrescente e uma necessidade prática de otimizar doses e estratégias para aumentar a eficiência de uso do N em Marandu (Sales *et al*., 2020).

Como alternativa/estratégia complementar ao manejo nitrogenado, a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) tem sido apontada como via promissora para aumentar a eficiência nutricional e a resiliência de gramíneas, reduzindo a dependência exclusiva de fertilizantes minerais. Esses microrganismos podem atuar por múltiplos mecanismos, incluindo produção de fitormônios, estímulo ao crescimento radicular, maior aquisição de nutrientes e aumento da tolerância a estresses (Backer *et al*., 2018).

No caso de *Azospirillum brasilense*, estudos em Marandu mostram potencial de incremento de massa seca e alterações em componentes de crescimento, especialmente quando associado a doses moderadas de N, indicando possível ganho em eficiência do sistema (Heinrichs *et al*., 2020). Para *Bacillus* spp., o interesse agronômico decorre de sua versatilidade metabólica e capacidade de favorecer o crescimento vegetal por diferentes vias, além de contribuir para a estabilidade/consistência de respostas em consórcios microbianos. Evidências recentes em *U. brizantha* indicam que a coinoculação pode melhorar parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese e refletir em ganhos de biomassa, reforçando a plausibilidade de sinergismo entre microrganismos com mecanismos complementares (Terra *et al*., 2024).

Em pastagens tropicais, ainda são limitados os estudos em condições de campo, com múltiplos cortes e avaliação integrada de produtividade, estado fisiológico, nutrição e, principalmente, eficiência e recuperação do N do fertilizante. Técnicas isotópicas com ^{15}N se destacam por permitir a quantificação direta do N derivado do fertilizante e a recuperação do N aplicado, trazendo robustez para interpretar interações entre microrganismos e adubação nitrogenada em gramíneas (Lima *et al*., 2016).

Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da coinoculação com BPCP (*Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e *Bacillus* spp. estirpes S26 e N72), associada a doses de N na forma de ureia, sobre o crescimento e a produtividade de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, bem como sobre a eficiência de uso e a recuperação do N-fertilizante

(^{15}N) aplicado, integrando variáveis fisiológicas e nutricionais em condições de campo durante dois anos agrícolas.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi realizado a campo, em área de formação de pastagem de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, nas safras 2023/2024 e 2024/2025, no campo experimental da FCAT/UNESP, Campus de Dracena (21º27’ S, 51º36’ O; 421 m). O solo foi classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, de textura arenosa (Santos *et al*., 2025), e seus atributos químicos (0–0,20 m) estão descritos na Tabela 1. Após a caracterização inicial, aplicou-se 1 t ha^{-1} de calcário dolomítico. A semeadura ocorreu em novembro de 2023, com 10 kg ha^{-1} de sementes puras e viáveis e adubação de base de 8 kg de N, 60 kg de P_2O_5 e 20 kg de K2O por hectare para o estabelecimento da forrageira. As análises laboratoriais seguiram Raij *et al*. (2001).

Tabela 1 - Atributos químicos e físicos do solo na instalação do experimento coletado na camada de 0-20 cm, Dracena - SP

pH	M.O	P	K	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al	H +Al	SB	CTC	V	m
$CaCl_2$	mg/dm^3			----------mmol$_c$/dm^3----------						---% ---	
4,6	12	1,0	1,7	8,5	1,7	2,0	21,0	12	33	36	14

Cu	Fe	Mn	S	Zn	B	Areia	Argila	Silte
		mg/dm^3					g/kg	
1,6	25,1	30,5	2,6	0,7	0,48	859	90	51

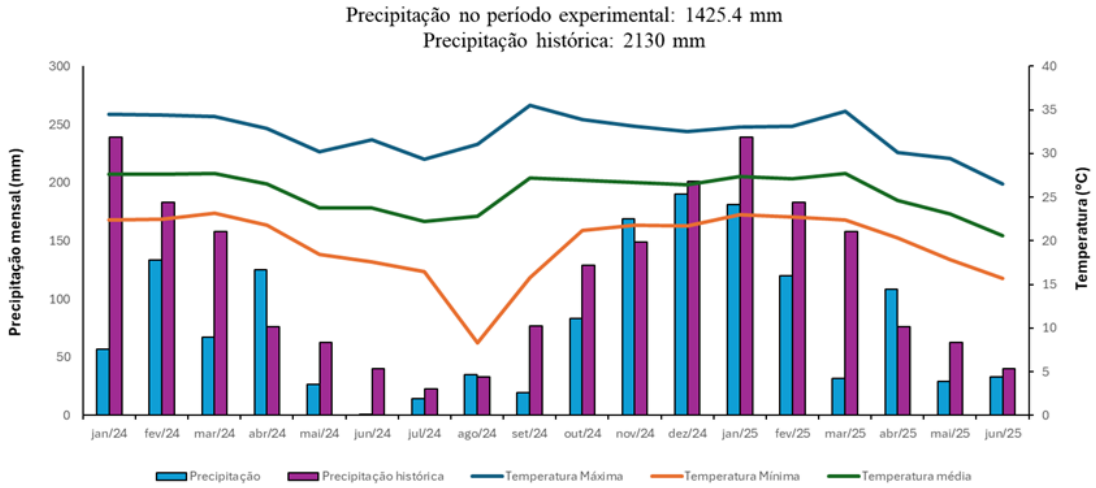
Nota: pH ($CaCl_2$) (0,01 mol L^{-1}) na relação solo: solução de 1:2,5; H+Al foi determinado pelo método Shoemaker–McLean–Pratt (SMP); P, Ca^{2+}, Mg^{2+} e K^+: extração por resina trocadora de íons; MO: teor de matéria orgânica do solo (Walkley-Black); S–SO_4^{2-}: extração com $Ca(H_2PO_4)_2$ 0,01 mol L^{-1}; B: ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 0,125%) foi extraído com água quente; Cu, Fe, Mn e Zn: extração com DTPA; soma de bases (SB): $Ca^{2+} + Mg^{2+} + K^+$; CTC: capacidade de troca de cátions a pH 7 (SB + H+Al); V% (saturação por bases): [(SB/CTC) × 100]; e distribuição granulométrica (areia, silte e argila) pelo método do densímetro. Fonte: Própria autora.

5.2.2 Condições climáticas

A área apresenta clima tropical úmido do tipo Aw (Köppen), com verão chuvoso e inverno seco. No ano agrícola 2023/24, a precipitação acumulada foi de 922 mm e a temperatura média anual de 26 °C; em 2024/25, registraram-se 503 mm e 25 °C. As temperaturas mínima e

máxima foram respectivamente de 19 °C e 33 °C, respectivamente. As informações meteorológicas foram obtidas de estação automatizada do Centro de Climatologia da UNESP/FCAT, em Dracena (Figura 1).

Figura 1 - Precipitação pluvial mensal e médias históricas, e temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período experimental. Dracena, SP, 2024/2025. Dados obtidos da estação meteorológica da UNESP/FCAT – Dracena



Fonte: Própria autora.

5.2.3 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições e cinco tratamentos, totalizando 20 unidades experimentais. Cada parcela apresentou 4,0 m de comprimento por 3,0 m de largura, perfazendo 12 m². A descrição dos tratamentos está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos e quantidades de fertilizantes aplicados no experimento

Descrição
T1 - Controle (sem adubação nitrogenada)
T2 - 80 kg N ha^{-1} sem inoculação
T3 - 40 kg N ha^{-1} sem inoculação
T4 - 40 kg N ha^{-1} + *Azospirillum brasilense* (AZ) + *Bacillus* sp. S26 (S26) + *Bacillus* sp. N72 (N72)
T5 - *Azospirillum brasilense* (AZ) + *Bacillus* sp. S26 (S26) + *Bacillus* sp. N72 (N72)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O nitrogênio foi fornecido na forma de ureia (45% N). As doses de 40 e 80 kg N ha^{-1} foram parceladas em duas aplicações de mesma magnitude, resultando em quatro adubações ao longo dos dois anos agrícolas (dezembro/2023, janeiro/2024, dezembro/2024 e janeiro/2025).

O estudo compreendeu nove cortes de cultivo: fevereiro/2024, abril/2024, maio/2024, outubro/2024, dezembro/2024, janeiro/2025, fevereiro/2025, abril/2025 e maio/2025.

Para quantificar a contribuição do N proveniente do solo e do fertilizante, bem como a absorção pela forrageira, empregou-se a técnica de diluição isotópica com ^{15}N. Utilizou-se ureia enriquecida (1,19% de excesso de átomos de ^{15}N) e ureia não marcada (controle isotópico), aplicadas nas unidades experimentais. O ^{15}N foi distribuído em uma microparcela de 0,5 m × 1,0 m, demarcada com estacas de madeira, instalada na área útil de cada parcela após o corte do primeiro corte (fevereiro/2024).

No quinto corte (dezembro/2024), após o corte de padronização que marcou o início do segundo ano experimental, realizou-se adubação a lanço com 60 kg P_2O_5 ha^{-1} (superfosfato simples, 18%) e 40 kg K_2O ha^{-1} (cloreto de potássio, 60%).

5.2.4 Produto aplicado

A estirpe de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) foi obtida comercialmente (inoculante líquido MASTERFIX L Gramíneas, Stoller; 2 × 10^8 UFC mL^{-1}). Já as estirpes *Bacillus* sp. S26 e N72 foram isoladas no Laboratório da Univates, em Lajeado–RS (Debastiani *et al.*, 2023). As bactérias foram mantidas em ágar nutriente e multiplicadas em caldo nutriente KASVI, preparado conforme o fabricante (pH 7,2 ± 0,2), esterilizado em autoclave (121 °C, 15 min) e incubado a 28 °C por 24 h sob agitação (120 rpm). Para a aplicação foliar, utilizou-se 400 mL ha^{-1} da solução bacteriana (concentração mínima de 2 × 10^8 UFC mL^{-1}), em volume de calda de 200 L ha^{-1}.As pulverizações ocorreram 10 dias após o corte de uniformização e após o primeiro corte (jan/2024 e mar/2024), ao final do dia e sob temperaturas amenas; no segundo ano, repetiu-se o procedimento (dez/2024 e jan/2025). A aplicação dos tratamentos foi realizada com pulverizador costal elétrico, utilizando pressão constante e volume de calda de 200 L ha^{-1}.

5.2.5 Amostragem de plantas e concentração de nutrientes

Antes de cada corte, a altura das plantas foi medida com régua milimetrada. Foram conduzidos nove cortes, abrangendo períodos seco e chuvoso, realizando-se os cortes quando a pastagem atingiu aproximadamente 40 cm, com rebaixamento para 20 cm acima do solo. A estimativa de massa seca da parte aérea foi obtida com quadrado amostrador de 0,5 m^2, e o corte

da área interna foi feito com ceifadeira. Após a colheita, o material foi pesado e separado em lâmina foliar e colmo + bainha; em seguida, as frações foram secas em estufa com circulação forçada a 65 °C até peso constante (Silva; Queiroz, 2002), pesadas em balança de precisão e moídas em moinho tipo Wiley (peneira de 1 mm). O teor de N total foi determinado por digestão sulfúrica e destilação pelo método semi-micro Kjeldahl. As concentrações de macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Zn, Fe, Mn e Cu) foram quantificadas conforme (Malavolta, 1997)). O acúmulo de nutrientes na forragem foi calculado pela multiplicação da concentração pelo rendimento de massa seca, considerando os períodos das águas (abr/2024 e fev/2025) e da seca (out/2024 e mai/2025).

5.2.6 Quantificação do N fixado e proveniente do fertilizante e do solo

A colheita do material vegetal para determinação de ^{15}N foi realizada na parte aérea da forrageira, cortada a 20 cm do solo, no 2º e 4º cortes, utilizando um quadro amostrador de 25 × 50 cm e foice de arroz. As amostras foram secas, finamente moídas e peneiradas (2 mm), acondicionadas em cápsulas de estanho e pesadas em balança analítica de alta precisão. A razão isotópica de ^{15}N foi determinada por espectrometria de massas acoplada a analisador elementar de N (IRMS; HYDRA 20-20 ANCA–GLS, Sercon), conforme (Barrie; Prosser, 1996). Para controle de qualidade, utilizou-se uma amostra padrão com abundância natural de ^{15}N (0,366%) a cada dez amostras.

O acúmulo de ^{15}N e o enriquecimento na biomassa foram calculados com base na abundância isotópica da ureia-^{15}N e na variação natural do isótopo (0,3663%), conforme IAEA (2001). A partição do N na parte aérea seguiu (Galindo *et al*., 2021a; Paulo *et al*., 2021; Trivelin *et al*., 1994), estimando-se: (i) N acumulado (AN = N × MSPA); (ii) porcentagem de N na planta derivado do fertilizante (%NPFF), pelo princípio de diluição isotópica; (iii) quantidade de N derivado do fertilizante (QNPFF = %NPFF × AN / 100); (iv) N derivado do solo (QNPFS = AN − QNPFF) e sua porcentagem (%NPFS = QNPFS/AN × 100); e (v) eficiência de recuperação do fertilizante (%NRFF), calculada pela relação entre o N derivado do fertilizante acumulado na planta e a dose de N marcada aplicada.

5.2.7 Capacidade fotossintética

As trocas gasosas foram avaliadas por medições não destrutivas em folhas, utilizando analisador de gás infravermelho (IRGA; LI-6400, LI-COR Inc., EUA), sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de 1.800 μmol m^{-2} s^{-1}, concentração de CO_2 de 380 μmol mol^{-1} e temperatura foliar entre 21 e 25 °C, conforme (Roscher *et al*., 2011; Sakai *et al*., 2019). Determinaram-se: assimilação líquida de CO_2 (*A*), transpiração (*E*), condutância estomática (*g*s), CO_2 interno (*Ci*) e eficiências do uso da água instantânea e intrínseca (*WUEt* e *WUEi*). Foram realizadas duas leituras por parcela, na terceira folha recém-expandida.

5.2.8 Densidade de raiz

Foi avaliado a densidade de raízes do sistema radicular ao final do segundo ano agrícola. A profundidade de amostragem foi de 0 – 20 cm por meio da coleta do solo + raízes com trado holandês. Após, as raízes foram lavadas sobre uma peneira para remoção do solo e secas a 65ºC até peso constante. Os dados foram expressos em g dm^{-3}.

5.2.9 Análise estatística

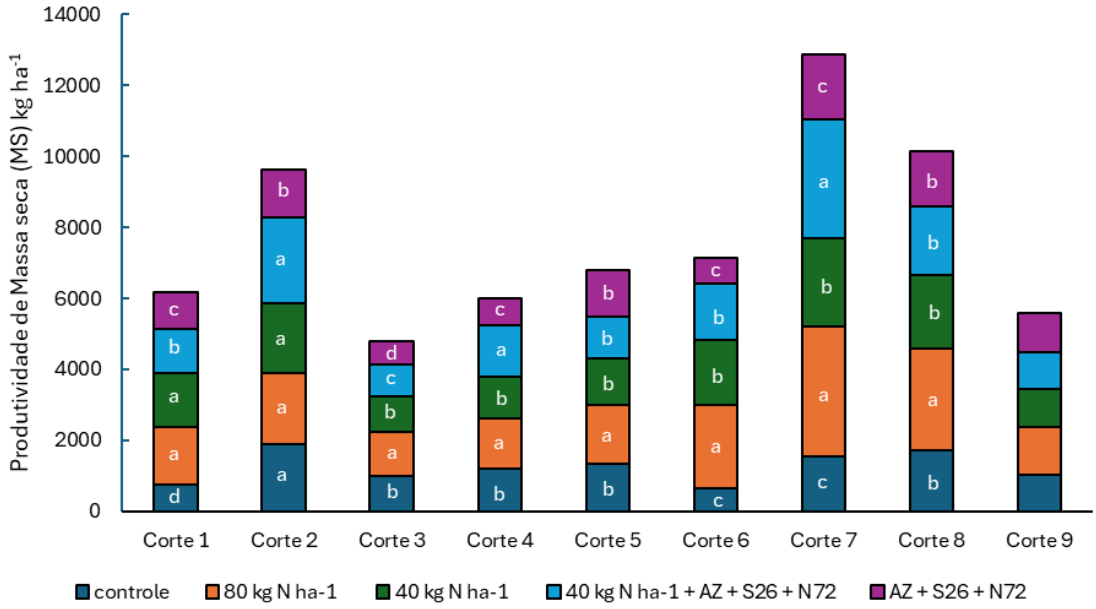
As análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2023). Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram testados usando Shapiro–Wilk e O'Neill–Mathews, respectivamente. O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$; pacote ExpDes.pt) foi utilizado para agrupar as médias dos tratamentos (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2021).

5.3 Resultados

5.3.1 Produtividade de massa seca e raiz

A produtividade de massa seca do capim-marandu variou entre tratamentos ao longo dos cortes (Figura 2), com diferenças estatísticas dentro de cada corte ($p \leq 0,05$).

Figura 2 - Produtividade de massa seca (MS) do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no período experimental de dois anos agrícolas (2023/2024 e 2024/2025), sob inoculação em área total com bactérias e doses de N. Os cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8 referem-se ao período das águas, enquanto os cortes 4, 5 e 9 referem-se ao período das secas. Tratamentos: T1 – controle (sem inoculação e sem N); T2 – 80 kg N ha^{-1}, sem inoculação; T3 – 40 kg N ha^{-1}, sem inoculação; T4 – 40 kg N ha^{-1} + *Azospirillum brasilense* (AZ) + *Bacillus* sp. S26 (S26) + *Bacillus* sp. N72 (N72); T5 – *Azospirillum brasilense (AZ) + Bacillus sp. S26 (S26) + Bacillus sp. N72 (N72)*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos dentro de cada corte ($p \leq 0,05$) pelo teste Tukey.



Fonte: Própria autora.

Considerando o acúmulo de massa seca ao final do primeiro ano agrícola (2023/24), observou-se efeito de tratamentos ($p \leq 0,01$), com maior produtividade em 80 kg N ha^{-1} (7.943,9 kg ha^{-1}) e 40 kg N ha^{-1} + coinoculação (7.151,8 kg ha^{-1}), enquanto coinoculação sem N apresentou menor acúmulo (5.122,8 kg ha^{-1}) (Tabela 3). No segundo ano agrícola (2024/25), também houve efeito de tratamentos ($p \leq 0,01$), com 80 kg N ha^{-1} apresentando a maior produtividade acumulada (10.233,6 kg ha^{-1}), seguido por 40 kg N ha^{-1} e 40 kg N ha^{-1} + coinoculação (7.476,1 e 7.879,7 kg ha^{-1}, respectivamente), enquanto controle e coinoculação sem N mantiveram os menores valores (Tabela 3). A densidade de raízes na camada de 0–0,20 m não foi afetada pelos tratamentos ($p > 0,05$), variando de 20,30 a 28,11 g dm^{-3}.

Tabela 3 - Produtividades acumulada de massa seca do capim marandu (kg ha^{-1}) e densidade de raiz (g dm^{-3}), cultivado a campo, em Dracena – SP, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72), em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Ano agrícola 2023/24	Ano agrícola 2024/25	Raiz
	kg ha^{-1}		g dm^{-3}
T1- controle	6166,9 b	4939,7 c	20,30
T2- 80 kg N ha^{-1}	7943,9a	10233,6 a	23,20
T3- 40 kg N ha^{-1}	6998,7 ab	7476,1 b	26,20
T4- T3 + AZ + S26 + N72	7151,8 a	7879,7 b	26,94
T5- AZ + S26 + N72	5122,8 c	5248,6 c	28,11
Média	6676,0	7155,0	25,0
Pr>F	**	**	ns
C.V. (%)	6,36	10,32	15,75

Nota: Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).**Significativo a $p \leq 0,01$. ns = não siginificativo. Ano agrícola 2023/24 compreende os cortes 1, 2, 3, 4 e 5. Ano agrícola 2024/25 compreende os cortes 6, 7, 8 e 9. Raiz foi avaliada no final do experimento após o corte 9. Raízes coletadas na profundidade de 0-20 cm. Fonte: Própria autora.

5.3.2 Altura de plantas

Em 2024, não houve efeito de tratamentos para altura em nenhuma das avaliações ($p > 0,05$) (Tabela 4). Em 2025, foi detectado efeito significativo no período das águas ($p \leq 0,01$), com maior altura em 80 kg N ha^{-1}, 40 kg N ha^{-1} e coinoculação + N (76,0–80,7 cm) em comparação ao controle e coinoculação sem N (64,6 e 67,8 cm) (Tabela 4). Nas demais avaliações de 2025, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$).

5.3.3 Lâmina foliar

A porcentagem de lâmina foliar (%LF) não foi influenciada pelos tratamentos nos períodos e anos avaliados ($p > 0,05$) (Tabela 5). Para a relação lâmina foliar:colmo (LF/CM), houve efeito de tratamentos no período da seca de 2024 ($p \leq 0,01$), com o controle (T1) apresentando maior LF/CM (7,3) em relação aos demais tratamentos (2,6–3,6) (Tabela 5). Nas demais combinações de período/ano, LF/CM não diferiu entre tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 4 - Altura do capim marandu cultivado a campo, em Dracena – SP, no período de 2024 e 2025, sob inoculação ou não, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) *e Bacillus* sp. (S26 e N72) em associação a adubação nitrogenada. nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Janeiro a Dezembro/2024				
	Período das Águas			Período da Seca	
	cm				
T1- controle	49,2	54,6	43,6	37,1	46,5
T2- 80 kg N ha^{-1}	53,2	55,4	45,6	38,0	48,8
T3- 40 kg N ha^{-1}	50,9	53,8	43,7	33,8	47,8
T4- T3 + AZ + S26 + N72	49,1	53,7	43,2	39,6	44,2
T5- AZ + S26 + N72	54,5	51,2	43,4	34,8	44,8
Média	51,3	53,7	43,9	36,6	46,4
Pr>F	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	11,36	6,1	6,0	8,5	9,2

Tratamento	Janeiro a Maio/2025			
	Período das Águas		Período da Seca	
	cm			
T1- controle	39,4	64,6 b	39,1	49,8
T2- 80 kg N ha^{-1}	50,4	80,7 a	39,6	50,5
T3- 40 kg N ha^{-1}	45,0	76,0 a	40,6	50,8
T4- T3 + AZ + S26 + N72	45,7	78,5 a	40,0	52,9
T5- AZ + S26 + N72	40,9	67,8 b	38,1	45,5
Média	44,2	73,5	39,4	49,9
Pr>F	ns	**	ns	ns
C.V. (%)	11,2	5,0	6,6	11,2

Nota: Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).**Significativo a $p \leq 0,01$. Período das Águas refere aos cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8. Período da Seca refere-se aos cortes 4, 5 e 9. Fonte: Própria autora.

Tabela 5 - Razão de lâmina foliar e colmo (LF/CM) e porcentagem de lâmina foliar (% LF) do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, no período das águas e seca no ano de 2024 e 2025, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72) em associação a adubação nitrogenada, nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Janeiro a Dezembro/2024				Janeiro a Maio/2025			
	Período das Águas		Período da Seca		Período das Águas		Período da Seca	
	LF/CM	% LF	LF/CM	% LF	LF/CM	% LF	LF/CM	% LF
T1- controle	2,3	68,6	7,3 a	83,0	1,5	60,0	2,10	65,90
T2- 80 kg N ha^{-1}	2,6	70,5	3,6 b	81,10	1,2	56,4	3,00	74,40
T3- 40 kg N ha^{-1}	2,1	66,2	3,0 b	77,60	1,2	55,8	2,60	72,40
T4- T3 + AZ + S26 + N72	2,4	68,8	2,8 b	76,60	1,10	52,50	2,50	71,70
T5- AZ + S26 + N72	2,5	74,2	2,6 b	61,80	1,20	54,80	2,80	72,60
Média	2,4	69,7	3,89	76,00	1,29	55,90	2,66	71,46
Pr>F	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	15,92	7,00	32,85	21,39	16,59	6,82	25,33	7,77

Nota: Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).**Significativo a $p \leq 0,01$. ns = não siginificativo. Período das Águas refere aos cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8. Período da Seca refere-se aos cortes 4, 5 e 9. Fonte: Própria autora.

5.3.4 *Eficiência de uso e recuperação do* N

No período das águas 2024, não houve efeito de tratamentos para o acúmulo de N (AN), NPFF, NRFF, QNPFS e %NPFS ($p > 0,05$), porém a quantidade de N proveniente do fertilizante (QNPFF) diferiu entre tratamentos ($p \leq 0,05$), com maior valor em 40 kg N ha^{-1} (4,1 kg ha^{-1}), seguido por coinoculação + N (3,2 kg ha^{-1}), e menor valor em 80 kg N ha^{-1} (2,4 kg ha^{-1}) (Tabela 6). No período da seca (corte 4), houve efeito de tratamentos para NPFF, QNPFF, NRFF, QNPFS e NPFS ($p \leq 0,01$). O tratamento 40 kg N ha^{-1} apresentou maior NPFF (2,0%) e QNPFF (0,4 kg ha^{-1}), enquanto coinoculação + N apresentou maior QNPFS (18,3 kg ha^{-1}) em comparação a 80 kg N ha^{-1} e 40 kg N ha^{-1} (15,4–15,5 kg ha^{-1}).

Tabela 6 - Dados isótopos N15 do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72), no período de 2024, em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Período das Águas					
	AN	NPFF	QNPFF	EFREC	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	35,9	7,7	2,4 b	12,2	30,2	92,2
T3- 40 kg N ha^{-1}	36,7	11,4	4,1 a	10,4	32,6	88,6
T4- T3 + AZ + S26 + N72	40,2	9,0	3,2 ab	16,1	34,2	90,96
Média	37,6	9,41	3,27	12,89	32,32	90,58
Pr>F	ns	ns	*	ns	ns	ns
C.V. (%)	10,2	32,7	22,93	21,37	21,62	3,39
Tratamento	Período da Seca					
	AN	NPFF	QNPFF	EFREC	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	15,6	1,4 b	0,2 b	1,1 a	15,4 b	98,80 a
T3- 40 kg N ha^{-1}	15,1	2,0 a	0,4 a	1,0 a	15,5 b	97,71 b
T4- T3 + AZ + S26 + N72	16,2	1,5 b	0,1 c	0,9 b	18,3 a	97,77 a
Média	15,65	1,69	0,28	1,03	16,45	98,42
Pr>F	ns	**	**	**	**	**
C.V. (%)	13,54	12,2	6,51	3,19	4,15	0,36

Nota: Médias seguidas por letras diferentes AN coluAN diferem entre si pelo teste Tukey. *Significativo a $p \leq 0,05$. ns = não significativo. Fonte de N: ureia. AN: Acúmulo de N; NPFF: Nitrogênio AN Planta Fornecido pelo Fertilizante; QNPF: Quantidade de Nitrogênio Fornecido pelo Fertilizante; NRFF: Nitrogênio Recuperado Fornecido pelo Fertilizante; QNPFS: Quantidade do Nitrogênio AN Planta Fornecido pelo Solo; NPFS: Nitrogênio AN Planta Fornecido pelo Solo. Técnica de diluição isotópica com 15N enriquecido a 1,19%. Período das Águas refere ao corte 2. Período da Seca refere-se ao corte 4. Fonte: Própria autora.

No período das águas 2025, observou-se efeito de tratamentos para AN ($p \leq 0,05$), NPFF ($p \leq 0,01$), QNPFF ($p \leq 0,01$), NRFF ($p \leq 0,05$) e QNPFS ($p \leq 0,05$). O maior AN ocorreu em

80 kg N ha^{-1} (30,8 kg ha^{-1}), com 40 kg N ha^{-1} apresentando o menor valor (20,3 kg ha^{-1}), e coinoculação + N intermediário (25,5 kg ha^{-1}) (Tabela 7). Para NPFF e QNPFF, 80 kg N ha^{-1} apresentou os maiores valores (29,6% e 0,18 kg ha^{-1}), seguido por coinoculação + N (22,8% e 0,12 kg ha^{-1}) e 40 kg N ha^{-1} (18,1% e 0,09 kg ha^{-1}). A NRFF foi maior em coinoculação + N (0,63%) em relação a 80 kg N ha^{-1} e 40 kg N ha^{-1} (0,45–0,46%). No período da seca 2025 não foram observadas diferenças entre tratamentos para as variáveis isotópicas ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Dados isótopos N15 do capim marandu, cultivado a campo, em Dracena – SP, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72), no período de 2025, em associação a adubação nitrogenada nas doses 40 e 80 kg N ha^{-1}

Tratamento	Período das Águas					
	AN	NPFF	QNPFF	EFREC	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	30,8 a	29,6 a	9,12 a	22,7 ab	21,7	70,4 c
T3- 40 kg N ha^{-1}	20,3 b	18,1 c	3,66 b	18,3 b	16,6	81,9 a
T4- T3 + AZ + S26 + N72	25,5 ab	22,8 b	5,87 b	29,3 a	19,6	77,19 b
Média	25,53	23,5	6,21	23,43	19,3	76,46
Pr>F	*	*	*	*	ns	*
C.V. (%)	13,23	8,69	16,45	20,16	13,01	2,67
Tratamento	Período da Seca					
	AN	NPFF	QNPFF	EFREC	QNPFS	NPFS
	kg/ha	%	kg/ha	%	kg/ha	%
T2- 80 kg N ha^{-1}	13,35	4,39	0,59	1,49	12,75	95,6
T3- 40 kg N ha^{-1}	11,3	3,32	0,38	1,93	10,91	96,6
T4- T3 + AZ + S26 + N72	9,64	2,93	0,28	1,4	9,36	97
Média	11,43	3,54	0,41	1,60	11	96,4
Pr>F	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	19,49	25,14	41,68	45,44	18,81	0,93

Nota: Médias seguidas por letras diferentes na diferem entre si pelo teste Tukey. *Significativo a $p \leq 0,05$. ns = não significativo. Fonte de N: ureia. AN: Acúmulo de N; NPFF: Nitrogênio AN Planta Fornecido pelo Fertilizante; QNPF: Quantidade de Nitrogênio Fornecido pelo Fertilizante; NRFF: Nitrogênio Recuperado Fornecido pelo Fertilizante; QNPFS: Quantidade do Nitrogênio AN Planta Fornecido pelo Solo; NPFS: Nitrogênio AN Planta Fornecido pelo Solo. Técnica de diluição isotópica com 15N enriquecido a 1,19%. Período das Águas refere ao corte 7, período da seca refere ao corte 9. Fonte: Própria autora.

5.3.5 Análise multivariada do estado nutricional

No período das águas de 2024, a análise de correlação de Pearson entre a massa seca acumulada (MS) e os teores nutricionais foliares indicou predominância de associações não

significativas (Figura 3). A principal relação observada foi a correlação negativa entre MS e Zn foliar (r = -0,60). Entre os nutrientes, destacaram-se correlações significativas entre N e P, de caráter negativo (r = -0,50), e entre N e Ca, de caráter positivo (r = 0,53), além da associação positiva entre K e Fe (r = 0,59) e entre Mn e Zn (r = 0,51).

Figura 3 - Matriz de correlação de Pearson entre os nutrientes na parte aérea do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no período das águas de 2024, sob coinoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), *Bacillus* sp S26 e N72 e adubação nitrogenada. Os valores nas células representam o coeficiente de correlação (r), e os asteriscos indicam significância estatística (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; ns = não significativo). A escala de cores indica a direção e intensidade da correlação (vermelho = positiva; verde = negativa), sendo cores mais intensas associadas a maior magnitude de |r|

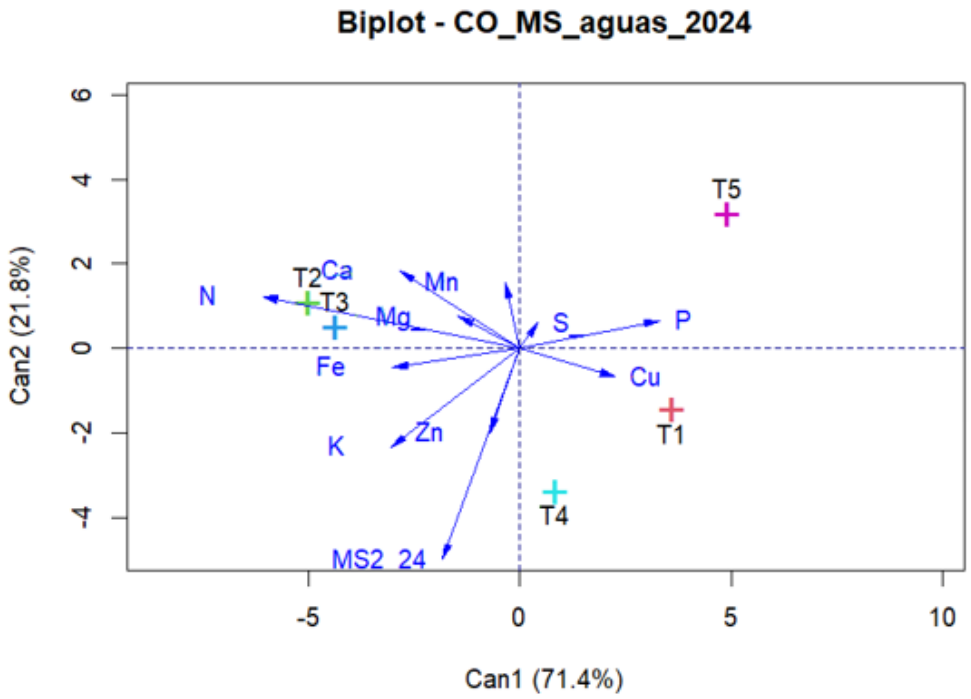


Fonte: Própria autora.

Na análise discriminante canônica dos teores foliares no período das águas de 2024, os dois primeiros eixos canônicos explicaram conjuntamente 93,2% da variação multivariada (Figura 4). O Can1 foi o principal eixo de separação e contrastou, à esquerda, os tratamentos T2 e T3, associados principalmente aos maiores vetores de N, Ca, Fe, Mg e Mn, com os tratamentos posicionados à direita, especialmente T1 e T5, mais relacionados aos vetores de P, S e Cu.. O Can2, por sua vez, diferenciou principalmente T5, posicionado no quadrante superior direito, de T4, localizado no quadrante inferior. O vetor de massa seca em 2024 (MS2_24) apresentou forte projeção no quadrante inferior esquerdo, em direção oposta a P, S e Cu,

sugerindo que o maior desempenho produtivo não esteve necessariamente associado ao aumento relativo desses nutrientes no tecido foliar.

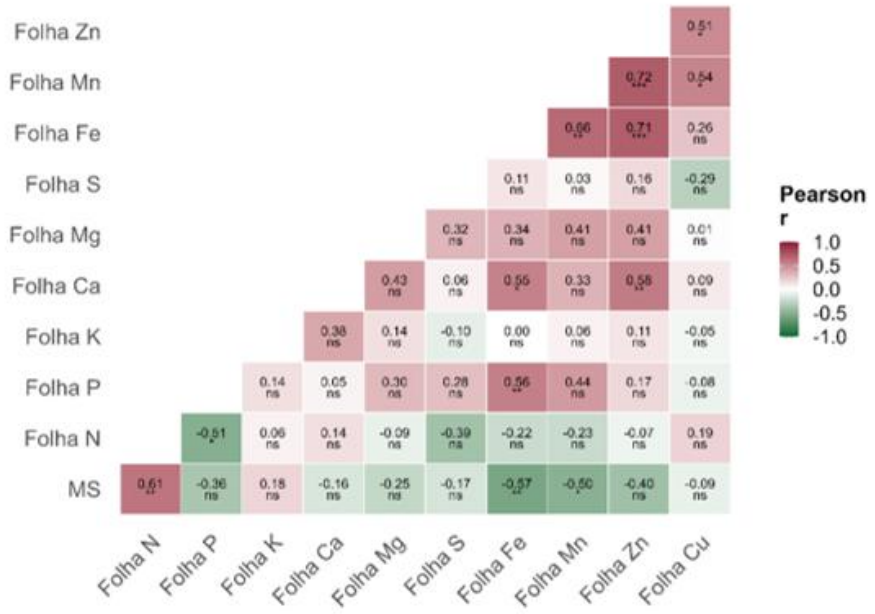
Figura 4 - Biplot da análise discriminante canônica (ADC) aplicada aos teores foliares de nutrientes e à massa seca do capim-marandu no período das águas de 2024. Os eixos Can1 e Can2 representam, respectivamente, 71,4% e 21,8% da variação discriminante, totalizando 93,2% da variabilidade multivariada explicada. Os pontos indicam os tratamentos, enquanto os vetores representam as variáveis nutricionais e produtivas incluídas na análise. A direção e o comprimento dos vetores indicam sua contribuição para a discriminação entre tratamentos, e a proximidade entre pontos e vetores sugere maior associação multivariada com as respectivas variáveis. As linhas tracejadas indicam a origem dos eixos canônicos



Fonte: Própria autora.

No período das águas de 2025, o heatmap evidenciou um padrão nutricional mais definido em relação à produtividade, com correlação positiva significativa entre a massa seca e o teor foliar de N (r = 0,61) (Figura 5). Em sentido oposto, a MS apresentou correlações negativas com Fe (r = -0,57) e Mn (r = -0,50). Entre os nutrientes, destacaram-se associações positivas entre Fe e Mn (r = 0,66), Fe e Zn (r = 0,71), Mn e Zn (r = 0,72), P e Fe (r = 0,56), Ca e Fe (r = 0,55) e Ca e Zn (r = 0,58). Por outro lado, a correlação negativa entre N e P (r = -0,51) demonstra que o aumento do N foliar não foi acompanhado proporcionalmente pelo P, reforçando a existência de ajustes no balanço nutricional da planta.

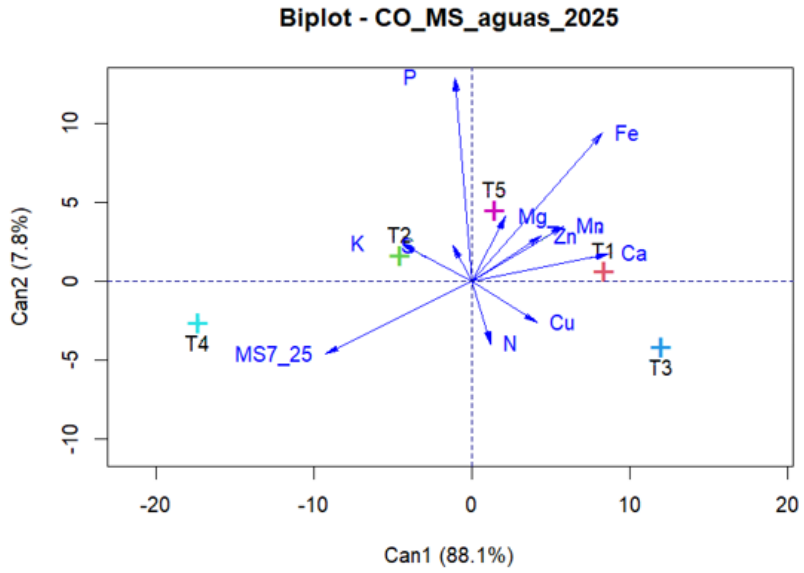
Figura 5 - Matriz de correlação de Pearson entre os nutrientes na parte aérea do capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) no período das águas de 2025, sob coinoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6), *Bacillus* sp S26 e N72 e adubação nitrogenada. Os valores nas células representam o coeficiente de correlação (r), e os asteriscos indicam significância estatística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns = não significativo). A escala de cores indica a direção e intensidade da correlação (vermelho = positiva; verde = negativa), sendo cores mais intensas associadas a maior magnitude de |r|



Fonte: Própria autora.

Na análise discriminante canônica dos teores foliares no período das águas de 2025, os dois primeiros eixos explicaram 95,9% da variação multivariada, com forte predominância do Can1 (88,1%) (Figura 6). O Can1 separou nitidamente os tratamentos posicionados à esquerda, especialmente T4 e, em menor intensidade, T2, daqueles localizados à direita, como T1, T3 e T5. O tratamento T4 apresentou maior distanciamento dos demais e esteve associado à direção do vetor de massa seca (MS7_25), porém em oposição aos vetores de Fe, Ca, Mn, Zn, Mg e P. O T2 mostrou maior proximidade com K, enquanto T5 foi discriminado no quadrante superior, associado principalmente a P, Mg, Zn, Mn e Fe. Já T1 apresentou relação mais próxima com Ca, Zn e Mn, e T3 foi separado no quadrante inferior direito, em maior associação com N e Cu.

Figura 6 - Biplot da análise discriminante canônica (ADC) aplicada à produtividade de massa seca e aos teores foliares de nutrientes do capim-marandu no período das águas de 2025. Os eixos canônicos Can1 e Can2 explicaram, respectivamente, 88,1% e 7,8% da variação discriminante, totalizando 95,9% da variabilidade multivariada. Os pontos representam os tratamentos, enquanto os vetores indicam as variáveis produtivas e nutricionais utilizadas na análise. A direção e o comprimento dos vetores expressam sua contribuição relativa para a separação dos tratamentos, e a proximidade entre pontos e vetores indica maior associação multivariada entre tratamento e variável. As linhas tracejadas representam a origem dos eixos canônicos



Fonte: Própria autora.

5.3.6 Capacidade fotossintética

No período das águas de 2024 (corte 2), houve efeito de tratamentos para condutância estomática (gs), CO_2 interno (Ci) e eficiência intrínseca do uso da água (WUEi) ($p \leq 0,01$), sem efeito para SPAD, *A*, E, WUEt e *CE* ($p > 0,05$) (Tabela 8). O tratamento 80 kg N ha^{-1} sem inoculação apresentou maior *gs* (1,6) e maior *Ci* (251 µmol mol^{-1}) em comparação aos demais tratamentos (*gs* = 0,2–0,7; *Ci* = 172–233 µmol mol^{-1}). A WUEi foi menor em 40 kg N ha^{-1} sem inoculação (16,2) em relação ao controle, ao tratamento 80 kg N ha^{-1} sem inoculação e ao tratamento 40 kg N ha^{-1} + coinoculação (52,0–60,9).

No período das águas de 2025 (corte 7), observou-se efeito para transpiração (E) ($p \leq 0,01$), com menor valor em 40 kg N ha^{-1} sem inoculação (1,6) em comparação aos demais tratamentos (2,2–2,6) (Tabela 8). Para SPAD, apesar do Pr>F indicar significância ($p \leq 0,05$), o teste de Tukey não separou médias (todas com a mesma letra).

Tabela 8 - Índice de clorofila (SPAD), fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), CO_2 na câmara subestomática (Ci), eficiência do uso da água instantânea (WUEt), eficiência do uso da água intrínseca (WUEi) e eficiência de carboxilação (CE) do capim marandu, cultivado a campo, com coinoculação de *A. brasilenses* (Ab-5 + Ab-V6) e *Bacillus* sp. (S26 e N72), em associação a adubação nitrogenada, realizado no segundo corte, no período das águas. Dracena, SP.

	Período das Águas 2024							
Tratamento	SPAD	*A*	*E*	*g*s	*Ci*	*WUEt*	*WUEi*	*CE*
		µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}			µmol mol^{-1}	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O	µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} µmol CO_2 mol ar^{-1}
T1- controle	33,8	21,9	2,7	0,2 b	172 c	8,1	52,01 a	0,1
T2- 80 kg N ha^{-1}	35,7	23,5	3,2	1,6 a	251 a	7,2	60,9 a	0,1
T3- 40 kg N ha^{-1}	38,8	20,2	2,5	0,3 b	191 bc	7,5	16,2 b	0,1
T4- T3 + AZ + S26 + N72	35,5	24,2	2,3	0,6 b	233 ab	11,1	52,9 a	0,1
T5- AZ + S26 + N72	36,4	20,1	2,8	0,7 b	214 abc	7,1	32,6 ab	0,1
Média	36,06	21,98	2,7	0,7	212,61	8,22	42,97	0,11
Pr>F	ns	ns	ns	**	**	ns	**	ns
C.V. (%)	6,58	15,72	14,5	32,04	8,3	18,08	25,19	17,99
	Período das Águas 2025							
Tratamento	SPAD	*A*	*E*	*g*s	*Ci*	*WUEt*	*WUEi*	*CE*
		µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}			µmol mol^{-1}	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O	µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} µmol CO_2 mol ar^{-1}
T1- controle	29,5 a	21,1	2,2 ab	0,3	235	10,01	44,3 a	0,08
T2- 80 kg N ha^{-1}	35,9 a	16	2,3 a	0,3	207	6,98	67,7 a	0,07
T3- 40 kg N ha^{-1}	30,2 a	16,9	1,6 b	0,2	206	9,41	48,8 a	0,07
T4- T3 + AZ + S26 + N72	33,7 a	19,7	2,6 a	0,3	217	7,48	50,8 a	0,09
T5- AZ + S26 + N72	29,3 a	24,5	2,2 a	0,3	172	10,92	60,9 a	0,16
Média	31,66	19,66	2,21	0,33	207,9	8,96	54,55	0,09
Pr>F	*	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	7,68	26,34	9,63	19,17	10,58	25,91	15,77	64,02

Nota: Médias seguidas por mesmas letras minúsculas AN coluAN não diferem entre si pelo teste Tukey. *Significativo a $p \leq$ **Significativo a $p \leq 0,01$. ns = não siginificativo. Fonte de N: ureia.Período das Águas refere aos cortes 1, 2, 3, 6, 7 e 8. Período a refere-se aos cortes 4, 5 e 9. Fonte: Própria autora.

5.4 Discussão

5.4.1 Efeito da coinoculação com Azospirillum brasilense e Bacillus spp. sobre crescimento, nutrição e fisiologia

Embora microrganismos promotores de crescimento possam favorecer o desenvolvimento de gramíneas, a coinoculação sem N não substituiu a adubação mineral em termos de acúmulo de massa seca, sugerindo limitação por N do solo e/ou intensidade de demanda da forrageira. Isso é compatível com a literatura em *Urochloa*, na qual a resposta a BPCP costuma ser mais consistente quando existe um “mínimo” de disponibilidade nutricional

e quando o manejo garante condições para colonização e expressão dos mecanismos (hormônios, exploração radicular, aquisição de nutrientes e tolerância a estresses). O bioestímulo tende a atuar como complemento e não como substituto integral do N em sistemas mais intensificados (Hungria *et al*., 2021).

No caso específico de *A. brasilense*, há evidências de aumento de produção de forragem e melhora do estado nutricional a partir da inoculação de sementes de Marandu, com respostas associadas a alterações de crescimento e nutrição vegetal. Esses efeitos são normalmente atribuídos à promoção de crescimento por fitormônios (ex.: auxinas), estímulo do sistema radicular e contribuição indireta na aquisição de N, além de possíveis benefícios em condições de estresse (Heinrichs *et al*., 2020).

A coinoculação com *Azospirillum* + *Bacillus* também é reportada como estratégia capaz de elevar biomassa e eficiência fotossintética em *Urochloa*, indicando potencial sinérgico entre mecanismos como produção de fitormônios, fixação biológica associativa e solubilização/maior disponibilização de nutrientes. Em estudo com *U. brizantha*, a coinoculação aumentou massa seca e parâmetros fotossintéticos, reforçando a plausibilidade de que consórcios microbianos possam ampliar o desempenho fisiológico e a tolerância a variações ambientais (Terra *et al*., 2024).

5.4.2 Interação microrganismos × nitrogênio: eficiência de uso e recuperação do N

A coinoculação, quando associada a dose intermediária de N (ex.: 40 kg N ha^{-1}), apresentou capacidade de sustentar desempenho produtivo mais próximo do manejo nitrogenado elevado em pelo menos parte dos cenários, sugerindo aumento de eficiência do sistema. Esse comportamento é semelhante ao observado em Marandu sob combinações de inoculação (*A. brasilense* e *B. subtilis*) e doses de N, em que o componente "dose de N" segue sendo determinante para acúmulo de massa e proteína bruta, mas a presença de microrganismos pode alterar a dinâmica de acúmulo de nutrientes (ex.: K) e respostas de crescimento em certos níveis de adubação (Sampaio *et al*., 2021).

Os resultados com ^{15}N reforçam a interpretação de que a coinoculação pode atuar como "ajuste fino" na aquisição e no aproveitamento do N, sobretudo quando o N não está em excesso. De acordo com (Thiengo *et al*., 2024a) em marandu inoculado com diazotróficos endofíticos, foi demonstrado que a eficácia da inoculação depende do nível de N: sob doses altas, o benefício pode ser suprimido, enquanto em níveis baixos a moderados ocorre uma

cascata positiva envolvendo crescimento radicular (especialmente raízes finas), melhor exploração de solo/fertilizante e aumento da recuperação do N aplicado.

De acordo com (Galindo *et al*., 2025) bactérias em consórcio avaliados com técnicas isotópicas: em milho, a coinoculação (*B. subtilis* + *A. brasilense*) aumentou a recuperação do N aplicado e elevou atividade nitrogenase/BNF em níveis baixos a médios de N, ao passo que N elevado reduziu biomassa e "desligou" parte dos mecanismos microbianos, diminuindo o ganho relativo da tecnologia. Ou seja, a coinoculação tende a gerar maior retorno agronômico quando o sistema não está "saturado" por N.

5.4.3 Dinâmica nutricional no período das águas de 2024 e 2025

A análise integrada dos heatmaps de correlação e dos biplots da análise discriminante canônica evidenciou que a dinâmica nutricional do capim-marandu no período das águas apresentou comportamento distinto entre os anos avaliados. Em 2024, a produtividade de massa seca apresentou baixa associação linear com os teores foliares isolados, indicando que o crescimento das plantas não foi determinado por um nutriente específico, mas pelo equilíbrio nutricional global sob condições ambientais favoráveis. A correlação negativa entre MS e Zn, associada ao posicionamento do vetor de massa seca em sentido oposto a alguns nutrientes no biplot, sugere possível efeito de diluição, no qual o maior acúmulo de biomassa reduz a concentração relativa de determinados nutrientes no tecido foliar. Além disso, variações na concentração de Zn podem estar relacionadas à absorção, redistribuição interna e alocação diferencial desse micronutriente nos tecidos vegetais, conforme discutido por (Rasheed *et al*., 2024). A ADC reforçou essa interpretação ao demonstrar que a separação entre os tratamentos foi explicada por combinações multivariadas de nutrientes, com T2 e T3 associados principalmente a N, Ca, Fe, Mg e Mn, enquanto T1 e T5 apresentaram maior relação com P, S e Cu.

Em 2025, o padrão nutricional foi mais fortemente associado ao estado nitrogenado das plantas, uma vez que a massa seca apresentou correlação positiva com o N foliar, indicando maior dependência da produtividade em relação ao suprimento e ao uso fisiológico desse nutriente. Esse resultado está de acordo com (Thiengo *et al*., 2024a), que observaram que a fertilização nitrogenada regula o crescimento, a nutrição e a interação entre capim-marandu e bactérias diazotróficas endofíticas. Por outro lado, as correlações negativas entre MS e Fe, Mn e Zn, associadas à oposição entre o vetor de massa seca e os vetores desses nutrientes na ADC,

indicam que o aumento da biomassa pode ter reduzido suas concentrações foliares relativas, sem necessariamente representar deficiência nutricional. Esse comportamento é compatível com o conceito de diluição nutricional, no qual o crescimento vegetal altera a concentração dos nutrientes nos tecidos, exigindo interpretação conjunta entre produção de biomassa, estado nutricional e interações entre elementos, conforme discutido por (Fontana *et al*., 2025)).

De modo geral, os resultados demonstram que a produtividade do capim-marandu no período das águas foi condicionada por padrões multivariados de equilíbrio nutricional, e não apenas pelo aumento isolado da concentração foliar de nutrientes. Enquanto em 2024 predominou uma resposta mais difusa, com baixa correlação direta entre MS e nutrientes específicos, em 2025 o N assumiu maior importância na explicação da produtividade, embora acompanhado de possíveis efeitos de diluição sobre micronutrientes metálicos. Assim, a combinação entre correlação de Pearson e análise discriminante canônica permitiu interpretar de forma mais robusta a eficiência nutricional dos tratamentos, evidenciando que o desempenho produtivo da forrageira depende da interação entre disponibilidade hídrica, estado nitrogenado, absorção, redistribuição e diluição dos nutrientes no tecido vegetal.

5.5 Conclusão

A coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp., associada a 40 kg de N ha^{-1}, apresentou potencial para manter elevada produtividade do capim-marandu, possibilitando a redução parcial da adubação nitrogenada. Entretanto, a resposta variou entre os anos agrícolas, e a coinoculação sem N não sustentou elevada produção. Embora os resultados indiquem potencial de interação entre os microrganismos, a ocorrência de sinergismo não pode ser afirmada de forma conclusiva, sendo necessária a comprovação de efeitos combinados superiores aos esperados a partir das respostas individuais.

REFERÊNCIAS

BACKER, Rachel *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 23 out. 2018.

BARRIE, A.; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. **Mass spectrometry of soils.**, p. 1–46, 1996.

CORRÊA, Darlena Caroline Da Cruz *et al.* Ammonia Volatilization, Forage Accumulation, and Nutritive Value of Marandu Palisade Grass Pastures in Different N Sources and Doses. **Atmosphere**, v. 12, n. 9, p. 1179, 13 set. 2021.

DEBASTIANI, Giovana Lara *et al.* Biotechnological potential of *Bacillus* sp. S26 for alleviation of abiotic and biotic stresses in vine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 150, 7 abr. 2023.

FERREIRA, Eric Batista; CAVALCANTI, Portya Piscitelli; NOGUEIRA, Denismar Alves. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues)**. , 5 out. 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/index.html>. Acesso em: 3 nov. 2025

FONTANA, Mario *et al.* Critical dilution curves for phosphorus, potassium, and sulfur along with relationships to nitrogen for major crops. **Plant and Soil**, 2 out. 2025.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103764, 1 jan. 2021.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Synergism of *Bacillus* subtilis and *Azospirillum* brasilense for enhanced N-use efficiency and maize growth: Evidence from 15N isotopic and physiological responses. **Physiologia Plantarum**, v. 177, n. 2, p. e70205, 2025.

HEINRICHS, Reges *et al. Azospirillum* inoculation of "Marandu" palisade grass seeds: effects on forage production and nutritional status. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 2, p. 465–478, 6 mar. 2020.

HUNGRIA, Mariangela *et al.* Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (Urochloa spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. **Plant and Soil**, v. 463, n. 1, p. 171–186, 1 jun. 2021.

LIMA, Vania Luzia Fournou de *et al.* Análise isotópica de nitrogênio e química do capim-marandu adubado com ureia e cama de frango e diferido. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4Supl1, p. 2609–2622, 2 set. 2016.

MALAVOLTA, Eurípides. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira. **Piracicaba: Potafos**, 1997.

PAULO, Ezio Nalin de *et al.* **Nitrification Inhibitor 3,4-dimethylpyrazole Phosphate Improves Nitrogen Recovery and Accumulation in Cotton Plants by Reducing NO3- Leaching Under 15N-urea Fertilization**. Research Square, , 10 mar. 2021. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-297839/v1>. Acesso em: 14 mar. 2025

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. , 2023. Disponível em: <http://www.R-project.org/>

RASHEED, Naser *et al.* Zinc portioning and allocation patterns among various tissues confers variations in Zn use efficiency and bioavailability in lentil genotypes. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 29 jan. 2024.

ROSCHER, Christiane *et al.* Adjustment to the light environment in small-statured forbs as a strategy for complementary resource use in mixtures of grassland species. p. 965–979, 2011.

SAKAI, Hidemitsu *et al.* Yield responses to elevated CO2 concentration among Japanese rice cultivars released since 1882. **Plant Production Science**, v. 22, n. 3, p. 352–366, 3 jul. 2019.

SALES, Kyron C. *et al.* What is the maximum nitrogen in marandu palisadegrass fertilization? **Grassland Science**, v. 66, n. 3, p. 153–160, 2020.

SAMPAIO, Fernando Antônio Rebouças *et al.* Nitrogen supply associated with rhizobacteria in the first productive cycle of Marandu grass. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 429–439, 1 set. 2021.

SANTOS, H. G. dos *et al.* **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 6. ed. *[S.l.]*: Embrapa Solos, 2025.

TERRA, Lorena Emanuelle da Mata *et al.* Co-Inoculation of *Azospirillum* brasilense and *Bacillus* sp. Enhances Biomass and Photosynthetic Efficiency in Urochloa brizantha. **Agriculture**, v. 14, n. 12, 19 dez. 2024.

THIENGO, Cassio Carlette *et al.* **Nitrogen fertilization regulates crosstalk between marandu palisadegrass and Herbaspirillum seropedicae: An investigation based on 15N isotopic analysis and root morphology**. Acesso em: 30 jan. 2025.

TRIVELIN, P. C. O. *et al.* Evaluation of a 15N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 226–234, ago. 1994.

DEBASTIANI, Giovana Lara *et al.* Biotechnological potential of *Bacillus* sp. S26 for alleviation of abiotic and biotic stresses in vine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 150, 7 abr. 2023.

DI SARIO, Luciana *et al.* Plant Biostimulants to Enhance Abiotic Stress Resilience in Crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 3, p. 1129, jan. 2025.

DIAS-FILHO, Moacyr Bernardino. Diagnóstico das Pastagens no Brasil. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**, p. 38, maio 2014.

EL-SAPPAH, Ahmed H. *et al.* Fibrillin gene family and its role in plant growth, development, and abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 29 out. 2024.

ETESAMI, Hassan; JEONG, Byoung Ryong; GLICK, Bernard R. Potential use of *Bacillus* spp. as an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. **Current Research in Biotechnology**, v. 5, p. 100128, 1 jan. 2023.

FAN, Xiaoning *et al.* Cross-Talks Between Macro- and Micronutrient Uptake and Signaling in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 15 out. 2021.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 31 jan. 2023.

FERREIRA, Eric Batista; CAVALCANTI, Portya Piscitelli; NOGUEIRA, Denismar Alves. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues)**. , 5 out. 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/index.html>. Acesso em: 3 nov. 2025

FONTANA, Mario *et al.* Critical dilution curves for phosphorus, potassium, and sulfur along with relationships to nitrogen for major crops. **Plant and Soil**, 2 out. 2025.

FREITAS, Gabriela da Silva *et al.* Foliar Spray Inoculation with Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Nitrogen Doses in Megathyrsus maximus cv. BRS Zuri. **Agronomy**, v. 13, n. 4, 30 mar. 2023.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103764, 1 jan. 2021a.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Nitrogen use efficiency and recovery in a wheat-corn rotation under tropical savannah conditions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, n. 3, p. 291–305, 1 abr. 2021b.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Enhancing agronomic efficiency and maize grain yield with *Azospirillum brasilense* inoculation under Brazilian savannah conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 134, p. 126471, 1 mar. 2022.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Unveiling contribution and fate of nitrogen with 15N techniques affected by microbial co-inoculation on field-grown maize: A novel approach to optimize N-fertilizer use efficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 217, p. 109261, 1 dez. 2024.

GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Synergism of *Bacillus* subtilis and *Azospirillum* brasilense for enhanced N-use efficiency and maize growth: Evidence from 15N isotopic and physiological responses. **Physiologia Plantarum**, v. 177, n. 2, p. e70205, 2025.

GANAPATHY, Jagadeesan; HAND, Katherine A.; SHABEK, Nitzan. Analysis of 26S Proteasome Activity across Arabidopsis Tissues. **Plants**, v. 13, n. 12, 18 jun. 2024.

GUIMARÃES, Gabriel Silva *et al.* Pointing Out Opportunities to Increase Grassland Pastures Productivity via Microbial Inoculants: Attending the Society's Demands for Meat Production with Sustainability. **Agronomy**, v. 12, n. 8, 24 jul. 2022.

HABERMANN, Eduardo *et al.* Inoculation with plant growth-promoting bacteria mitigates the negative impacts of 2 °C warming on the photosynthesis, growth, and nutritional value of a tropical C4 grassland under field conditions. **Science of The Total Environment**, v. 967, p. 178769, 1 mar. 2025.

HEINRICHS, Reges *et al.* *Azospirillum* inoculation of "Marandu" palisade grass seeds: effects on forage production and nutritional status. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 2, p. 465–478, 6 mar. 2020.

HUNGRIA, Mariangela *et al.* Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (Urochloa spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. **Plant and Soil**, v. 463, n. 1, p. 171–186, 1 jun. 2021.

IGAMBERDIEV, Abir U.; BYKOVA, Natalia V. Mitochondria in photosynthetic cells: Coordinating redox control and energy balance. **Plant Physiology**, v. 191, n. 4, p. 2104–2119, 1 abr. 2023.

IKIZ, Boran; DASGAN, Hayriye Yildiz; GRUDA, Nazim S. Utilizing the power of plant growth promoting rhizobacteria on reducing mineral fertilizer, improved yield, and nutritional quality of Batavia lettuce in a floating culture. **Scientific Reports**, v. 14, p. 1616, 18 jan. 2024.

ITO, Momoyo *et al.* IMA peptides regulate root nodulation and nitrogen homeostasis by providing iron according to internal nitrogen status. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 733, 29 jan. 2024.

JERAN, Nicolaj *et al.* Proteostasis and protein quality control in chloroplasts: mechanisms and novel insights related to protein mislocalization. **Journal of Experimental Botany**, v. 76, n. 15, p. 4294–4312, 1 out. 2025.

JOSEPH, B.; RANJAN PATRA, R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (Cicer arietinum L.). **International Journal of Plant Production**, v. 1, n. 2, p. 141–152, 24 jul. 2012.

KASSAMBARA, Alboukadel. **ggcorrplot: Visualization of a Correlation Matrix using "ggplot2"**. , 12 jan. 2016. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ggcorrplot>. Acesso em: 3 nov. 2025

KUMAR, Vipin *et al.* Effect of polyhalite on yield, nutrient uptake by wheat and soil properties (Annals of Plant and Soil Research). v. Annals of Plant and Soil Research 25, p. 59–63, 1 abr. 2023.

LEITE, Rubson da C. *et al.* Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (Urochloa brizantha) with *Azospirillum* brasilense. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n. 1, p. 61–67, 17 dez. 2018.

LEITE, Rubson da C. *et al.* Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (Urochloa brizantha) with *Azospirillum* brasilense. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n. 1, p. 61, 2019.

LI, Yuekun *et al.* Effects of nitrogen input on soil bacterial community structure and soil nitrogen cycling in the rhizosphere soil of Lycium barbarum L. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 10 jan. 2023.

LIMA, Vania Luzia Fournou de *et al.* Análise isotópica de nitrogênio e química do capim-marandu adubado com ureia e cama de frango e diferido. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4Supl1, p. 2609–2622, 2 set. 2016.

LIU, Kewei *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria improve drought tolerance of crops: a review. **Plant Growth Regulation**, v. 105, n. 3, p. 567–581, 1 jun. 2025.

LIU, Xiandong *et al.* Molecular-level understanding of metal ion retention in clay-rich materials. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 3, n. 7, p. 461–476, 14 jun. 2022.

MALAVOLTA, Eurípides. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira. **Piracicaba: Potafos**, 1997.

MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

NASAR, Jamal *et al.* Nitrogen fertilization coupled with foliar application of iron and molybdenum improves shade tolerance of soybean under maize-soybean intercropping. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 4 out. 2022.

NAVARRO, Bruno B.; MACHADO, Mauricio J.; FIGUEIRA, Antonio. Nitrogen Use Efficiency in Agriculture: Integrating Biotechnology, Microbiology, and Novel Delivery Systems for Sustainable Agriculture. **Plants**, v. 14, n. 19, 24 set. 2025.

OECD; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031**. *[S.l.]*: OECD, 2022.

OKSANEN, J. *et al.* **vegan: Community Ecology Package**. , 2026. Disponível em: <https://vegandevs.github.io/vegan/>

OLIVEIRA, Daniele *et al.* Changes in soil carbon and soil carbon sequestration potential under different types of pasture management in Brazil. **Regional Environmental Change**, v. 22, 27 jun. 2022.

PARASTESH, Faezeh; LAJAYER, Behnam Asgari; DELL, Bernard. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Biochar as Drought Defense Tools: A Comprehensive Review of Mechanisms and Future Directions. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 47, n. 12, 11 dez. 2025.

PARSONS, A.; ROWARTH, Jacqueline; NEWTON, Paul. Managing pasture for animals and soil carbon. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v. 71, p. 77–84, 1 jan. 2009.

PAULO, Ezio Nalin de *et al.* **Nitrification Inhibitor 3,4-dimethylpyrazole Phosphate Improves Nitrogen Recovery and Accumulation in Cotton Plants by Reducing NO3- Leaching Under 15N-urea Fertilization**. Research Square, , 10 mar. 2021. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-297839/v1>. Acesso em: 14 mar. 2025

PEDREIRA, B. C. *et al.* Tiller density and tillering on *Brachiaria brizantha cv.* Marandu pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 1039–1046, ago. 2017.

PELAGIO-FLORES, Ramón *et al.* A century of *Azospirillum*: plant growth promotion and agricultural promise. **Plant Signaling & Behavior**, v. 20, n. 1, p. 2551609, *[S.d.]*.

PEREZ-RIVEROL, Yasset *et al.* The PRIDE database at 20 years: 2025 update. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D543–D553, 6 jan. 2025.

PIÑERO, María Carmen *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Tools to Improve the Growth of Kohlrabi (Brassica oleracea var. gongylodes) Plants in an Aquaponics System. **Plants**, v. 13, n. 5, 21 fev. 2024.

QADERI, Mirwais M.; EVANS, Cameryn C.; SPICER, Madeleine D. Plant Nitrogen Assimilation: A Climate Change Perspective. **Plants**, v. 14, n. 7, p. 1025, jan. 2025.

QUAST, Christian *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 1 jan. 2013.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. , 2023. Disponível em: <http://www.R-project.org/>

RASHEED, Naser *et al.* Zinc portioning and allocation patterns among various tissues confers variations in Zn use efficiency and bioavailability in lentil genotypes. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 29 jan. 2024.

REN, Wen *et al.* iTRAQ-based quantitative proteomic analysis provides insight into the drought-stress response in maize seedlings. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9520, 9 jun. 2022.

RIBEIRO, Pablo *et al.* Do tropical climatic conditions reduce the effectiveness of nitrification inhibitors? A meta-analysis of studies carried out in Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 15 mar. 2023.

RODRIGUES, Luan F. *et al.* Canopy characteristics of ‘Mavuno’ hybrid brachiariagrass and ‘Marandu’ palisadegrass harvested at different harvest intensities. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 9, n. 3, p. 249–255, 30 set. 2021.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Raquel; MESA-MARÍN, Jennifer. Plant responses to plant growth promoting bacteria: Insights from proteomics. **Journal of Plant Physiology**, v. 287, p. 154031, 1 ago. 2023a.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Raquel; MESA-MARÍN, Jennifer. Plant responses to plant growth promoting bacteria: Insights from proteomics. **Journal of Plant Physiology**, v. 287, p. 154031, 1 ago. 2023b.

ROSCHER, Christiane *et al.* Adjustment to the light environment in small-statured forbs as a strategy for complementary resource use in mixtures of grassland species. p. 965–979, 2011.

ROSOLEM, Ciro A. *et al.* Chapter Five - Enhanced Plant Rooting and Crop System Management for Improved N Use Efficiency. *In*: SPARKS, Donald L. (Org.). **Advances in Agronomy**. *[S.l.]*: Academic Press, 2017. v. 146 p. 205–239.

SAKAI, Hidemitsu *et al.* Yield responses to elevated CO2 concentration among Japanese rice cultivars released since 1882. **Plant Production Science**, v. 22, n. 3, p. 352–366, 3 jul. 2019.

SALES, Kyron C. *et al.* What is the maximum nitrogen in marandu palisadegrass fertilization? **Grassland Science**, v. 66, n. 3, p. 153–160, 2020.

SAMPAIO, Fernando Antônio Rebouças *et al.* Nitrogen supply associated with rhizobacteria in the first productive cycle of Marandu grass. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 429–439, 1 set. 2021.

SANTOS, H. G. dos *et al.* **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 6. ed. *[S.l.]*: Embrapa Solos, 2025.

SARKIS, Leonardo Fernandes *et al.* Ammonia volatization from conventional and stabilized fertilizers, agronomic aspects and microbiological attributes in a Brazilian coffee crop system. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 8 dez. 2023.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, Augusto César de. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed.- ed. Viçosa: UFV, 2002a.

SILVA, Dirceu Jorge; QUEIROZ, Augusto césar. **Análises de Alimentos - Métodos Químicos e Biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002b.

SINGH, Kratika; GUPTA, Shreya; SINGH, Amar Pal. Review: Nutrient-nutrient interactions governing underground plant adaptation strategies in a heterogeneous environment. **Plant Science**, v. 342, p. 112024, 1 maio 2024.

SIVIYA, L. E. *et al.* Proteomic insights on root and tuber crops' response to abiotic stress—A review. **Crop Science**, v. 65, n. 6, p. e70193, 2025.

SMITH, Edward N. *et al.* Improving photosynthetic efficiency toward food security: Strategies, advances, and perspectives. **Molecular Plant**, Special Issue on Climate Change and Food Security: Plant Science Roles. v. 16, n. 10, p. 1547–1563, 2 out. 2023.

SOUZA, Juscelio Ramos de *et al.* Volatilization of ammonia from conventional sources of nitrogen and compacted urea under controlled conditions. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 15, n. 2, p. 1–6, 2020.

TARIQ, H. *et al.* Plant growth-promoting *Bacillus* strains modulate early soybean development via proteome remodeling. **BMC Plant Biology**, v. 26, n. 1, p. 178, 27 dez. 2025.

TELES, Nathalia *et al.* Pasture Degradation Estimates Through Field Data in the State of Goiás, Brazil. **Land Degradation & Development**, v. n/a, n. n/a, 2025.

TERRA, Lorena Emanuelle da Mata *et al.* Co-Inoculation of *Azospirillum* brasilense and *Bacillus* sp. Enhances Biomass and Photosynthetic Efficiency in Urochloa brizantha. **Agriculture**, v. 14, n. 12, 19 dez. 2024. .

THIENGO, Cassio Carlette *et al.* Nitrogen fertilization regulates crosstalk between marandu palisadegrass and Herbaspirillum seropedicae: An investigation based on 15N isotopic analysis and root morphology. **Environmental Research**, v. 249, p. 118345, 15 maio 2024b.

THIENGO, Cassio Carlette *et al.* Nitrogen fertilization regulates crosstalk between marandu palisadegrass and *Herbaspirillum seropedicae*: An investigation based on 15N isotopic analysis and root morphology. **Environmental Research**, v. 249, p. 118345, 15 maio 2024c.

TRIVELIN, P. C. O. *et al.* Evaluation of a 15N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 226–234, ago. 1994.

TSOTETSI, Teboho *et al.* *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2482, jan. 2022.

TURINO MATTOS, Maria Laura; VALGAS, Ricardo Alexandre; MARTINS, José Francisco da Silva. Coinoculation with Growth-Promoting Bacteria Increases the Efficiency of Nitrogen Use by Irrigated Rice. **ACS Omega**, v. 8, n. 51, p. 48719–48727, 26 dez. 2023.

TYERMAN, Stephen D. *et al.* Adaptable and Multifunctional Ion-Conducting Aquaporins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 72, p. 703–736, 17 jun. 2021.

VACHERON, Jordan *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 17 set. 2013.

VAN RAIJ, Bernardo. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. *[S.l.]*: International Plant Nutrition Institute, 2011.

WEI, Lirong *et al.* A Proteomics Insight into Advancements in the Rice–Microbe Interaction. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1079, jan. 2023.

ZARBAKHSH, Saeedeh *et al.* Phytohormonal regulation of photosynthesis in response to light stress. **Plant Stress**, v. 19, p. 101169, 1 jan. 2026.

ZAYED, Omar *et al.* Nitrogen Journey in Plants: From Uptake to Metabolism, Stress Response, and Microbe Interaction. **Biomolecules**, v. 13, n. 10, p. 1443, out. 2023.

ZHANG, Xinwang *et al.* Proteomics analysis of nitrogen stress on the influence of carbon and nitrogen metabolism of flue-cured tobacco. **BMC Genomics**, v. 26, n. 1, p. 961, 27 out. 2025.

ZHOU, Ming *et al.* Proteomic Analysis Dissects Molecular Mechanisms Underlying Plant Responses to Phosphorus Deficiency. **Cells**, v. 11, n. 4, p. 651, jan. 2022.