

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ISOLADOS DURANTE A
VERMICOMPOSTAGEM COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL

ROSELAINÉ SANCHEZ DA SILVA DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL– 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 191/2015

Oliveira, Roselaine Sanchez da Silva de

Interação entre fungos isolados durante a vermicompostagem com bactérias promotoras do crescimento vegetal / Roselaine Schez da Silva de Oliviera. – 2015.

104 f. : il.

Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 62 – 74.

1. Bioinoculantes 2. Biofilme fungo-bactéria 3. Hifosfera 4. Vermicomposto 5. Interação fungo-bactéria I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 631.875

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ISOLADOS DURANTE A
VERMICOMPOSTAGEM COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL

ROSELAINÉ SANCHEZ DA SILVA DE OLIVEIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal.”

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.
Coorientador: Prof. Fábio Lopes Olivares.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL– 2015

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ISOLADOS DURANTE A
VERMICOMPOSTAGEM COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL

ROSELAINE SANCHEZ DA SILVA DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal.

Aprovada em 24 de Abril de 2015

Comissão Examinadora

Prof. Leonardo Barros Dobbss (D.Sc., Produção Vegetal) - UVV

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc Fitopatologia) – UENF

Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Microbiologia do Solo) – UENF
(Coorientador)

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do solo) – UENF
(Orientador)

A Deus, sem Ele nada seria possível.
Aos meus pais Luiz Alberto Marins de Oliveira e
Ivonete Maria da Silva de Oliveira,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Meu Bom Deus, por tudo;

Aos meus pais Luiz Alberto Marins de Oliveira e Ivonete Maria da Silva de Oliveira, pelo amor, pelo carinho e pela dedicação;

Aos meus irmãos Thais da Silva de Oliveira e Johannes Sanchez da Silva de Oliveira pelo apoio e incentivo;

Ao meu grande e querido Amigo Vicente Mussi que tanto ajudou nesta jornada. Obrigada pela imensurável contribuição prestada durante os trabalhos desenvolvidos;

A Uenf pela bolsa de estudo concedida durante o curso;

Ao meu orientador, Professor Luciano Pasqualotto Canellas pelos ensinamentos e conselhos;

Ao meu coorientador Fábio Lopes Olivares pelo grande apoio, pela crítica, pela orientação e pela ajuda na elaboração do presente trabalho;

Ao professor Silvaldo pelo apoio e pela disponibilidade de espaço físico necessários para este trabalho;

Aos meus amigos Jakson leite, Lidiane Lousada, Barbara Esteves e Livia Ferreira pela amizade, pelos momentos de alegria, e por ter compartilhado momentos tão difíceis nesta etapa da minha vida;

Aos amigos do Nudiba;

Ao meu amigo Gilberto Pacheco pela importante colaboração na execução deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Vermicompostagem.....	5
2.2 Interação Fungo-Bactéria (IFB).....	9
2.3 Bioinoculante.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Produção de Vermicompostos.....	19
3.2. Isolamento, densidade e diversidade de fungos do vermicomposto.....	19
3.2.1. <i>Isolamento</i>	19
3.2.2. <i>Caracterização, identificação e preservação</i>	20
3.3. Caracterização Fenotípica.....	21
3.3.2 <i>Solubilização de Fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$)</i>	21
3.3.3 <i>Avaliação da atividade celulolítica</i>	22
3.4 Interação entre fungo e bactéria promotora do crescimento vegetal (IFB).....	22
3.4.1 <i>Origem dos Isolados</i>	22
3.4.2 <i>Ensaio de Compatibilidade</i>	23
3.4.3 <i>Ensaio de viabilidade celular</i>	23
3.4.4 <i>Avaliação da capacidade das bactérias obter nutrientes diretamente da hifa</i> ... 23	
3.4.5 <i>Densidade de bactérias crescidas sobre a hifa</i>	24
3.4.6 <i>Sobrevivência de bactérias em co-cultivo com fungos</i>	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Estrutura da comunidade fúngica nos diferentes estádios de maturação do vermicomposto.....	26
4.2 Densidade populacional fúngica durante a vermicompostagem.....	35
4.3 Estudo comparativo de diferentes meios de cultivo no isolamento dos fungos durante a vermicompostagem.....	39

4.4 Caracterização Fenotípica.....	43
4.4.1 Solubilização de Óxido de Zinco (ZnO)	43
4.4.2 Solubilização de Fosfato Tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$)	45
4.4.3 Atividade celulolítica	48
4.5 Interação entre isolados de <i>Trichoderma</i> e bactérias diazotróficas (IFB)	50
4.5.1 Ensaio de Compatibilidade <i>in vitro</i> entre isolados de <i>Trichoderma</i> e bactérias diazotróficas.....	51
4.5.2 Análise de viabilidade celular	53
4.5.3 Avaliação da capacidade da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM10 de obter nutriente diretamente da hifa	55
4.5.4 Interação e sobrevivência da <i>H. seropedicae</i> RAM10 em co-cultivo com isolados de <i>Trichoderma</i>	58
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
7. APÊNDICES	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de fungos isolados nos meios de cultura a partir de Esterco Bovino e Torta de Filtro nas diferentes temperaturas (25°C, 37°C e 45°C) durante a vermicompostagem.27
- Figura 2.** Número de gêneros fúngicos isolados nos meios de cultura AH, MAN, Sab, Cel, Asp e MS provenientes de Esterco Bovino e Torta de Filtro aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de vermicompostagem.28
- Figura 3.** Número de gêneros fúngicos isolados no meio BDA provenientes de Esterco Bovino e Torta de Filtro aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de vermicompostagem.29
- Figura 4.** Número das principais espécies dos gêneros isolados do meio BDA durante a maturação do vermicomposto de esterco bovino e torta de filtro nas diferentes temperaturas de isolamento (25°C, 37°C e 45°C).30
- Figura 5.** Isolados dos fungos *Trichoderma* spp. obtidos a partir da vermicompostagem de esterco bovino com 90 dias de maturação. (A e B) Colônias em meio de cultura BDA crescidas a 25°C por 5 dias. (A) Isolado 467 e (B) 476. Características microscópicas da esporulação da microcultura com distinção na formação de conídios (triângulo) e conidióforos (seta) dos isolados (C) 467 e (D) 476.50
- Figura 6.** Teste de compatibilidade *in vitro* entre isolados de *Trichoderma* sp. com bactérias promotoras do crescimento vegetal. (A) *Trichoderma* 476 e (B) *Trichoderma* 467. (1) *Herbaspirillum seropedicae* RAM10; (2) *Burkholderia phytatum*; (3) *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54.....52
- Figura 7.** Viabilidade celular de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 coexistindo com os isolados (A, B) 476 e (C, D) 467, Utilizando o LIVE/DEAD® BacLigth™

Bacterial Viability Kit, 24 horas após a inoculação da bactéria. (A,B) coloração vermelha indicativo de inviabilidade celular (seta). (C,D) Viabilidade das hifas do isolado 467 de *Trichoderma* (estrela) e das células da *H. seropedicae* estirpe RAM10 na hifosfera (asterístico). 54

Figura 8. Densidade populacional de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 em co-cultivo com os isolados 467 e 476 de *Trichoderma* spp em placas compartimentadas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey em 5% (n=3, barras correspondem ao desvio padrão)..56

Figura 9. *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 formando biofilme e colonizando a hifosfera dos isolados (A, B) *Trichoderma* 476 e (C, D) *Trichoderma* 467 durante a co-incubação em placa bicompartimentada. (A, B, C, D) *H. seropedicae* formando biofilme (seta) e (A, B, D) na hifosfera (triângulo). 57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Densidade populacional (UFC/g de vermicomposto) dos fungos isolados de esterco bovino e torta de filtro nos diferentes estádios de maturação do vermicomposto incubados a 25°C e 37°C..... 35
- Tabela 2.** Densidade populacional (UFC/g⁻¹) dos fungos isolados de vermicomposto produzido com esterco bovino (EB) e torta de filtro (TF) em diferentes estádios de maturação incubados a 25°C e 37°C. 36
- Tabela 3.** Número de fungos isolados durante a vermicompostagem de esterco bovino e da torta de filtro durante a vermicompostagem nas três temperaturas de incubação (25, 37 e 45°C)..... 39
- Tabela 4.** Número de fungos isolados durante a vermicompostagem de esterco bovino (EB) e torta de filtro (TF) nos diferentes meios de cultivo (BDA, AH, MS, Cel, Sab e Asp) durante a vermicompostagem nas três temperaturas de incubação (25, 37 e 45°C)..... 40
- Tabela 5.** Índice de solubilização de zinco dos fungos isolados de esterco bovino e torta de filtro nos diferentes estádios de maturação. 44
- Tabela 6.** Índice de solubilização de fosfato dos fungos isolados de esterco bovino e torta de filtro nos diferentes estádios de maturação. 46
- Tabela 7.** Índice enzimático dos fungos isolados de esterco bovino e torta de filtro nos diferentes estádios de maturação..... 48
- Tabela 8.** Compatibilidade *in vitro* entre os isolados do fungo de *Trichoderma* 467 e 476 e as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* RAM10, *H. seropedicae* HRC 54 e *Burkholderia phytatumum*..... 52

Tabela 9. Densidade populacional da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM 10 (UFC/mL) em co-cultivo com os isolados do fungo <i>Trichoderma</i> aos 10 dias após a inoculação no substrato.	59
Tabela 10. Fungos isolados no meio BDA provenientes de Esterco Bovino e Torta de Filtro aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de vermicompostagem.	80
Tabela 11. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC), halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados no tempo zero da vermicompostagem.	80
Tabela 12. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC) e halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados aos 30 dias da vermicompostagem.	81
Tabela 13. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC) e halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados aos 60 dias da vermicompostagem.	82
Tabela 14. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC) e halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados aos 90 dias da vermicompostagem.	84
Tabela 15. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC) e halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados aos 120 dias da vermicompostagem.	86

RESUMO

Oliveira, Roselaine Sanchez da Silva, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2015. Título "**Interação entre fungos isolados durante a vermicompostagem com bactérias promotoras do crescimento vegetal**". Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas. Coorientador: Prof. Fábio Lopes Olivares.

Bactérias têm sido isoladas com frequência da superfície de hifas e de esporos fúngicos. Interações com estruturas fúngicas podem representar uma estratégia importante para estabelecimento e atividade de bactérias benéficas, fornecendo novos nichos e nutrientes diretamente das hifas conferindo assim, uma vantagem adaptativa quando co-inoculadas com fungos. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização da comunidade fúngica nos diferentes estádios de maturação do vermicomposto e a capacidade desses fungos de interagir com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Foram produzidos vermicompostos utilizando-se esterco de curral e a torta de filtro proveniente da usina de cana-de-açúcar e realizado o isolamento e a caracterização morfológica e fenotípica dos fungos aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de vermicompostagem. Posteriormente, dois isolados de *Trichoderma spp* foram selecionados para a avaliação da interação com três bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 e *Burkholderia phytatum* estirpe STM 815). Foram obtidos 199 isolados fúngicos nos dois vermicompostos em diferentes temperaturas. Em todas as épocas de maturação o vermicomposto de esterco bovino abrigou a maior diversidade de espécies em relação ao vermicomposto produzido com torta de filtro. Os isolados recuperados foram compostos principalmente por cinco gêneros: *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium spp* e *Cladosporium spp*. A dinâmica populacional deixou evidente que a densidade presente no vermicomposto de torta de filtro foi consideravelmente superior à encontrada no vermicomposto de esterco bovino, independente do estágio de maturação e da temperatura de

isolamento. A maioria dos fungos isolados cresceu a 25 °C, independente da época de maturação e do material vermicompostado. Na caracterização fenotípica, apenas 44, dos 170 isolados analisados, não foram capazes de solubilizar zinco e fosfato e de decompor a celulose. Nos testes de interação fungo-bactérias, as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54 apresentaram compatibilidade com os dois isolados de *Trichoderma* testados. Na avaliação da capacidade da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 em obter nutrientes diretamente da hifa do fungo, foi possível verificar uma perda significativa na densidade celular da bactéria na ausência do fungo. Essa redução foi na ordem de 3 unidades logarítmicas quando comparada com a co-inoculação da bactéria na presença de isolados de *Trichoderma*. Também foi possível observar a distribuição desta bactéria colonizando a hifosfera e, ainda, a formação de biofilme na superfície da hifa. Na avaliação da sobrevivência da bactéria quando co-inoculado com os fungos. Os isolados de *Trichoderma* 467 e 476 afetaram significativamente a densidade populacional da bactéria *H. seropedicae* RAM10. Na ausência do fungo a bactéria foi incapaz de crescer quando utilizado bagaço de cana como substrato.

Palavra-chave: bioinoculantes, biofilme fungo-bactéria, hifosfera, vermicomposto.

ABSTRACT

Oliveira, Roselaine Sanchez da Silva, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2015. Title: "Interaction between fungi isolated during vermicomposting with plant growth promoting bacteria". Advisor: Luciano Pasqualoto Canellas. Co-Advisor: Fábio Lopes Olivares.

Beneficial bacteria has been isolate from hyphae surface and fungal spores. Interaction between fungal structures and bacteria may represent an important strategy for establishment and activity of beneficial bacteria, providing new niches and nutrients directly from hyphae and representing an adaptive advantage when co-inoculated with fungi. The aim of this work was the characterization of fungi communities during different vermicomposting maturation time and to observe its ability to interact with plant growth promoting bacteria. To perform it, two different vermicompost from cattle manure and filter cake from sugarcane factory were produced and the phenotypic and morphologic characterization were done from different isolates at 0, 30, 60, 90 and 120-d of vermicomposting time. Furthermore, two *Trichoderma* isolated were selected to evaluate the interaction with three diazotrophic bacteria. It was obtained 199 fungus isolates from two vermicomposts at different culture medium and incubation systems. In all vermicomposting times greater population number and diversity of fungus was found in cattle manure than filter cake vermicompost. The isolates were mainly from five genus: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp. Populational dynamics showed that fungus density was

greater on filter cake than cattle manure vermicompost and the main isolated fungus grown at 25°C independently of maturation stage or incubation temperature. According to phenotypic characterization just 44 from 170 isolates were not able to solubilise zinc and phosphorus and degraded cellulose. Related to evaluation of fungi-bacteria interaction it was possible to observe that just *Burkholderia phytatum* had shown antagonistic activity against two *Trichoderma*. Assays involving direct transfer of nutrients from fungi hyphae to *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 had shown significant decrease of bacteria population in the fungal hyphae absence. This decrease was in three logarithmic order when compared to bacteria co-inoculation with *Trichoderma*, suggesting a clear population dependency from hyphae exsudates. It was also possible to observe *H. seropedicae* RAM10 intimately colonizing hyphae surface and moreover, expressing biofilm on hyphae surface. The survival tests showed that co-inoculation with *Trichoderma* 467 and 476 affect significantly the populational density of *H. seropedicae* RAM10. In the fungal absence the bacteria was unable to grow when using sugarcane bagasse as substrate.

Keywords: Fungal, bioinoculant, Bacterial-Fungal biofilms, Hyphosphere, vermicompost.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A prospecção de microrganismos com capacidade de estabelecer associações eficientes com vegetais e de estratégias para maximizar essas ações tem sido alvo de estudo nas últimas décadas. Os microrganismos apresentam papéis ecológicos fundamentais nos ecossistemas, tais como, ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e decomposição de compostos xenobióticos (Olivares, 2009). A busca por estratégias para aperfeiçoar esses processos é fundamental para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável.

O investimento em tecnologias ambientalmente corretas e economicamente viáveis é essencial para ruptura do atual modelo de produção predominante baseado no uso de insumos agrícolas que demandam alto custo energético e de recursos naturais não renováveis (Urquiaga et al., 1999). A intensificação destas práticas contribuirá para a escassez de recursos naturais (combustíveis fósseis e jazidas de fosfato), erosão dos solos, degradação dos recursos hídricos e a perda de biodiversidade.

Várias correntes ambientalistas vêm propondo diferentes modos de produção buscando reduzir os impactos econômicos e ecológicos da agricultura de altos insumos. Entretanto, uma transição abrupta com substituição de fertilizantes minerais por fontes alternativas biológicas em larga escala poderia, segundo alguns autores, ter consequências desastrosas para a humanidade tais como redução da produção e insegurança alimentar (Siqueira et al., 1999). Estudos relacionados à ecologia, estrutura e diversidade microbiana têm

avançado, assim como os sistemas de produção de base agroecológica. Contudo, a construção de modelos à base de processos biotecnológicos está distante do que realmente podem representar e dificilmente bastarão para garantir a superação das dificuldades da cadeia produtiva de uma sociedade que cresce exponencialmente.

Vários modelos alternativos têm sido desenvolvidos nesta direção. O desenvolvimento de inoculantes à base de bactérias promotoras do crescimento vegetal vem ocorrendo em alguns países e demonstrou um grande potencial para o agronegócio (Bashan, 1998). O exemplo mais bem-sucedido da utilização de um processo biológico de ocorrência natural é a inoculação da soja com estirpes de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Essa prática tem contribuído para uma economia estimada em cerca de 6,6 bilhões de dólares ao ano em fertilizantes nitrogenados (Embrapa, 2015), tornando a soja brasileira competitiva no mercado internacional. Esse benefício é resultado de anos de pesquisa em melhoramento genético com a supressão da adubação nitrogenada e incorporação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) como características de interesse dos programas de melhoramento (Jardim Freire e Verneti, 1999).

O benefício da FBN do ponto de vista biotecnológico não se restringe às plantas leguminosas formadoras de nódulos, como a soja, mas também às plantas pertencentes à família Poaceae (Bashan, 1998). As associações entre bactérias promotoras e *poacea* como arroz, trigo, sorgo, capim elefante, cana-de-açúcar, milho, trigo, entre outras, podem ser utilizadas como alternativas sustentáveis para substituição parcial das adubações nitrogenadas. Entretanto, um dos principais problemas dos inoculantes em monocultura de não leguminosas é a sobrevivência dos microrganismos introduzidos no solo devido a fatores bióticos e abióticos.

A maioria dos trabalhos geralmente avalia o efeito da bactéria individualmente e não sua interação com os microrganismos presentes na rizosfera. Por exemplo, a interação com fungos. Devido a sua proximidade espacial, esses microrganismos frequentemente ocupam o mesmo nicho ecológico formando, por exemplo, biofilmes fungo-bactéria (Baldotto e Olivares, 2008). Esta interação confere a bactéria atividade metabólica mais adaptada em relação às monoculturas. O biofilme pode existir na forma de complexos mistos no qual fungos filamentosos prestam apoio biótico para o estabelecimento do

biofilme bacteriano. No caso de fungos não-filamentosos, tanto a bactéria como o fungo podem atuar como superfície biótica (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2005).

Vários estudos têm demonstrado aumento na atividade metabólica da bactéria quando associadas em biofilmes e na hifosfera dos fungos (Mansfeld-Giese et al., 2002; Hryniewicz et al., 2010; Iffs et al.; 2014; Zhao et al., 2014). Entretanto, existem poucos estudos ecológicos e fisiológicos sistematizados. Iniciativas na direção do aproveitamento destas interações na geração de tecnologias inovadoras para produção de inoculantes são ainda mais escassas, sendo a maioria dos trabalhos baseados em sistemas micorrízicos.

O objetivo desse trabalho consiste, portanto, na caracterização da comunidade fúngica durante a vermicompostagem e na interação desses fungos com bactérias promotoras do crescimento vegetal, uma vez que a seleção de combinações de microrganismos eficientes é um aspecto chave para esta tecnologia.

Hipóteses

As bactérias promotoras do crescimento vegetal colonizam eficientemente a superfície da hifa fúngica e se beneficiam desta interação.

Objetivo Geral

Caracterizar morfológicamente e fenotipicamente a comunidade fúngica cultivável durante o processo de vermicompostagem e avaliar a capacidade dos isolados fúngicos selecionados em interagir com bactérias promotoras do crescimento vegetal.

Objetivos Específicos

Isolar, caracterizar e identificar a comunidade dos fungos e densidade populacional nos diferentes estádios de maturação de vermicompostos;

Quantificar a população fúngica durante a vermicompostagem;

Identificar fungos com habilidade de promover o crescimento vegetal;

Avaliar a interação das bactérias diazotróficas com fungos isolados do vermicomposto por meio da (i) compatibilidade in vitro; (ii) capacidade da bactéria obter nutrientes diretamente da superfície da hifa; (iii) capacidade da bactéria formar biofilme na superfície da hifa; (iv) viabilidade celular do fungo e da bactéria em co-cultivo e da; (v) avaliar a sobrevivência das bactérias quando co-inoculadas com fungos em vermicomposto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vermicompostagem

Os microrganismos ocupam em, torno de 0,5% do espaço poroso do solo e esta porcentagem aumenta significativamente em solo rizosférico. No solo não rizosférico, a maioria dos microrganismos encontram-se mortos ou em dormência devido à ausência de substrato orgânico (Moreira e Siqueira, 2006). Apesar da elevada diversidade microbiana do solo, em função de sua natureza oligotrófica, a atividade biológica dos microrganismos é bastante limitada, podendo ser incrementada pela aplicação de diferentes fontes de matéria orgânica, como por exemplo os vermicompostos.

A transformação dos resíduos orgânicos pela ação das minhocas é uma técnica rápida e de baixo custo para transformar grandes quantidades de resíduos em um produto seguro ambientalmente e de valor econômico (Gómez-Brandón e Domínguez, 2014). A prospecção dos recursos microbiológicos na vermicompostagem, pode ser útil para o isolamento de microrganismos com habilidade de produzir compostos biologicamente ativos (Yasir et al., 2009; Aguiar et al., 2012), solubilização de fosfatos, produção de sideróforos (Gopalakrishnan et al., 2014) e degradação da celulose (Aira et al., 2006).

Além disso, o vermicomposto tem a vantagem de estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal pela alteração nas propriedades físico-químicas e biológicas do solo (Srivastava et al., 2011). O conhecimento desta biodiversidade e suas interações podem ser úteis para gerar benefícios econômicos e estratégicos tais como a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis para o desenvolvimento de insumos biológicos.

Ao longo do processo de vermicompostagem são produzidos no trato intestinal das minhocas, proteínas, glicoproteínas e glicosídeos, (Pramanik et al., 2009), além de ocorrer o aumento da área de superfície (fragmentação) do resíduo orgânico (Dominguez e Edwards, 2010). São criadas condições adequadas para promover o incremento da atividade e diversidade microbiana de acordo com Srivastava et al. (2011). Sendo assim, as relações entre as minhocas e os microrganismos neste ambiente, podem ser entendidas de várias formas: os microrganismos podem fazer parte da nutrição das minhocas ou se multiplicarem no seu trato intestinal, as minhocas podem ainda auxiliar na distribuição dos microrganismos e atuar juntamente na decomposição da matéria orgânica (Devi et al., 2009). Durante as fases iniciais do processo de decomposição, compostos mais lábeis são metabolizados levando a um aumento relativo dos compostos recalcitrantes. Microrganismos oportunistas capazes de invadir rapidamente e prosperar nos substratos solúveis e outras formas lábeis são os primeiros a colonizar. Quando o substrato desaparece, esses microrganismos são substituídos por um novo grupo de decompositores com capacidade de decompor a holocelulose por meio de enzimas hidrolíticas e oxidativas predominando então, compostos lignocelulosídicos nas fases posteriores da decomposição (Moorhead e Sinsabaugh, 2006).

Associado a estes diferentes substratos existe uma comunidade organizada e estruturada com capacidade enzimática para metabolizar estes compostos orgânicos com características químicas distintas. Este ambiente gera condições favoráveis para sobrevivência e multiplicação desses microrganismos que irão apresentar composição genética variável ao longo do processo de maturação. Em tese, esses micróbios podem ser isolados e utilizados em diferentes processos biotecnológicos.

Diversos autores têm demonstrado o aumento considerável da atividade e diversidade microbiana no vermicomposto. Edwards e Fletcher (1988) observaram que durante o trânsito do resíduo através do sistema digestivo da minhoca, foram observados aumentos no número de microrganismos em até 1000 vezes. A atividade da *Eisenia foetida* (Oligochaeta, lumbricidae) em dejetos suínos foi capaz de ativar o crescimento de fungos provocando decomposição eficiente da celulose durante a vermicompostagem (Aira et al., 2006). Em vermicomposto produzido a partir de resíduos vegetais foi possível aumentar as populações de bactérias, fungos, actinomicetos, bactérias fixadoras de nitrogênio, *Pseudomonas* e bactérias solubilizadoras de fosfato em relação ao controle sem a inoculação da minhoca (Srivastava et al., 2011). Um grande número de trabalhos tem evidenciado a presença de várias bactérias que podem ser úteis para diversos fins biotecnológicos em diversos vermicompostos (Yasir et al, 2009). Por exemplo, Pathma e Sakthivel (2013) trabalhando com resíduos vegetais e esterco de cabra isolaram um total de 193 bactérias que exibiram potencial antagônico a fungos fitopatogênicos e efeito biofertilizante. As bactérias pertenciam principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Microbacterium*. A caracterização funcional dessas estirpes bacterianas mostrou um grau variável de perfis de utilização de carbono e capacidades diferentes para produzir protease, celulase, ácido indolacético (AIA), sideróforos e solubilizar fosfato, além de atividade antibacteriana contra patógenos humanos em condições *in vitro*. Já em vermicomposto produzido a partir de folhas de coco, foram identificadas as bactérias fixadoras de N₂, *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., e as amonificantes e nitrificantes *Nitrosomonas* spp., *Nitrobacter* spp., além de outras bactérias solubilizadoras de P (Gopal et al., 2009).

Além de fornecer nutrientes e ser fonte potencial para prospecção de microrganismos, os vermicompostos podem ainda adicionar microrganismos benéficos ao solo. A diversidade de bactérias benéficas em diferentes vermicompostos é condicionada pela qualidade dos resíduos orgânicos de origem e pelas espécies de minhocas envolvidas (Fernandez-Gomez et al., 2012). Supostamente, determinados tipos específicos de microrganismos poderiam ter suas populações aumentadas quando o vermicomposto for produzido a partir de materiais específicos. Isso reforça a ideia de que a composição da comunidade microbiana de um vermicomposto determina em grande parte a sua utilidade na

agricultura e outras aplicações, tais como restauração do solo e biorremediação (Gómez-Brandón e Domínguez, 2014).

Apesar de ser reconhecido por sua capacidade de abrigar uma elevada comunidade microbiana e ativar seu crescimento durante a passagem do material digerido pelo intestino da minhoca, o verdadeiro potencial do vermicomposto pode ser mais elevado do que parece. Aguiar (2012) observou a existência de números populacionais de bactérias diazotróficas variando de muito baixos a não detectáveis pelo método clássico de número mais provável em amostras de vermicompostos. Assim, foi proposta uma nova metodologia baseada na quantificação das populações bacterianas induzidas ou não pela aplicação de fontes de carbono lábeis ou exsudados da rizosfera (Aguiar, 2012). A estimativa do número de bactérias por grama de vermicomposto obedeceu a três parâmetros: (a) quantificação da população sem indução; (b) quantificação da população após aplicação de uma solução contendo três fontes de carbono e (c) quantificação da população após germinação e estabelecimento de um coquetel de plântulas. Na ausência de estímulo, a população nativa de diazotróficos do vermicomposto (população sem indução) não foi detectada em vermicomposto de esterco bovino, enquanto que o vermicomposto produzido com a torta de filtro apresentou $6,4 \times 10^2$ UFC g^{-1} de vermicomposto. No entanto, quando houve a indução (aplicação de três fontes de carbono) foi possível recuperar surpreendentemente $2,0 \times 10^4$ e $6,4 \times 10^6$ UFC. g^{-1} de vermicomposto de esterco bovino e torta de filtro, respectivamente. Ainda neste trabalho foi possível detectar a presença de bactérias solubilizadores de P e de Zn, além da produção de AIA por estas estirpes em quantidades variáveis.

Apesar de vários estudos realizados até o momento sobre as comunidades microbianas no vermicomposto, a maioria deles tem-se centrado sobre as mudanças que ocorrem no início e no final da fase de maturação (Aira et al., 2006; Anastasi et al, 2005). Recentemente Reis (2014) avaliou a composição da comunidade de bactérias no decorrer do processo de vermicompostagem (0, 30, 60, 90 e 120 dias após a introdução das minhocas) nos quais foram recuperados 297 isolados oriundos do vermicomposto de esterco bovino e torta de filtro. Destes, 135 isolados apresentaram capacidade de fixar N. Neste trabalho, apenas os isolados provenientes de 30 e 60 dias de vermicompostagem foram testados quanto às características fenotípicas relacionadas à promoção de crescimento

das bactérias. Aos 30 dias, 75 % foram capazes de solubilizar P e 80 % foram capazes de solubilizar Zn. Já aos 60 dias, houve uma redução no número de isolados com capacidade de solubilizar P (55%) enquanto os solubilizadores de zinco permaneceram constantes (80%). Todos os isolados testados foram capazes de produzir AIA na presença e na ausência de triptofano.

Alterações nas propriedades químicas do vermicomposto são acompanhadas por alterações quantitativas e qualitativas nas comunidades microbianas associadas. As relações causais entre alterações químicas e biológicas não são facilmente perceptíveis e devem incorporar análises aprofundadas das dinâmicas populacionais culturáveis e não culturáveis e das variações na composição molecular da matéria orgânica no curso da maturação. A grande atividade biológica, a variedade e a complexidade dos resíduos orgânicos presentes no vermicomposto podem servir como base para bioprospecção de microrganismos potencialmente exploráveis.

2.2 Interação Fungo-Bactéria (IFB)

As bactérias e os fungos geralmente coexistem praticamente em todos os ecossistemas analisados, e sendo assim, estes microrganismos estabelecem uma série de interações (Junior et al., 2010). É provável que dada a sua longa história de coexistência no mesmo habitat, organismos particulares de ambos os grupos podem ter evoluído em uma interação mais ou menos complexa (Warmink et al., 2009).

Historicamente, a separação clássica da investigação microbiológica entre bacteriólogos e micologistas levou ao estudo de bactérias e de fungos em ambientes axênicos. Esta compartimentalização ignorou o fato de que em muitos ambientes bactérias e fungos coexistem e interagem (Frey-Klett et al., 2011). As interações entre esses organismos podem ter efeitos sobre a sobrevivência, colonização e patogênese de ambos.

Estudos contemporâneos têm revelado que fungos e bactérias muitas vezes formam fisicamente e metabolicamente consórcios interdependentes com propriedades distintas de seus componentes individuais (Tarkka et al., 2009). As associações físicas entre eles podem variar de comunidades polimicrobianas

aparentemente desordenadas para associações simbióticas altamente específicas de hifas fúngicas e células bacterianas (Frey-Klett et al., 2011). As bactérias do solo que possuem mecanismos que lhes permitem interagir com os fungos podem obter uma vantagem física quando presente na vizinhança de uma série de fungos (Warmink et al., 2009). Como possível mecanismo para seleção de células bacterianas associados aos fungos, está a liberação de substâncias orgânicas complexas, como resultado da atividade de exoenzimas de fungos e a exsudação de açúcares solúveis tais como a trealose, polióis ou ácidos orgânicos (Boer et al., 2005), que podem aumentar o número de bactérias ou ainda a exsudação de produtos químicos inibitórios que selecionam as bactérias resistentes aos antibióticos (Hryniewicz et al., 2010).

Os mecanismos de interação fungo-bactéria (IFB) são, sem dúvida diversificados, sendo geralmente caracterizados pela concorrência direta por recursos (Mille-Lindblom e Tranvik, 2003), micofagia (Boer et al., 2005), bacteriofagia e endosimbiose (Partida-Martinez et al., 2007). No entanto, os mecanismos mais estudados são os da interação *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, devido a sua importância como patógenos de seres humanos (Wargo e Hogan, 2006) e ao efeito das bactérias auxiliares na sobrevivência e no crescimento de fungos micorrízicos do solo (Frey-Klett e Garbaye, 2005).

A micorrizosfera se refere à zona influenciada tanto pela raiz da planta quanto pela hifa do fungo micorrízico, já o termo mais específico hifosfera se refere apenas à zona circundante das hifas fúngicas individuais, sem o efeito rizosférico. O efeito micorrizosfera manifesta-se pela mudança na estrutura das espécies dominantes ou eliminação completa de certas espécies. Nos últimos anos, vários tipos de microrganismos têm sido relatados associando-se com a rizosfera de diversas plantas hospedeiras colonizadas por fungos micorrízicos (Budi et al., 1999). A microflora presente na micorrizosfera poderia ter um efeito positivo ou negativo sobre a simbiose, dependendo dos isolados. O exemplo mais conhecido dos efeitos benéficos conferidos por bactérias associadas aos fungos são as das chamadas bactérias auxiliares (Garbaye, 1994), ou seja, bactérias, que auxiliam a formação de micorriza ou aquelas que interagem positivamente para o funcionamento da simbiose (Frey-Klett et al., 2007).

O teor de carbono nos solos, que rege os recursos tróficos, tem uma grande influência na distribuição heterogênea da microbiota do solo (Maron et al., 2011). Os produtos da atividade das exoenzimas fúngicas podem atrair bactérias para a hifosfera e dessa forma esse ambiente pode ser considerado como "hotspot" das interações microbianas (Baschien et al., 2009). A diversidade de açúcares produzidos na hifosfera de fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) pode ser responsável por algumas das variações espaciais e temporais da diversidade microbiana nos solos. Há liberação de carboidratos pela exsudação, ou senescência do micélio, o qual é então utilizado por micróbios do solo (Hooker et al., 2007).

É possível então supor que comunidades bacterianas associadas aos fungos podem ser modificadas em função da liberação de, açúcares pelas hifas e que, normalmente, são utilizados pelas bactérias do solo. No trabalho realizado por Warmink et al. (2009), foi possível observar aumento na diversidade das comunidades de *Pseudomonas* na maioria das micorrizosferas, o que contrastou com a diminuição da diversidade das comunidades bacterianas totais nesses ambientes. Os resultados permitiram indicar a existência de fungifilo tanto universal, como específico definido como bactérias adaptadas à hifosfera de três ou mais espécies de fungos ou a apenas uma espécie, respectivamente. A seleção de tais fungifilos mostrou-se fortemente relacionada à sua capacidade para usar determinados compostos de carbono.

As alterações determinadas pela hifosfera de fungos micorrizados não se restringem aos açúcares exsudados. A distribuição heterogênea da microbiota do solo é também determinada pela estrutura do solo e porosidade que influencia a quantidade de água livre, a aeração e a predação segundo Maron et al., (2011). Os compostos orgânicos produzidos pelas hifas participam na agregação de partículas do solo, o que pode proporcionar microsítios para colonização e crescimento microbiano (Johansson et al., 2004), atraindo assim bactérias e fungos para esses novos nichos. A modulação do ambiente físico-químico pode ainda ocorrer pela alteração do pH. Assim, alterações no pH poderiam afetar a estrutura da comunidade microbiana por promover ou inibir o crescimento de organismos sensíveis (Frey-Klett et al., 2011). Dessa forma, as bactérias poderiam ser atraídas para a hifosfera não apenas pela produção dos exsudados, mas também devido à baixa concorrência com outras espécies.

O biofilme misto contendo fungos (filamentosos ou não-filamentosos) e bactérias (BFB) pode ser considerado como o segundo nível de associação mais íntima entre esses dois parceiros (Frey-Klett et al., 2011). Esta associação pode ser classificada como uma relação ectosimbiótica na qual as bactérias permanecem do lado externo da membrana plasmática fúngica (Frey-Klett et al., 2011). Complexos contendo bactérias e fungos são frequentemente encontrados em diversos ambientes. Porém, a interação fungo-bactéria mais bem documentada em nível molecular é sem dúvida a interação entre o fungo polimorfo *Candida Albicans* e outros agentes patogênicos, tais como, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. *C. Albicans* é um membro comum da microflora cutânea, oral e intestinal de seres humanos e como agentes patogênicos oportunistas são capazes de causar uma ampla gama de infecções (Wargo e Hogan, 2006). *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* têm sido co-isolados de diversas superfícies mucosas, incluindo a mucosa oral na forma de biofilme (Peters et al., 2010). Quando *C. albicans* se encontra associado a biofilme com *Staphylococcus aureus* se tornam extremamente resistentes aos antibióticos (Sordi e Muhlschlegel, 2009). Sendo assim, as abordagens tradicionais de antibióticos e antifúngicos são frequentemente ineficazes para estas características (Wargo e Hogan, 2006). O biofilme fungo-bactéria também foi encontrado em outros ambientes, tais como sistemas agrícolas e florestais. A formação do biofilme *Rhizobium* com fungos comuns do solo é uma estratégia plausível para a sobrevivência da bactéria (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2003). Através da ancoragem as bactérias não só se posicionam sobre uma superfície, mas também obtêm o benefício adicional da versatilidade fenotípica dos seus vizinhos (Davey e O'toole, 2000).

Uma das vantagens do biofilme é a concentração de enzimas hidrolíticas celulares, que permitem aumentar as reações de biodegradação. As tecnologias atuais de conversão de materiais lignocelulósicos para biocombustíveis são dificultadas por etapas caras de processamento no pré-tratamento, na sacarificação, e na recuperação do produto (Wang e Chen, 2009). A integração de deslignificação e sacarificação entre fungos e bactérias oferece a possibilidade de completar deslignificação e sacarificação simultaneamente (Wang e Chen, 2009).

A relação endossimbiótica na qual as bactérias estão localizadas no interior da célula fúngica é provavelmente a interação mais íntima entre fungos e bactérias (Frey-Klett et al., 2011). Este arranjo é diferente do biofilme, no qual as bactérias permanecem aderidas à superfície das hifas fúngicas. Nesta associação, as bactérias ocupam o citoplasma das hifas dentro do micélio do fungo e, em alguns casos, também os esporos fúngicos (Lumini et al., 2006). Em um levantamento de fungos endofíticos isolados de tecidos de seis espécies florestais, usando microscopia e técnicas moleculares Hoffman e Arnold (2010) demonstraram que diversas espécies ocorrem dentro da hifa dos fungos endofíticos foliares. Bactérias endohifal inicialmente foram observadas em 75 dos 414 isolados endofíticos obtidos por Hoffman e Arnold (2010). Estes resultados sugerem que a capacidade de abrigar bactérias endohifal é generalizada entre os fungos. Outro exemplo de interação endossimbiótica é a que ocorre entre a *Burkholderia rhizoxina* e *Rhizopus microsporus*. Partida-Martinez et al. (2007) foram capazes de visualizar a colonização de hifas fúngicas pelas bactérias, a sua migração dentro das hifas e a sua presença em esporos de fungos. Esse tipo de arranjo pode beneficiar o fungo ou a bactéria e algumas das toxinas que foram previamente associadas aos fungos, podem ser produzidas por endobactéria. Um exemplo particularmente interessante é encontrado com *Rhizopus*, um fungo fitopatogênico que causa morte de plantas de arroz. A reinvestigação desta estirpe fúngica por meio de uma série de experiências revelaram que esta micotoxina não é realmente produzida pelo fungo (Partida-Martinez et al., 2007a). Análise de PCR e estudos filogenéticos baseado em sequências de 16 S rDNA revelaram que a bactéria associada ao fungo pertence ao gênero *Burkholderia*.

Vários benefícios são conferidos aos fungos e às bactérias quando estão associados formando biofilme, no interior da hifa ou, ainda, nas proximidades da hifa. Essas vantagens, porém não se restringem a ambos os parceiros. Diversos trabalhos têm demonstrado a melhoria no estado nutricional de plantas quando inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Por exemplo, a inoculação de *Glomus intraradices* com as bactérias *Pseudomonas jessenii* e *Pseudomonas synxantha* aumentou a produção de grãos de trigo em 41% quando comparado ao controle não inoculado (Mader et al., 2011). A concentração de proteínas e de nutrientes minerais dos grãos de trigo (fósforo, potássio, cobre, ferro, zinco, manganês) foi superior com a

inoculação e a eficiência do uso de fósforo dos grãos também foi aumentada em 95%. Os biofilmes desenvolvidos com bactérias fixadoras de nitrogênio vêm sendo frequentemente utilizados a favor do crescimento e desenvolvimento vegetal. A incorporação de uma estirpe de *Rhizobium* fixador de N₂ para formar biofilmes fungo-rizóbio demonstrou melhorar as aplicações potenciais do biofilme em ambientes deficientes em N (Seneviratne et al., 2008). O uso de biofilmes microbianos (*Acetobacter* spp., *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp. e *Colletotrichum* spp não patogênicas) desenvolvidos com fixadores de N₂ para a recuperação de solos degradados pelas práticas agrícolas convencionais reduziu em 50% a quantidade de fertilizantes químicos usados. Além disso, aumentou significativamente a biomassa microbiana do solo e diminuiu a infestação de pragas (Serenevitane et al., 2011). A aplicação combinada também aumentou o carbono orgânico do solo em 20% e reduziu a transpiração foliar em 40%, o que não foi observado quando o rizóbio foi inoculado em monocultura. A aplicação do biofilme também aumentou a fixação de N na soja quando inoculado com *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019 em 30% em comparação com o rizóbio inoculado sozinho (Jayasinghearachchi e Seneviratne, 2004). Este resultado foi surpreendente, uma vez que a estirpe de rizóbio utilizada neste trabalho apresenta uma alta capacidade de fixação de N₂. Um possível mecanismo para este efeito tão pronunciado é a utilização de uma estirpe diazotrófica no biofilme. Com fornecimento adequado de carbono pelo fungo a bactéria pode ter fixado N₂ eficientemente (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2005).

2.3 Bioinoculante

Na segunda metade do século XX o mundo viveu a euforia das altas produtividades resultantes da aplicação dos avanços científicos resumidos em um pacote tecnológico denominado “revolução verde”. A base foi direcionada à produtividade máxima mediante o uso intensivo das terras, monocultura extensiva, aplicação de fertilizantes e pesticidas, melhoramento genético e da irrigação em algumas regiões (Siqueira et al., 1999). Com este modelo, a produção mundial de grãos triplicou entre 1950 e 1990, passando de 631 a 1.780 milhões de toneladas (Urquiaga et al., 1999). Entretanto, para atingir esta elevada produtividade tornou-se necessário o uso de grandes quantidades de fertilizantes,

especialmente o nitrogenado. Este modelo de produção tem-se mostrado pouco sustentável tanto do ponto de vista econômico quanto do ecológico.

Apesar dos impactos gerados e a conscientização pela busca de tecnologias sustentáveis, ainda está sob influência do pacote tecnológico da revolução verde e seus efeitos adversos tornaram-se ainda mais evidentes com a crise energética. Investir em alternativas de produção agrícola não é mais um discurso de opções ideológicas e econômicas, mas uma necessidade real, uma vez que a agricultura produz impactos ambientais.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) a população mundial será de 8,3 bilhões em 2025 e 9,1 bilhões em 2050. Entre os diversos desafios que acompanham o aumento da população, está a elevação da produtividade, que deverá aumentar 70% de forma sustentável, capaz de gerar maiores produtividades sem degradar, obtendo produtos de maior qualidade, maior renda ao produtor e satisfação do consumidor final. Mas, como produzir mais de forma sustentável? Neste sentido, os microrganismos, seus produtos e processos são elementos essenciais para mudança do atual paradigma da produção agrícola. O melhor exemplo neste sentido é a cultura da soja. A partir do melhoramento genético vegetal e das pesquisas em microbiologia do solo foi possível substituir a adubação nitrogenada pelo uso de inoculantes com *Bradyrhizobium*, suprimindo todo N demandado pela cultura (250 kg N ha⁻¹ por cultivo), com uma economia equivalente a 1,5 bilhões de dólares ao ano (Urquiaga et al., 1999). Já na cultura da cana-de-açúcar, as contribuições da FBN permitiram que o cultivo de genótipos selecionados na ausência de adubos nitrogenados dispensasse o uso de N mineral (Baldani e Dobereiner, 1999).

Uma nova concepção de biofertilizante foi desenvolvida e patenteada junto ao INPI pelo Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (Nudiba) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Esta tecnologia tem como base o uso combinado da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* e ácidos húmicos que são reconhecidos por apresentar elevada atividade biológica.

Recentemente a Embrapa Agrobiologia (Seropédica/RJ) abriu concessão para o desenvolvimento de inoculantes baseados em cinco estirpes (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum*

rubrisubalbicans, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia* sp.). A inoculação utilizando a turfa como veículo inoculante em cana-de-açúcar foi capaz de proporcionar uma redução nos custos de produção, com economia de 30 kg N/ha/ano (Coopercana, 2015). Em parceria com a iniciativa privada, a Embrapa Soja e a Universidade Federal do Paraná (UFPR) desenvolveram o primeiro inoculante para cultura do milho e trigo. Com a adoção da tecnologia à base de seis estirpes de *Azospirillum brasilense* foi possível um incremento de 25 a 30% no rendimento do milho e de 8 a 11% no rendimento do trigo, podendo resultar em uma economia estimada de até 1 bilhão de dólares por safra só para cultura do milho (Hungria et al., 2012).

A introdução destas estirpes no solo e a utilização desse potencial ocorrem pela utilização de inoculantes. De acordo com o protocolo da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE), inoculante é todo produto que contenha microrganismos com ação estimulante ao crescimento vegetal. Entretanto, esses microrganismos quando inoculados no campo podem não conseguir encontrar um nicho ausente de microrganismos para sua sobrevivência, exceto em solo esterilizado, condição essa inexistente na agricultura (Bashan, 2014). As bactérias têm que competir com uma comunidade microbiana nativa complexa e adaptada, incluindo saprófitos, epífitas, endófitos, patógenos e microrganismos benéficos (Avis et al., 2008), além de sobreviver aos fatores adversos como variações de pH, concentração de alumínio e temperatura (Moreira e Siqueira, 2006). Em geral, logo após a introdução no solo, a população microbiana presente nos inoculantes declina progressivamente (Bashan e Levanony, 1988) impedindo a colonização adequada na rizosfera, e a expressão de seus efeitos benéficos sobre a produção vegetal.

Outro aspecto importante a ser considerado na formulação do inoculante é a seleção do veículo adequado (mesmo temporariamente) para prevenir o rápido declínio das bactérias introduzidas no solo (Bashan, 2014). Este microambiente adequado permite a manutenção da viabilidade das bactérias selecionadas, sua multiplicação na rizosfera e estabelecimento de uma interação benéfica com a planta hospedeira. Ainda não são conhecidos os atributos ambientais que possam favorecer os microrganismos presentes no inoculante em detrimento da biota nativa do solo (Avis et al., 2008). Apesar do enorme progresso na investigação da

interação planta-microrganismo em nível celular e molecular ainda há uma lacuna considerável sobre o uso de microrganismos mutualistas na agricultura (Mader et al., 2011).

Sendo assim, a eficiência da inoculação pode ser obtida, em parte, pela introdução de estirpes altamente competitivas ou usando-se altas taxas de inóculos (Martinez-Romero e Rosenblueth, 1990) (10^9 células/g ou mL de inoculante) ou, ainda, pela introdução de inoculantes mistos (Combinações de microrganismos) que interagem sinergicamente. Vários estudos realizados indicam que algumas combinações permitem que exista uma cooperação metabólica vantajosa, de tal modo que as bactérias interajam entre si sinergicamente, fornecendo nutrientes, removendo produtos inibitórios e se estimulando pelas atividades físicas ou bioquímicas que possam melhorar alguns aspectos benéficos da sua fisiologia, como a FBN (Bashan, 1998).

Os efeitos sinérgicos entre as bactérias e os fungos também podem ter potencial para beneficiar o crescimento vegetal. A capacidade das bactérias em colonizar a superfície da hifa e do esporo formando biofilmes, além de permitir a associação com a hifosfera dos fungos, tem evidenciado um aumento na atividade metabólica de ambos os parceiros quando associados. Pesquisas que objetivam prospectar a capacidade de fungos proporcionarem nichos bacterianos são recentes e já forneceram resultados interessantes sobre interações estruturais, tais como, a hifosfera (em que as bactérias permanecem externas às células fúngicas), endobactérias (bactérias no interior do fungo) e bactérias micófitas (capaz de adquirir todo alimento que necessita da superfície do fungo) (Boer et al., 2005). O biofilme das bactérias na superfície das hifas pode existir como complexos mistos conferindo apoio biótico para o seu estabelecimento (Seneviratne et al., 2008). Os fungos podem, assim, contribuir para o desenvolvimento de um novo nicho dentro do qual as bactérias podem desenvolver diferenças fisiológicas, tais como, resistência a antibióticos, estresses e expressão alterada dos genes de virulência em comparação com bactéria de vida livre (Harriott e Nover, 2009). Neste sentido, as bactérias podem ser encontradas em números mais elevados na hifosfera e com isso obter vantagem ecológica (Warmink et al., 2009) principalmente quando presentes em ambientes sistêmicos e dinâmicos tais como o solo. Uma seleção aparentemente específica para ambos os parceiros tem sido estudada no que diz respeito ao suposto

mecanismo envolvido nesta associação (Warmink et al., 2009). Este pressuposto está subjacente à ideia de que existem diferentes tipos de atividade microbiana melhorada ou alterada no solo em torno das estruturas fúngicas (Boer et al., 2005). Assim, o biofilme fungo-bactéria pode funcionar como “pseudonódulos” fixando N₂ na superfície das raízes não leguminosas favorecendo o crescimento e desenvolvimento vegetal (Seneviratne et al., 2008).

Novos nichos são criados no solo na presença do fungo devido ao consumo de exsudados fúngicos pelas bactérias (Boer et al., 2005). Porém, as interações entre os microrganismos ainda são mal compreendidas e pouco estudadas sendo necessária a elucidação dos mecanismos de ação e a sua ecofisiologia em relação aos outros habitantes presentes no solo, para permitir a utilização adequada desses organismos (Avis et al., 2008).

A maioria dos estudos realizados tem avaliado o efeito da aplicação combinada de diferentes estipes de bactérias ou sua interação com fungo micorrízico arbuscular. Neste sentido, o entendimento das interações entre fungos e bactérias promotoras do crescimento pode aumentar a eficiência da inoculação das bactérias e seu estabelecimento na rizosfera resultando em melhoraria para o uso desses microrganismos a favor da produção vegetal e de uma agricultura ambientalmente correta e economicamente viável. Antes, porém é preciso identificar a diversidade de fungos e bactérias com potencial para ser explorados biotecnologicamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção de Vermicompostos

Dois compostos diferentes foram utilizados na produção do vermicomposto. O esterco bovino (EB) foi adquirido do coletado em um curral de gado leiteiro de uma propriedade particular e a torta de filtro (TF) no pátio de descarte da Usina Coagro, ambos localizados em Campos dos Goytacazes - RJ. Os substratos foram submetidos à decomposição microbiana por 30 dias. Após este período, 15 Kg do substrato seco foram acondicionados em Minhobox[®] (50 cmX 25cm) e 5 Kg m⁻³ de minhocas da espécie *Eisenia foetida* foram adicionados. A umidade foi mantida em torno de 65-70%. Foram utilizadas três caixas de Minhobox[®] para cada substrato. O isolamento e a caracterização dos fungos foram realizados mensalmente após 30 dias de compostagem até a completa maturação, ou seja, aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias após a introdução das minhocas.

3.2. Isolamento, densidade e diversidade de fungos do vermicomposto

3.2.1. Isolamento

O isolamento dos fungos dos vermicompostos foi realizado pelo método da diluição seriada. Em cada época de avaliação (0, 30, 60 90 e 120 dias), amostras

de 10 g dos vermicompostos (EB e TF) foram suspendidas em 90 mL de pirofosfato de sódio decahidratado (0,1%) ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) para dispersão das partículas orgânicas e incubados a 30° C, sob agitação, por 1 hora, a 150 rpm. Decorrido este período, foram realizadas diluições seriadas em solução salina (0,85% NaCl). Uma alíquota de 100 μL das diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foi inoculada em triplicata em placas de petri contendo os meios descritos abaixo e incubadas por 7 dias, a 25°C, 35°C e 45° C, para permitir o isolamento de fungos mesófilos e termotolerantes.

- Meio Saboraud (Sab) e Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) suplementado com tetraciclina (100 mg L⁻¹).

- Meio Solo modificado (MS): O vermicomposto foi utilizado como fonte única de carbono e nutrientes (Zilli et al., 2003). Em cada época de avaliação separou-se uma fração do vermicomposto que foi seco em estufa de circulação de ar a 65°C por 24 h, posteriormente o material foi pulverizado em moinho. O preparo do meio constitui 10 g do vermicomposto pulverizado, 15 g de Ágar e água para completar o volume de 1000 mL. O meio foi autoclavado a 120°C por 15 min e vertido em placa de petri.

- Diferentes fontes de Carbono: Para isolamento de fungos que utilizam diferentes fontes de carbono (das mais simples às mais recalcitrantes) durante a vermicompostagem, foi utilizado o meio Czapek-Dox alterando a fonte de carbono. A composição do meio consistiu de 3,0 g L⁻¹ NaNO₃; 1,0 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄; 0,5 g L⁻¹ KCl; 10,0 mg L⁻¹ FeSO₄·7H₂O; 15 g L⁻¹ de Ágar. Como fonte de carbono foram utilizados manitol (MAN), celulose (CEL) (0.1%) e ácidos húmicos isolados de vermicomposto (AH) (25 mg L⁻¹).

- Meio L- asparagina: 0,5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 10 g L⁻¹ de dextrose; 0,5 g L⁻¹ L- asparagina; 0,5 g L⁻¹ KCl, 0,2 g L⁻¹ MgSO₄; 0,1 g L⁻¹ CaCl₂; 0,5 g L⁻¹ extrato de levedura; 15 g L⁻¹ de Ágar.

3.2.2. Caracterização, identificação e preservação

Após o período de incubação as colônias que se apresentaram distintas uma das outras com base no diâmetro, na cor, na textura e na presença de exsudados foram repicadas, purificadas em BDA e armazenadas em água destilada (método Castellani). Apenas as placas de Petri do meio BDA contendo

1-300 colônias foram utilizadas para a contagem. Os resultados foram expressos em número de UFC g⁻¹ de vermicomposto. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

A fim de se agrupar os fungos semelhantes morfologicamente e recuperar os isolados estocados pelo método Castellani, todos os isolados obtidos foram novamente crescidos em placa com meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e incubados a 25 °C até obtenção de colônias isoladas. Após a confirmação da pureza, esses fungos foram estocados. Os fungos esporulados e não esporulados foram examinados utilizando um microscópio óptico Axioplan (Zeiss). A identificação baseou-se na esporulação e a identificação seguiu-se em nível de gênero com auxílio de chave morfológica.

3.3. Caracterização Fenotípica

A prospecção de traços promotores do crescimento vegetal foi realizada apenas dos fungos isolados em meio BDA ao longo do processo de maturação (0, 30, 60,90 e 120 dias).

3.3.1 Solubilização de Óxido de Zinco (ZnO)

Para determinar a capacidade de solubilização de zinco, os fungos crescidos inicialmente em meio BDA por 7 dias a 25°C foram inoculados no centro da placa de Petri contendo 10 g L⁻¹ de glicose, 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,2 g L⁻¹ de KCl, 0,1 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1,0 g L⁻¹ de ZnO e 15 g L⁻¹ de ágar. As placas foram incubadas por 7 dias a 25°C. Posteriormente a avaliação da solubilização foi realizada determinando o índice de solubilização (IS) através do diâmetro do halo da colônia e o halo de solubilização da colônia.

3.3.2 Solubilização de Fosfato tricálcico (Ca₃ (PO₄)₂)

O crescimento e a atividade solubilizadora de fosfato dos isolados foram avaliados em meio sólido Pikovskaya ágar (0,5 g L⁻¹(NH₄)₂SO₄; 0,1 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0,2 g L⁻¹ NaCl, 0,2 g L⁻¹ KCl; 0,02 g L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 0,002 g L⁻¹ MnSO₄.H₂O; 10,0 g L⁻¹ glicose, 0,5 g L⁻¹ extrato de levedura, 15 g ágar, 1 g L⁻¹

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de rosa bengala) (Pikovskaya, 1948). Discos de 5 mm cortados no bordo de crescimento foram inoculados no centro da placa de petri e incubados por 7 dias a 25°C . A capacidade de solubilização foi identificada pela presença de halo translúcido ao redor da colônia. O índice de solubilização (IS) foi determinado medindo-se o diâmetro do halo de solubilização e o halo de crescimento de cada colônia. Os isolados foram classificados quanto à capacidade de solubilização em baixa ($\text{IS} < 2$), média ($2 \leq \text{IS} \leq 4$) e alta ($\text{IS} > 4$) capacidade através da fórmula $\text{IS} = f \text{ halo (mm)} / f \text{ colônia (mm)}$ (Berraquero et al., 1976).

3.3.3 Avaliação da atividade celulolítica

Os fungos foram crescidos em meio BDA por sete dias. Discos de 5 mm, cortados no bordo de crescimento foram inoculados no centro da placa de petri contendo o meio de cultivo Czapek-Dox ($3,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $1,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$; $0,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4$; $0,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KCl}$; $10,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15 g.L^{-1} de Ágar) suplementado com carboximetilcelulose (CMC) (1%), como única fonte de carbono. As colônias foram crescidas por 7 dias a 25°C . Após o período de incubação, a atividade celulolítica foi avaliada adicionando-se 10 mL da solução corante de vermelho congo (0,025 %) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, durante 30 minutos. Em seguida o material inoculado foi lavado por 5 minutos em 5 mL de solução de NaCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) preparado no mesmo tampão. O halo claro ao redor da colônia indicou a atividade da celulase. O índice enzimático extracelular (IE) foi determinado pela relação entre diâmetro do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, de tal modo que quanto maior o índice, maior a capacidade que o microrganismo possui em degradar celulose (Hankin e Anagnostakis 1975).

3.4 Interação entre fungo e bactéria promotora do crescimento vegetal (IFB)

3.4.1 Origem dos Isolados

Os isolados fúngicos utilizados neste trabalho foram procedentes do isolamento feito ao longo do processo de vermicompostagem. A coleção resultante do isolamento foi constituída por 1172 isolados, e está mantida no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (UENF). Esta coleção representa a

diversidade fúngica isolada do EB e TF em três temperaturas (25, 37 e 45°C) ao longo do processo de maturação do vermicomposto (tempo zero, 30, 60, 90 e 120 dias). Para avaliar a interação fungo-bactéria foram selecionados dois isolados de *Trichoderma* spp. procedentes do EB na quarta avaliação (90 dias) e três bactérias promotoras de crescimento (*Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 isolado de raízes de cana-de-açúcar, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 com inserção do gene GFP por transposon e *Burkholderia phytatumum* estirpe STM 815 com inserção do gene GFP, provenientes da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (UENF).

3.4.2 Ensaio de Compatibilidade

Para os ensaios de compatibilidade discos de 5 mm cortados no bordo de crescimento dos fungos crescidos em meio BDA foram inoculados no centro da placa de petri. Em cada extremidade da placa foi inoculado uma alíquota de 10 µL das bactérias crescidas em meio líquido Dyg's (Döbereiner et al., 1995). Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. Os testes foram realizados em triplicatas. Após o crescimento foram analisados os resultados quanto à formação da zona de compatibilidade ou efeito de inibição do fungo sobre o crescimento da bactéria.

3.4.3 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade das células bacterianas e hifas fúngicas, a área da lamínula (metodologia descrita acima) foi cortada com auxílio de um bisturi e transferida para uma lâmina. Em seguida, esta região foi corada com marcadores fluorescentes utilizando o *LIVE/DEAD® BacLigth™ Bacterial Viability Kit* e incubado por 15 min, de acordo com a recomendação do fabricante. Em seguida esta área foi observada em microscópio de epifluorescência Zeis Axioplan.

3.4.4 Avaliação da capacidade das bactérias obter nutrientes diretamente da hifa

As bactérias e fungos que apresentaram compatibilidade foram utilizados para avaliação da capacidade da bactéria obter todos os nutrientes a partir dos exsudados fúngicos. Os fungos foram cultivados em placa de petri com dois

compartimentos como descrito por St-Arnaud et al. (1995). O primeiro compartimento recebeu o meio BDA. Enquanto o segundo compartimento recebeu primeiramente 4 mL do meio mínimo com Phytigel™ 0,4% (Sigma) contendo apenas 0,74 g L⁻¹ de MgSO₄. Posteriormente três lamínulas foram dispostas uma ao lado da outra neste compartimento. Em seguida 3 mL do mesmo meio foram adicionados sobre as lamínulas. O fungo foi inoculado no compartimento 1 e incubado a 25°C no escuro até a hifa atravessar o compartimento 1 e colonizar o compartimento 2. As bactérias foram cultivadas em meio Dyg's e posteriormente lavadas uma vez em solução salina (0,8 5% de NaCl) estéril. Uma alíquota de 10 µL foi inoculada diretamente sobre a hifa crescida em cima da lamínula no compartimento 2. Como controle, as bactérias foram inoculadas na ausência do fungo, para verificar se as colônias cresceram nos resíduos orgânicos contidos no meio. As amostras foram observadas em microscópio óptico (Axioplan – Zeiss) após 3 dias da inoculação da bactéria. Para realização dos testes foram utilizadas 3 repetições.

3.4.5 Densidade de bactérias crescidas sobre a hifa

A contagem foi realizada para avaliar o efeito dos exsudados fúngicos na população das bactérias que se encontram na hifosfera ou formando biofilme sobre a hifa.

A contagem das bactérias foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (Döbereiner et al., 1995). A área da lamínula (metodologia descrita acima) foi destacada com auxílio de um bisturi e o meio que cobria a região da lamínula foi transferido para 9 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) e incubado em agitador a 30 °C por 1h. Após este período, foram realizadas diluições seriadas retirando alíquotas de 1 mL e diluindo em 9 mL de solução salina até a diluição 10⁻⁸. Alíquotas de 100 µL das diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁸ foram transferidas para vidro de penicilina contendo 5 mL do meio JNFB semissólido. Os frascos foram incubados a 30 °C por 7 dias. Decorrido este período, foi avaliado o crescimento bacteriano pela presença de uma película branca na superfície do meio. O número de bactérias foi obtido pela consulta a tabela McCrady para três repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey em 5%.

3.4.6 Sobrevivência de bactérias em co-cultivo com fungos

Para avaliação da sobrevivência foram utilizadas duas condições: apenas a camada superficial de um Latossolo Amarelo (solo) como substrato e o bagaço-de-cana:solo (3:1 v/v). O bagaço foi triturado em moinho e assim como o solo, esterilizado três vezes em autoclave a 120 °C por 1 h. Posteriormente, os substratos foram acondicionados em erlenmeyer de 500 mL e novamente esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 30 min. As bactérias que apresentaram compatibilidade foram crescidas inicialmente em meio Dyg's sob agitação a 120 rpm durante 24 h a 30 °C. Para obtenção do inoculante, uma alíquota do pré-inóculo foi adicionada ao meio Dygs e crescido por 24 horas a 30 °C. Os fungos foram cultivados em BDA durante cinco dias a 25 °C. Posteriormente, cada frasco de erlenmeyer foi inoculado com 5 discos de 5 mm de diâmetro contendo o micélio fúngico e incubado por 10 dias a 25°C. Os frascos que foram utilizados como controle (sem fungo) receberam 50 mL de água destilada estéril. Após este período de incubação, todos os erlenmeyers receberam 20 mL de uma suspensão de bactéria. Os frascos foram novamente incubados a 28 °C por dez dias. Em seguida, foi realizada a contagem pela técnica do Número Mais Provável (Döbereiner et al., 1995) (metodologia descrita no item 3.4.5). Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estrutura da comunidade fúngica nos diferentes estádios de maturação do vermicomposto

Foi obtido um total de 849 isolados de fungos dos vermicompostos de EB e TF, em diferentes meios de cultivo (MS, BDA, Sab, Man, Asp, Cel e AH) e temperatura de isolamento (25, 35 e 45°C), durante o processo de vermicompostagem (Figura 1). A iniciativa de utilizar estes meios teve como finalidade contornar os problemas inerentes da metodologia dependente de cultivo. Sendo assim, foram identificados 14 gêneros no tempo zero seguido por um aumento aos 30 e 60 dias (21 gêneros), e uma redução até os 120 dias (11) de vermicompostagem (Figura 2).

Devido às dificuldades operacionais relacionadas ao trabalho com grande número de isolados, foram selecionados apenas os fungos provenientes do meio BDA para a identificação morfológica e avaliação da estrutura da comunidade fúngica durante a vermicompostagem. A decisão de utilizar o BDA teve como base o fato deste meio suportar o crescimento da maioria dos fungos, sendo por isso, amplamente usado no isolamento e na manutenção de culturas (Zauza et al., 2007).

Ao todo foram recuperados 238 isolados (165 do EB e 73 do TF) (Figura 1). Destes, 29 foram isolados no tempo zero; 42 na segunda avaliação (30 dias); 54 aos 60 dias; enquanto 76 foram isolados na quarta coleta (90 dias) e 37 na quinta avaliação (120 dias após a introdução das minhocas) (Figura 1).

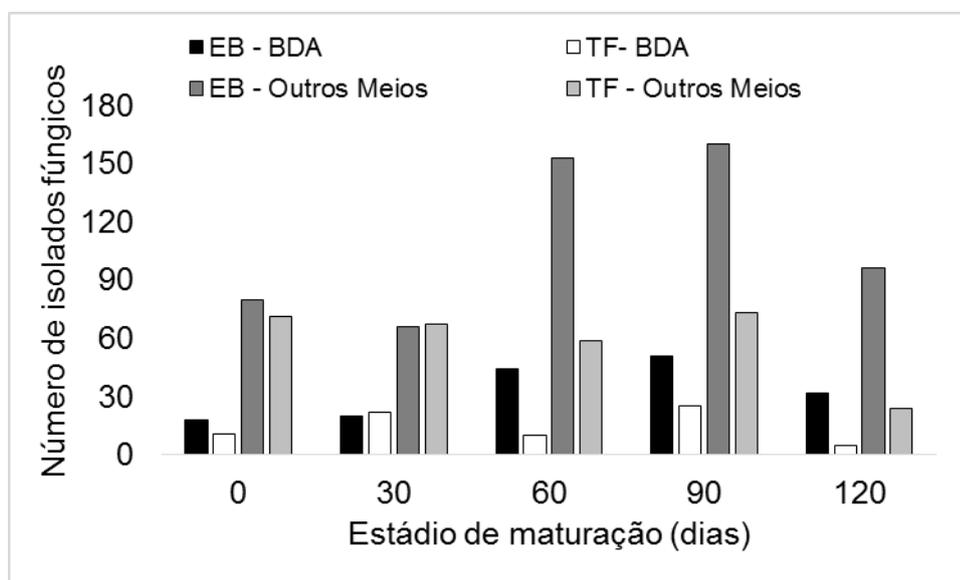


Figura 1. Número de fungos isolados nos meios de cultura a partir de Esterco Bovino e Torta de Filtro nas diferentes temperaturas (25°C, 37°C e 45°C) durante a vermicompostagem.

No tempo zero de vermicompostagem, caracterizado pela ausência de minhocas, a diferença do número de isolados recuperados entre EB e TF foi a mais estreita. Assim, nesta primeira coleta, dos 29 isolados obtidos, 18 foram provenientes do EB e 11 da TF. Entre os gêneros encontrados exclusivamente nesta avaliação, estavam o Basidiomiceto *Coprinus* sp. e o Zigomiceto *Rhizopus* sp., ambos oriundos respectivamente, do EB e da TF (Tabela 10).

Aos 30 dias após a introdução das minhocas, houve um aumento na quantidade de isolados recuperados. Com o trânsito do EB e da TF pelo trato intestinal das minhocas foi possível obter 20 isolados de EB e 22 da TF (Figura 1). A atividade das minhocas levou a recuperação de 7 gêneros de fungos isolados do EB (*Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp, *Mortierella* spp, *Penicillium* spp, *Trichoderma* spp e *Scopulariopsis* spp.) (Figura 3, Tabela 10). Enquanto 6 gêneros foram isolados da TF (*Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Gongronella* spp, *Colletotrichum* spp, *Penicillium* spp, *Trichoderma* spp).

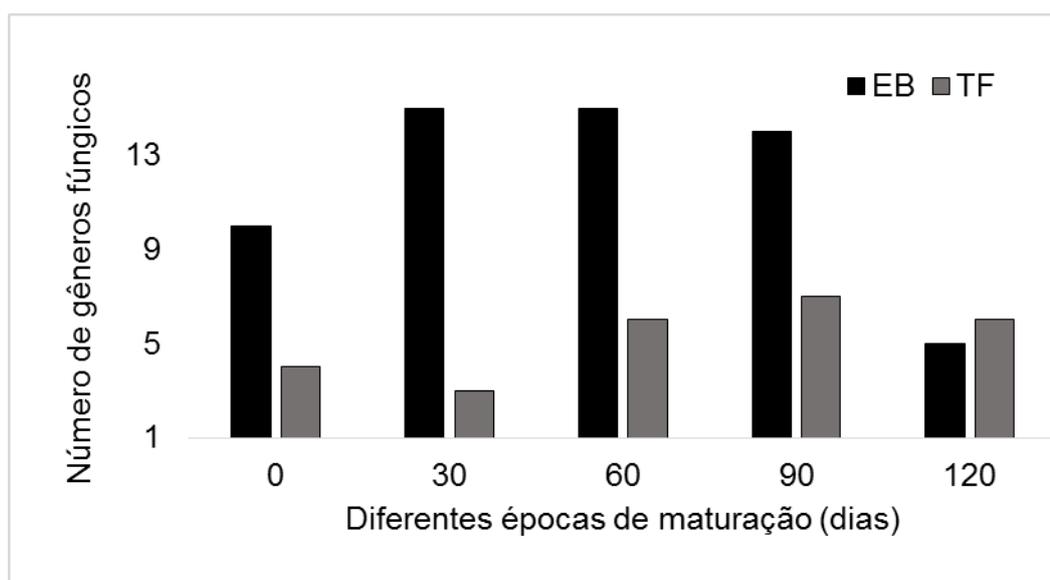


Figura 2. Número de gêneros fúngicos isolados nos meios de cultura AH, MAN, Sab, Cel, Asp e MS provenientes de Esterco Bovino e Torta de Filtro a 0, 30, 60, 90 e 120 dias de vermicompostagem.

Com o avanço do processo de vermicompostagem a pastagem das minhocas sobre os compostos orgânicos continuou afetando o número de isolados recuperados. Aos 60 dias foram obtidos 76 isolados, sendo 44 provenientes de EB e 10 da TF.

Houve um aumento no número de isolados obtidos aos 90 dias. Dos 76 isolados, 51 foram provenientes de EB e 25 de TF. Na fase final do processo de maturação houve uma redução no número de isolados recuperados. Aos 120 dias, 32 isolados foram oriundos de EB e apenas 5 da TF. O gênero *Alternaria* foi recuperado apenas aos 90 dias, enquanto *Helminthosporium* sp., *Nigrospora* sp. e *Pestalotiopsis* sp. foram obtidos exclusivamente aos 120 dias de vermicompostagem (Tabela 10).

Aos 90 dias, 6 gêneros foram originados somente de EB: *Alternaria* sp., *Cladosporium* spp., *Gongronella* spp., *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. e *Eurotium* sp. Apenas *Mortierella* sp., e *Aspergillus* sp. foram isolados unicamente de TF. Sete gêneros (*Cladosporium*, *Eurotium*, *Helminthosporium*, *Pestalotiopsis*, *Nigrospora*, *Aspergillus* e *Penicillium*) estavam presentes apenas no EB aos 120 dias. Já na TF não estava presente nenhum gênero isolado exclusivamente neste composto.

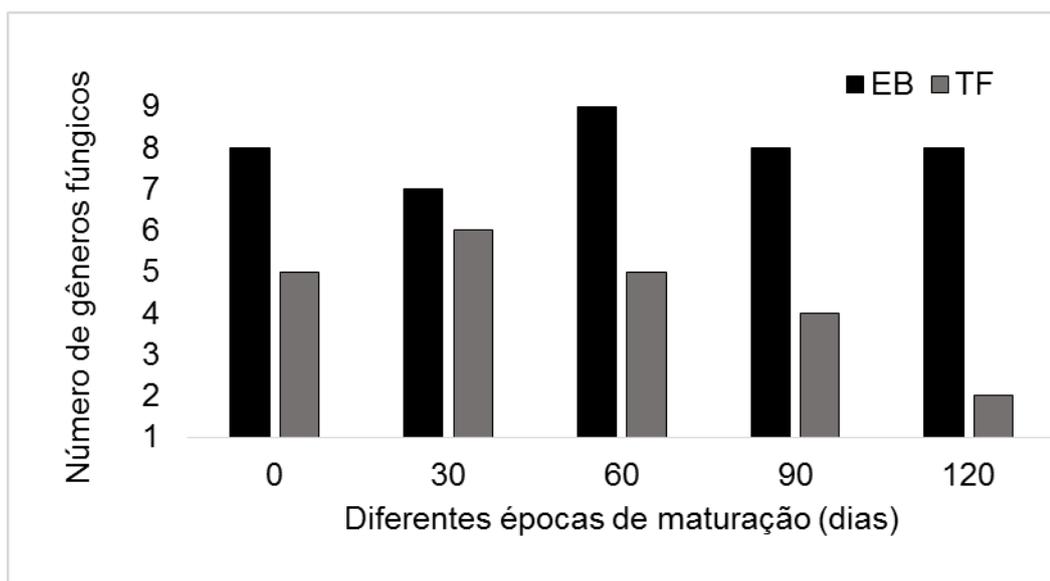


Figura 3. Número de gêneros fúngicos isolados no meio BDA provenientes de Esterco Bovino e Torta de Filtro a 0, 30, 60, 90 e 120 dias de vermicompostagem.

A ausência aos 30 dias de vermicompostagem dos gêneros isolados a 0 dias de vermicompostagem (*Monilia* sp., *Paecilomyces* sp., *Coprinus* sp. e *Rhizopus* sp.) (Tabela 10), pode ser atribuída à disponibilidade de substrato orgânico no vermicomposto, que tem demonstrado ser um importante regulador da dinâmica e da composição das comunidades microbianas. Variando as concentrações na composição de um substrato pode haver alteração na estrutura da comunidade microbiana como resultado da afinidade dos micro-organismos a concentrações de substrato específico (Griffiths et al, 1999).

Entre os fungos isolados no tempo zero e aos 30 dias da vermicompostagem três Basidiomicetos foram identificados (*Rhizoctonia* sp., *Coprinus* sp. e um isolado não esporulado) (Tabela 10). Basidiomicetos são os principais fungos saprófitas envolvidos na decomposição da lignina. Devido a sua elevada resistência contra a decomposição microbiana (Hofrichter e Steinbüchel, 2001) é geralmente aceito que a lignina é mais abundante nas fases posteriores da decomposição. Entretanto, a lignina representa uma fração dos resíduos orgânicos mesmo em estádios iniciais da decomposição (Talbot e Treseder, 2012), e pode apoiar o crescimento de fungos por preferência por este substrato ao longo da sucessão (Holden et al., 2013). Um exemplo, é o fungo endofítico *Coccomyces* sp. que provocou a deslignificação seletiva em folhas de *Camellia japonica* na fase inicial da decomposição (Koide et al., 2005). Osono (2009)

demonstrou que a deslignificação prévia influenciou a decomposição posterior pelos próximos colonizadores fúngicos. Sendo assim, uma maior diversidade de Basidiomicetos pode estar presente durante a maturação da vermicompostagem. No entanto, as técnicas de isolamento e cultivo utilizadas aqui podem ter limitado a seleção dos isolados, uma vez que apenas 1% dos microrganismos do solo é cultivável (Moreira e Siqueira, 2006).

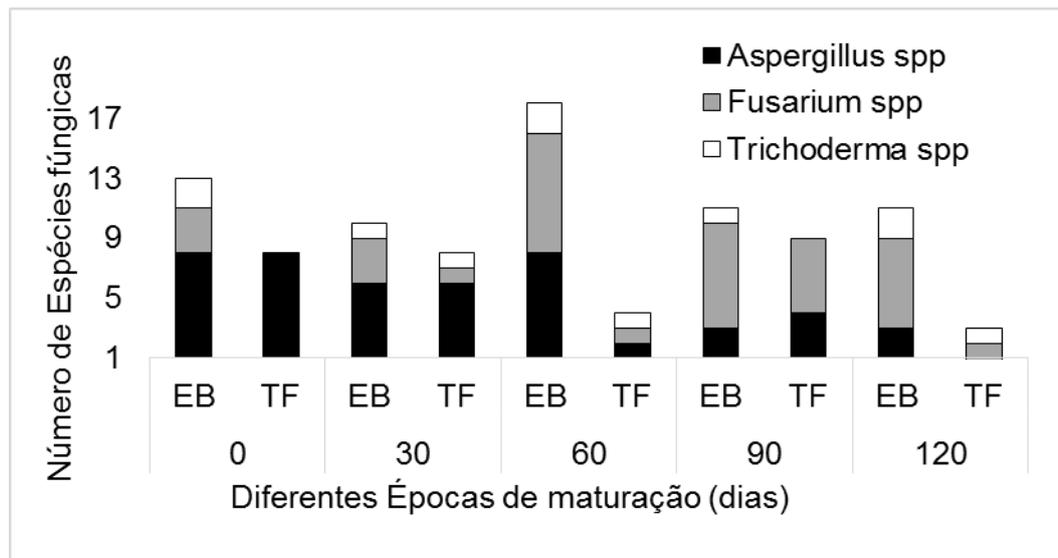


Figura 4. Número das principais espécies dos gêneros isolados do meio BDA durante a maturação do vermicomposto de esterco bovino e torta de filtro nas diferentes temperaturas de isolamento (25°C, 37°C e 45°C).

O aumento observado no número de isolados fúngicos durante o processo de vermicompostagem pode ser atribuído à atividade das minhocas, que favoreceu o crescimento desses fungos (Aira et al., 2006) (Figura1). Essa proliferação tem sido observada em diversos trabalhos por métodos de medida de atividade microbiana. A biomassa microbiana e a respiração do substrato induzido de resíduos orgânicos vermicompostados foram influenciadas pela digestão de *E. fetida* (Pramanik et al., 2009). Assim como as populações de fungos, responsáveis pela rápida mineralização dos resíduos que aumentou após a passagem do resíduo pelo intestino das minhocas (Aira et al., 2006).

É geralmente aceito que durante a decomposição de materiais vegetais, determinadas espécies fúngicas degradam compostos recalcitrantes, tais como a lignina nos estádios posteriores da decomposição (Kodsueb et al., 2008). A associação física da lignina com a celulose (revestimento) torna restrita a utilização da celulose pelas hifas fúngicas (Lynd et al., 2002). Sendo assim, a

atividade de fungos com preferência por este substrato leva a liberação da celulose e a subsequente presença de espécies celulolíticas. Este tipo de associação tem facilitado o crescimento e a atividade de “fungos açúcar” (Ingestad e Nilsson, 1964) provavelmente, por meio da produção de produtos intermediários durante a degradação enzimática da celulose (Hättenschwiler et al., 2011). Coletivamente, parece que existem amplas possibilidades de interações sinérgicas entre os micróbios pela facilitação e pelo particionamento de recursos (Hättenschwiler et al., 2011). Desse modo, nos mesmos compostos podem estar presentes fungos saprófitas que agem como decompositores primários, secundários e terciários e que se alimentam de grandes quantidades de carbono, bem como outros nutrientes (Grinhut et al., 2007). O resultado líquido é uma maior diversidade de fungos sobre o substrato ao longo do tempo, promovendo assim, a recuperação de um maior número de isolados.

A redução no número de isolados e gêneros fúngicos obtidos aos 120 dias, pode estar associada à dinâmica da população microbiana na vermicompostagem (Figura 1, Figura 3). Geralmente a função dos microrganismos no ecossistema aumenta linearmente e começa a estabilizar em níveis mais elevados de riqueza (McGuire et al., 2010), como foi observado aos 90 dias de vermicompostagem. Entretanto, como a fonte de carbono no meio nesse período torna-se mais complexa, apenas um grupo de fungos é capaz de produzir enzimas que visam somente um subconjunto específico do substrato disponível (Schimel et al., 2004). Assim, uma vez que diminui o número de micróbios que produzem enzimas para a degradação dos compostos orgânicos, cada espécie se adapta para ocupar um substrato específico no espaço e no tempo (Deacon et al., 2006) levando, subsequentemente, a diminuição no número de fungos capazes de utilizá-los, tais como observados aos 120 dias. Outro fato que pode ter contribuído para a redução no número de isolados é a menor atividade das minhocas nesse período e sua microflora intestinal nativa. Na presença de qualquer minhoca (*Eudrilus eugeniae* e *Eisenia foetida*), a população celulolítica de fungos foi aumentada progressivamente até a 7ª semana de vermicompostagem e, posteriormente, tornou-se constante até o final da vermicompostagem (Pramanik e Chung, 2011).

Um certo número de métodos tem sido utilizado para avaliação das comunidades fúngicas do solo. Nesse trabalho foi utilizada a técnica de diluição seriada. Como todo método baseado em cultivo, esta técnica possui limitações.

Por exemplo, a superestimação da densidade de espécies que produzem um grande número de esporos e a subestimação de espécies derivadas a partir de micélio ou aqueles com crescimento lento em cultura (Chigineva et al., 2009). Além disso, foi selecionado o BDA para avaliação da estrutura fúngica. Este meio pareceu juntamente com este método de isolamento privilegiar a recuperação de fungos anamórficos.

Apesar de suas limitações, a diluição seriada tem sido o método mais frequentemente utilizado para descrição da diversidade microbiana presente nos solos (Moreira et al., 2010). Para a avaliação das comunidades de fungos diversas técnicas têm sido utilizadas, incluindo, além das técnicas baseadas em cultivo, a análise de ácidos graxos de fosfolipídios (PFLA), a quantificação de ergosterol e a análise de ácidos nucleicos. Embora cada técnica apresente limitações, esses métodos oferecem uma visão parcial da estrutura da comunidade de fungos. Ainda não existe um método padrão, amplamente reconhecido e aceito para conduzir um inventário da diversidade de fungos (Moreira et al., 2010). Recentes abordagens genótípicas para a rápida identificação de micro-organismos estão começando a ser usadas e têm ajudado a resolver esses problemas, pelo menos em alguns casos (Santos et al., 2010).

No entanto, a técnica dependente de cultivo é o único modo que permite obter culturas puras para testá-las como possíveis promotores do crescimento vegetal, com o propósito de utilizá-las na construção de inoculantes.

Durante todo o processo de maturação os isolados recuperados foram compostos principalmente por 8 gêneros fúngicos, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Gongronella* spp., *Mortierella* spp., *Cladosporium* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., e *Trichoderma* spp (Figura 3, Tabela 10).

Todos os estádios de maturação da vermicompostagem apresentaram um perfil semelhante das comunidades microbianas. Os fungos anamórficos foram o grupo dominante, seguido pelos *Zigomicetos* e *Basidiomicetos*. Algumas espécies, tais como *Monilia* spp. e *Eurotium* spp., ocorreram ocasionalmente em algumas fases de maturação.

Durante o processo de maturação, a maioria das espécies isoladas pertencia aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* (Figura 4). Esses fungos pertencem ao grupo funcional que utiliza preferencialmente carboidratos solúveis e holocelulose não lignificada. Sendo por isso geralmente, os primeiros

colonizadores isolados nos estudos de sucessão (Ingham e Klein, 1984). Além disso, a técnica de isolamento aqui utilizada levou a um viés de seleção a favor desses grupos com esporulação mais abundante e que crescem com taxas maiores em meios axênicos e ricos em nutrientes (Moreira et al., 2010).

Esses gêneros de fungos são os mais comuns encontrados no ambiente. Por exemplo, em estudos sobre a decomposição de madeira de *Magnolia liliifera*, dentre as espécies mais comuns isoladas no início do processo estavam *Aspergillus niger*, *Chaetomium cupreum*, *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. (Kodsueb et al., 2008). Nos solos também tem sido possível observar a dominância desses fungos, os quais apresentam crescimento rápido. A composição da microbiota do solo da região conhecida como Canyon III, localizada no sul de Negev (Israel) foi composta principalmente de espécies pertencentes a 80 gêneros, sendo os mais comuns *Aspergillus* e *Penicillium* (19 espécies cada), *Chaetomium* (17 espécies), *Phoma* (14 espécies) e *Fusarium* (sete espécies) (Grishkan et al., 2007).

Os gêneros dominantes, de acordo com o número de espécies obtidas em nosso trabalho, foram os fungos típicos de solos e que estão envolvidos na decomposição da matéria orgânica (Nesci et al., 2006). A importância desses microrganismos no ambiente, no entanto, vai muito além do processo de decomposição. *Aspergillus* é um fungo saprófito onipresente normalmente residente no solo ou na matéria orgânica em decomposição (Amchentsev et al., 2008). Esse gênero possui o metabolismo versátil sendo amplamente utilizado como fungo promotor do crescimento vegetal. A inoculação de *Aspergillus austus* induziu um aumento na parte aérea e no crescimento das raízes, e no número de raízes laterais em *Tuberosum solanum* e *Arabidopsis* (Marina et al., 2011). Além disso, esses fungos são solubilizadores de fosfato (Mendes et al., 2013) e produtores de sideróforos (Haas, 2014). O gênero *Trichoderma* por sua vez é o fungo mais comumente usado como agente de controle biológico. Mais de 50 diferentes produtos baseados neste gênero podem ser encontrados (Woo et al., 2014). Esses produtos são vendidos e aplicados na proteção e melhoria do rendimento de hortaliças, plantas ornamentais e árvores frutíferas. *Trichoderma* é completamente seguro e nunca houve uma reação adversa registrada em seres humanos e animais (Radheshyam et al., 2012). *Penicillium* é um gênero considerado potente como promotor do crescimento vegetal. Este fungo pode

secretar hormônios tais como, AIA e giberelina e está envolvido na solubilização de fosfato justificando sua ação como promotor do crescimento vegetal (Khan et al., 2008). A inoculação com *P. pinophilum*, por exemplo, aumentou a absorção de nutrientes (N, P e K), assim como o índice de área foliar e a taxa fotossintética das plantas (Maity et al., 2014). Já o gênero *Fusarium* é considerado um dos mais problemáticos na fitopatologia, causando epidemias e perdas para a agricultura em todo o mundo (Ajillogba e Babalola, 2013). A Fusariose, por exemplo, é causada pelos fungos patogênicos, *Fusarium oxysporum* ou *Fusarium solani* (Fravel et al., 2003, Scarlett et al., 2015). No entanto, algumas estirpes de *F.oxysporum* não são patogênicas e podem até mesmo antagonizar o crescimento de estirpes patogênicas e ser utilizadas como agentes de controle biológico (Nawar, 2015).

Dos fungos recuperados, vários isolados esporularam, mesmo aqueles que só produziram corpos de frutificação sem esporos não foram identificados com base em marcadores morfológicos. Dentre outros fungos não identificados em nível de gênero encontram-se diferentes morfotipos do filo Zigomycota, no qual sua identificação só foi possível em nível de filo, pela ausência de septos nas hifas e formação de esporângios. Além disso, outros grupos produziram estruturas reprodutivas, tais como os picnídios, porém sem esporulação. As leveduras estavam presentes nos diferentes estádios de maturação e suas colorações variaram de roxa, a coral, chegando a alguns tipos brancos. Algumas leveduras do solo têm a capacidade de solubilizar fosfatos insolúveis, tornando-se mais facilmente disponível para as plantas. Recentemente, o potencial de leveduras do solo como promotores de crescimento de plantas e adubos foi estudado com o objetivo de usá-los no campo da agricultura sustentável.

Embora a sucessão microbiana seja um processo muito estudado na serrapilheira e madeira de diversas espécies vegetais, a mesma tem sido pouco avaliada durante o processo de vermicompostagem. Dos trabalhos realizados até o momento, a melhor caracterização da microbiota fúngica foi realizada por Anastasi e colaboradores (2005). Entretanto, a composição qualitativa e quantitativa foi realizada apenas no final do processo de maturação. Ainda neste estudo, foi isolado um total de 194 entidades: 118 de adubo verde compostado, 142 de vermicomposto e 66 eram comuns a ambos. O emprego de três meios (CMC e BDA suplementado com e sem ciclohexamida), e três temperaturas de

incubação (24, °C, 37°C e 45°C), permitiu o isolamento de um número elevado de espécies fúngicas, sendo superior ao encontrado nesse trabalho. Vale ressaltar, no entanto, que o material compostado, pelos autores, era diverso, composto por 70 % de esterco (vacas, aves e animais de zoológico) e 30 % de resíduos de plantas de várias fontes.

4.2 Densidade populacional fúngica durante a vermicompostagem

A carga fúngica dos compostos variou durante a maturação. A dinâmica populacional deixou evidente que a densidade presente na TF foi significativamente superior à do EB independente do estágio de maturação e da temperatura de isolamento (Tabela 1). A TF apresentou valores entre $2,44 \times 10^5$ (30 dias) a $6,55 \times 10^6$ (120 dias), enquanto a carga fúngica mais elevada no EB foi $1,33 \times 10^5$ (90 dias) e a menor $4,66 \times 10^4$ UFCg⁻¹ (tempo zero) aos 25 ° C (Tabela 1). Na temperatura de 37 °C a TF também produziu valores mais elevados, sendo uma ou duas unidades log₁₀ superior ao EB.

Tabela 1. Densidade populacional (UFC/g de vermicomposto) dos fungos isolados de esterco bovino e torta de filtro nos diferentes estádios de maturação do vermicomposto incubados a 25°C e 37°C.

		Época de maturação do Vermicomposto				
		0	30	60	90	120
		25°C				
EB		4,66X10 ⁴ b	6,21X10 ⁴ b	6,00X10 ⁴ b	1,33X10 ⁵ b	7,33 X 10 ⁵ b
TF		5,79X10 ⁵ a	2,44X10 ⁵ a	7,30X10 ⁵ a	1,67 X10 ⁶ a	6,55 X10 ⁶ a
		37°C				
EB		2,88X10 ⁴ b	1,08X10 ⁴ b	6,66X10 ⁴ b	8,44X10 ⁴ b	2,22X10 ⁴ b
TF		5,86X10 ⁶ a	1,47X10 ⁶ a	3,58 X10 ⁵ a	1,46 X10 ⁶ a	1,22X10 ⁶ a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey em 5%.

No EB, a temperatura de 25 °C produziu valores de UFC g⁻¹ significativamente superior ao encontrado a 37 °C aos 90 e 120 dias (Tabela 1). Estes resultados já eram esperados, uma vez que a maioria dos microrganismos isolados são mesófilos, ou seja, crescem em temperatura ambiente (Bills et al., 2004). Algumas destas espécies também são capazes de crescer em altas temperaturas, sendo consideradas termotolerantes. Tem-se observado que o meio de cultivo e as condições de incubação têm produzido diferentes valores de

carga dentro do mesmo composto. Em vermicomposto produzido a partir de plantas e animais, a densidade fúngica no final do período de vermicompostagem foi $4,0 \times 10^5$ na temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$, enquanto a 37 e $45\text{ }^\circ\text{C}$ apresentaram $2,4 \times 10^5$ e $1,2 \times 10^5$, respectivamente (Anastasi et al., 2005).

Tabela 2. Densidade populacional (UFC/g⁻¹) dos fungos isolados de vermicomposto produzido com esterco bovino (EB) e torta de filtro (TF) em diferentes estádios de maturação incubados a 25°C e 37°C .

		Época de maturação do Vermicomposto				
		Tempo 0	30	60	90	120
		EB				
25	$4,66 \times 10^4$ a	$6,21 \times 10^4$ a	$6,00 \times 10^4$ a	$13,33 \times 10^5$ a	$7,33 \times 10^5$ a	
37	$2,88 \times 10^4$ a	$10,88 \times 10^4$ a	$6,66 \times 10^4$ a	$8,44 \times 10^4$ b	$2,22 \times 10^4$ b	
		TF				
25	$5,79 \times 10^5$ b	$2,44 \times 10^5$ b	$7,30 \times 10^5$ a	$1,67 \times 10^6$ a	$6,55 \times 10^6$ a	
37	$5,86 \times 10^6$ a	$1,47 \times 10^6$ a	$3,58 \times 10^5$ a	$1,46 \times 10^6$ a	$1,22 \times 10^6$ a	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey em 5%.

No vermicomposto produzido a partir de torta de filtro, a elevação da temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ para $37\text{ }^\circ\text{C}$ provocou um aumento significativo da UFC g⁻¹ no início do processo de vermicompostagem, sendo possível observar a diferença de 1 unidade log₁₀ no tempo zero em relação aos 30 dias de vermicompostagem (Tabela 2). O motivo para este comportamento não está claro, provavelmente a temperatura de isolamento poderia ter excluído espécies com capacidade de produzir antibióticos em placas (Wicklow, 1981), favorecendo a proliferação de fungos anamórficos de crescimento rápido (*Aspergillus*, principalmente *A. fumigatus*). Esta condição explicaria porque aos $37\text{ }^\circ\text{C}$ a densidade populacional foi maior do que a $25\text{ }^\circ\text{C}$ na TF nas duas primeiras avaliações. Com o passar do tempo de maturação a temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ passou a abrigar uma maior comunidade fúngica, embora não houvesse diferença estatística entre as temperaturas de incubação.

Considerando a dinâmica populacional ao longo do processo de maturação, a densidade fúngica mesófila ($25\text{ }^\circ\text{C}$) no EB teve pequena flutuação durante a vermicompostagem. No tempo zero foi possível recuperar $4,66 \times 10^4$ UFC g⁻¹, com um pico aos 90 dias ($1,34 \times 10^5$ UFC g⁻¹) e uma subsequente redução aos 120 dias ($7,33 \times 10^5$ UFC g⁻¹) (Tabela 2). Já na TF a $25\text{ }^\circ\text{C}$, a população oscilou nas três primeiras avaliações, em seguida houve um aumento

na densidade populacional aos 90 dias ($1,67 \times 10^6$ UFC g^{-1}) e aos 120 dias ($6,55 \times 10^6$ UFC g^{-1}). Provavelmente, este comportamento pode estar associado à ação favorável do intestino das minhocas. A pastagem das minhocas, dispersão dos esporos e as alterações físicas na estrutura do substrato têm sido reconhecidas por favorecer o crescimento desses fungos (Aira et al., 2006). Além disso, uma composição mais variada de resíduos orgânicos e as condições prevalentes durante as condições mesófilas da vermicompostagem são também favoráveis à proliferação de micro-organismos (Anastasi et al., 2005). No entanto, quando os isolados foram submetidos à temperatura de 37°C no EB a densidade se manteve praticamente estável ao longo da maturação com valores entre $1,88 \times 10^4$ UFC g^{-1} (30 dias) e $2,22 \times 10^4$ UFC g^{-1} (aos 120 dias). Na incubação a 37°C na TF, os maiores valores foram obtidos nas duas primeiras coletas ($5,86 \times 10^6$ UFC g^{-1} no tempo zero e $1,47 \times 10^6$ UFC g^{-1} aos 30 dias) seguido pela redução da população aos 60 dias ($3,58 \times 10^5$ UFC g^{-1}) e um aumento até o final da vermicompostagem ($1,46 \times 10^6$ UFC g^{-1} aos 90 e $1,22 \times 10^6$ UFC g^{-1} aos 120 dias).

No monitoramento da dinâmica populacional de bactérias heterotrófica e diazotróficas nos mesmos materiais compostados utilizados neste trabalho, Reis (2014) observou um pico na população de bactérias diazotróficas ocorrendo aos 30 dias para os dois meios utilizados (NB e Dyg's), seguido por uma redução até aos 120 dias, sendo que aos 30 dias a população de bactéria presente no EB foi superior a TF. Mas, as populações bacterianas associadas à torta de filtro tenderam a serem maiores no curso da maturação. Diferente das condições deste trabalho foi observada uma redução até aos 120 dias na população de bactéria heterotrófica, segundo o autor, está redução foi em parte justificada pela redução na atividade das minhocas e pela disponibilidade decrescente de carbono lábil, em função do processo de humificação da matéria orgânica. De forma similar à população de diazotróficos, na comunidade bacteriana heterotrófica, foi observado um pico populacional aos 30 dias após o início da vermicompostagem. No tempo zero (início da vermicompostagem), a população de diazotróficos associada ao vermicomposto de torta de filtro foi duas unidades \log_{10} maiores que o vermicomposto de esterco bovino para os dois meios utilizados.

A torta de filtro é reconhecida por favorecer o aumento na densidade populacional de bactérias diazotróficas e heterotrófica (Reis, 2014, Aguiar, 2012). Martinez-Balmori et al., 2013 avaliando a caracterização da composição química

da matéria orgânica durante a vermicompostagem de dois diferentes resíduos orgânicos observaram que em vermicomposto maduro a torta de filtro exibiu maior densidade natural de bactérias diazotróficas cultiváveis em comparação com esterco bovino, e quando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi introduzida nos dois tipos de vermicompostos maduros, os números populacionais foram maiores na torta de filtro. Esses autores encontraram uma aparente relação entre as características moleculares da matéria orgânica e a preservação de bactérias diazotróficas introduzidas no vermicomposto, o que considerou um passo para a compreensão da relação entre as características moleculares da matéria orgânica e as atividades microbianas. A presença de carbono lábil, ou seja, mais açúcares solúveis e alcoóis de cadeia longa devido ao elevado teor de sacarose na cana-de-açúcar, favoreceu a maior atividade da comunidade microbiana, refletindo assim na maior densidade populacional recuperada na torta de filtro (Martinez-Balmori et al., 2013).

De acordo com a tabela 3, durante a maturação do vermicomposto, a maioria dos fungos isolados cresceu a 25 °C, independente da época de maturação e do material vermicompostado. Nas temperaturas mais elevadas foram encontrados valores mais baixos. Dos isolados avaliados, 78% cresceram a 25 °C, 17% a 37 °C e 4% a 45 °C (Tabela 3). Esses números refletem claramente as condições mesófilas que prevaleceram durante a vermicompostagem (Anastasi et al., 2005). Na verdade, entre os microrganismos, as temperaturas mínimas e máximas de crescimento variam amplamente, refletindo a variação térmica e temperatura média de seus habitats (Alberts et al., 2002). Como a vermicompostagem é um processo não termófilo (Elvira et al., 1996), era de se esperar que a maioria dos microrganismos provenientes desse ambiente fosse mesófila e termotolerante com temperatura ótima na faixa de 15 °C e 40 °C (Galvagno e Forchiassin, 2010).

O aumento da temperatura foi drástico para o desenvolvimento dos fungos. Ao se afastarem da temperatura que favoreceu seu crescimento, o número de fungos recuperados foi reduzido. Diferentes espécies têm diferentes exigências e estão adaptadas para crescer dentro de uma determinada faixa de temperatura. O que foi observado quando houve uma elevação de 25° para 37°C na temperatura de incubação. A quantidade de isolados recuperados reduziu em todas as épocas de avaliação (Tabela 3).

Tabela 3. Número de morfotipos fúngicos isolados durante a vermicompostagem de esterco bovino e da torta de filtro durante a vermicompostagem nas três temperaturas (25, 37 e 45°C) em meio BDA.

Temperatura	Tempo de Vermicompostagem (dias)									
	Tempo Zero		30		60		90		120	
	EB	TF	EB	TF	EB	TF	EB	TF	EB	TF
25°C	10	6	14	20	34	8	43	19	28	4
37°C	5	2	4	2	10	2	7	6	6	1
45°C	3	2	2	-*	-**	-**	1	-*	2	-*

* Nenhum isolado cresceu nesta temperatura.

** Não foi realizado isolamento nesta época de avaliação.

Apenas 9 isolados recuperados foram adaptados para crescer nas três temperaturas. Geralmente essas espécies são mesófilas com características termotolerantes (Alberts et al., 2002), capazes de se adaptarem a uma determinada faixa de temperatura (Galvagno e Forchiassin, 2010). A presença de três isolados recuperados exclusivamente a 45 °C pode indicar que estes fungos são termófilos, já que não estavam presentes nas outras temperaturas de incubação. Fungos termofílicos são frequentemente encontrados em compostos desempenhando um papel vital no processo de compostagem (Gray et al., 1971). Quando a temperatura excede 65 °C, a comunidade mista é substituída por uma puramente bacteriana (Epstein, 1997). Sendo assim, esses microrganismos podem ser provavelmente provenientes da fase de pré-condicionamento termófilo, o que levou a sua sobrevivência e permanência nos estádios mais avançados da vermicompostagem (Anastasi et al., 2005). As diferenças fisiológicas entre esses grupos consistem principalmente na possibilidade de manter a integridade das membranas e das proteínas, tanto estruturais quanto funcionais. As enzimas e proteínas de microrganismos termófilos e termotolerantes apresentam termoestabilidade muito superior à dos mesófilos (Alberts et al., 2002).

4.3 Estudo comparativo de diferentes meios de cultivo no isolamento dos fungos durante a vermicompostagem

O meio BDA proporcionou a recuperação de um maior número de isolados (238) em todas as épocas de avaliação em ambos os vermicompostos estudados,

seguido pelos meios Sab (126), Man (117), AH (109), Asp (70), Cel (104) e MS(72) (Tabela 4).

O número de isolados recuperados a partir do BDA variou de 18 a 51, sendo que a menor recuperação ocorreu no tempo zero (18) e a maior aos 90 dias (51) de vermicompostagem no EB.

Tabela 4. Número de fungos isolados durante a vermicompostagem de esterco bovino (EB) e torta de filtro (TF) nos diferentes meios de cultivo (BDA, AH, MS, Cel, Sab e Asp) durante a vermicompostagem nas três temperaturas de incubação (25, 37 e 45°C).

Coleta	Meios de Cultivo						
	BDA	AH	MS	MAN	CEL	SAB	ASP
Tempo Zero							
EB	18	13	8	15	20	21	4
TF	11	9	6	14	15	15	1
30 dias							
EB	20	8	5	5	5	12	11
TF	22	3	12	4	7	12	7
60 dias							
EB	44	23	15	30	9	10	22
TF	10	9	9	9	5	4	13
90 dias							
EB	51	18	12	12	20	27	20
TF	25	9	6	8	7	10	8
120 dias							
EB	32	10	n*	15	15	12	12
TF	5	7	3	5	1	3	n*

*n: Não foi recuperado nenhum isolado.

O BDA tem sido considerado um meio universal para o isolamento e a manutenção, pois suporta o crescimento da maioria dos fungos (Zauza et al., 2007). Entretanto, o isolamento de *Ascomycetos* e *Zigomicetos* durante a vermicompostagem foi surpreendente. Talvez o BDA tenha a capacidade de selecionar fungos oportunistas de crescimento rápido, como os chamados “fungos de açúcar”, devido à sua preferência por fontes mais lábeis de carbono, tal como a dextrose presente neste meio. Isso ocorre provavelmente devido a grande quantidade de esporos que ultrapassam a quantidade de propágulos reprodutivos de basidiomicetos (Warcup, 1955) e fungos de crescimento lento (Moreira et al., 2010).

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade metabólica a fim de utilizar os substratos presentes no solo (Silva e Esposito, 2010). No entanto, pouco se sabe sobre as preferências nutricionais das espécies fora dos estudos de laboratório (Gans et al., 2005). Para tentar superar esta situação, foi utilizado o meio Meio Solo modificado (MS) que teve por finalidade fornecer a matéria orgânica na proporção real, encontrada durante a fase de maturação. E que são preferencialmente metabolizados por determinados grupos fisiológicos de fungos. Mas, ao contrário do esperado este meio não foi capaz de recuperar um grande número de isolados fúngicos. Foram recuperados 72 isolados (14, 17, 24, 18 e 17 isolados na primeira, segunda, terceira, quarta e quinta coleta, respectivamente) (Tabela 4). Um dos fatores que pode ter contribuído para este resultado é a cor do meio de cultura. O MS preparado a partir de material vermicompostado tem a coloração muito escura devido à matéria orgânica. Neste caso, o meio escurecia as hifas dificultando a observação direta e distinção dos fungos filamentosos através da lupa.

Foi possível recuperar 109 isolados do meio AH ao longo do processo de maturação com números variando de 3 a 23 (Tabela 4). De fato, os fungos são os mais eficientes na despolimerização, degradação e mineralização de todos os componentes das paredes celulares da planta (Leonowicz et al., 1999), principalmente os fungos da podridão branca. As enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase e a reação de felton são considerados como sendo os principais mecanismos que conduzem à degradação do AH (Grinhut et al., 2011). Alguns ascomicetos também têm sido associados à degradação de AH (Grinhut et al., 2011), entre eles *Aspergillus awamori*, *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus* spp. (Mishra e Srivastava, 1986). Todos estes fungos tiveram a sua capacidade de degradar AH aumentada na ausência ou em baixas concentrações de N. No entanto, utilizamos o meio Czapek-dox com alteração da fonte de carbono de acordo com o grupo funcional de interesse. Neste meio foi utilizado o nitrato de amônio como fonte de N e já se sabe que esta fonte de N inibe a capacidade de alguns fungos degradar AH (Mishra e Srivastava, 1986). Seria razoável, portanto, realizar novos testes para confirmar a capacidade dos isolados em utilizar AH como fonte de carbono, mas, desta vez, com diferentes concentrações de N já que a limitação de N favoreceu o *Trametes* sp. M23 (basidiomiceto) e na ausência dessa limitação os AH não foram degradados (Grinhut et al., 2011).

Entre os fungos, a habilidade da decomposição da celulose é relativamente comum, especialmente entre os ascomicetos e basidiomicetos saprófitos (Hiscox et al., 2015; Baldrian, 2006). Entretanto, pela metodologia utilizada, somente uma fração da população total de fungos celulolíticos pode ser identificada. Apenas 104 isolados foram capazes de utilizar a celulose como fonte de carbono ao longo do processo de vermicompostagem. Surpreendentemente, o maior número de fungos foi recuperado no tempo zero. Normalmente, o que tem se observado é o aumento da atividade desses organismos celulolíticos na presença da minhoca (Aira et al. 2006).

O manitol é um dos carboidratos solúveis mais abundantes dentre os fungos filamentosos (Jennings, 1984) e está envolvido em várias funções tais como a tolerância ao estresse, regulação do pH citoplasmático e dispersão de esporos. Um total de 117 fungos foi recuperado a partir deste meio. Sendo que aos 30 dias de vermicompostagem houve uma redução no número de isolados recuperados (Tabela 6). Esse comportamento aos 30 dias foi inesperado, pois após a introdução das minhocas espera-se recuperar um maior número de isolados, devido à ação favorável do intestino das minhocas e à fragmentação do material vermicompostado (Pramanik et al., 2011). Aos 60 dias de vermicompostagem, no entanto, houve um aumento seguido por uma redução (20 isolados) aos 120 dias.

Foi recuperado um total de 70 isolados no meio Asp (Tabela 6). Geralmente, esses fungos são capazes de utilizar aminoácidos, aminas e amidas como fonte de carbono e nitrogênio (Galvagno e Forchiassin, 2010). A enzima responsável pela reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina resultando em ácido aspártico e amônia é a L-asparaginase (L-asparagina amino hidrolase) (Verma et al., 2007). Foi observado que leveduras e fungos filamentosos são fontes potenciais para a produção desta enzima (Sarquis et al., 2004; Baskar e Renganathan, 2011). Estes fungos são de grande interesse para indústria farmacêutica e alimentícia, uma vez que vêm sendo alvo de prospecção pela produção desta enzima.

O Sab foi o segundo meio capaz de fornecer mais isolados (126). Isso ocorreu, provavelmente, devido às altas concentrações de compostos nitrogenados provenientes da digestão péptica de tecido animal e a digestão de caseína presentes no meio (Himedia, 2011), além da alta concentração de

dextrose (Das et al., 2010). Outro fator que pode ter contribuído para este número elevado é a produção de pigmento pelos fungos, que pode auxiliar na identificação, aumentando a distinção de características entre os isolados (Murray et al., 2003). Esse meio de cultura tem sido o preferido para o isolamento de fungos de interesse médico, por ser mais favorável para o isolamento dos fungos do que as bactérias devido principalmente ao baixo valor de pH (Murray et al., 2003).

Neste trabalho não foi possível estabelecer um padrão de comportamento e indicar o melhor meio para o isolamento de fungos. O meio BDA, privilegiou a seleção de fungos mitospóricos em detrimento dos fungos de crescimento lento. O objetivo do trabalho talvez fosse atingido se fosse realizado primeiro uma seleção de meios para cada fase de maturação. Outro fator importante também a ser considerado é que a maioria dos isolados foi composta de *singletons*, ou seja, organismos de ocorrência única. Sendo assim, o emprego dos meios Sab, Man, AH, Asp, Cel e MS permitiu o isolamento desses fungos que de outro modo teriam sido perdidos.

4.4 Caracterização Fenotípica

4.4.1 Solubilização de Óxido de Zinco (ZnO)

A zona mais clara, na região de crescimento das colônias correspondente ao halo indicador de solubilização ($IS \geq 1,0$) foi observada em 87 % dos isolados estudados. Destes, 28 apresentaram IS entre 1,5-1,9, enquanto 29 exibiram $IS \geq 2,0$ (Tabela 5). O vermicomposto produzido a partir de esterco bovino proporcionou consideravelmente mais isolados com capacidade de solubilização do que o da torta de filtro em todas as épocas de avaliação (Tabela 5, 11, 12, 13, 14 e 15).

Tabela 5. Índice de solubilização de zinco dos fungos isolados de esterco bovino e torta de filtro nos diferentes estádios de maturação.

		Índice Solubilização Zinco			Total
		$1,0 \leq IS < 1,5$	$1,5 \leq IS < 2$	$IS \geq 2,0$	
Tempo Zero					
	EB	9(4) *	3(2) *	4(3) *	16(9) *
	TF	4	3	3	10
30					
	EB	17(4) *	2	3(2) *	22(6) *
	TF	8	1	-	9
60					
	EB	19	7(1) *	7	33(1) *
	TF	4	1	1	6
90					
	EB	32(9) *	7(1) *	4(1) *	43(11) *
	TF	14	3	1	18
120					
	EB	11(1) *	6	11	28(1) *
	TF	2	1	2	5

- Ausência de isolados capazes de produzir índice de solubilização.

* Número de Isolados presentes nos dois vermicompostos.

O tempo zero de vermicompostagem apresentou o menor número de isolados (16) com capacidade de solubilização de zinco ($IS \geq 1,0$), sendo que apenas 4 destes isolados exibiram índice de solubilização $\geq 2,0$ (Tabela 5). Em todas as avaliações, os isolados com IS compreendidos entre 1-1,4 foram superiores ao número de isolados que apresentaram $IS \geq 1,5$. Por exemplo, aos 90 dias de vermicompostagem, dos 50 isolados que proporcionaram $IS \geq 1,0$ apenas 4 isolados exibiram $IS \geq 2,0$, enquanto 9 demonstraram $IS \geq 1,5$.

Um total de 59 isolados foram capazes de alterar o meio de cultivo levando a solubilização do ZnO ($IS=1,0$). No entanto, não foi observada zona clara em torno da colônia. Provavelmente, este nutriente pode ter sido dissolvido e acumulado na biomassa microbiana (Fomina et al., 2005), pois alguns processos microbianos são capazes de solubilizar os minerais, enquanto outros imobilizam e reduzem a sua disponibilidade no ambiente (Silva e Esposito, 2010). Além disso, foi possível observar uma mudança no desenvolvimento micelial quando os isolados cresceram na presença do ZnO. A agregação do micélio resultante do crescimento muito denso da hifa é uma estratégia que tem sido associada à função de proteção do fungo contra a toxicidade dos metais (Fomina et al., 2003),

pois apesar do Zn ser essencial para o crescimento e a nutrição do fungo é também tóxico em concentrações mais elevadas (Martino et al., 2003).

Aparentemente 7 isolados não apresentaram crescimento. Provavelmente, a ausência de crescimento pode estar relacionada ao fato de que estes isolados não apresentaram atividade solubilizadora. Além disso, a glicose talvez não seja a fonte de carbono ideal para expressão desta característica, já que a eficiência de solubilização varia com a fonte de carbono fornecida (Saravanan et al., 2007).

O número de isolados com capacidade de solubilização aumentou com o avanço da vermicompostagem. Aos 90 dias foi possível observar o maior número de isolados, sendo que 50 isolados apresentaram habilidade de disponibilizar o Zn. Os isolados 98 (30 dias) e 637 (120 dias) apresentaram os maiores índices (4,6 e 3,7, respectivamente) e demonstraram ser mais promissores na solubilização de zinco (Tabela 12 e 15).

Os fungos liberam concentrações substanciais de ácidos orgânicos durante o crescimento que pode refletir em estratégias para manter o equilíbrio nutricional em solos pobres ou ricos em nutrientes essenciais (Martino et al., 2003). Esses ácidos fornecem tanto fonte de prótons para a solubilização quanto ânion para complexação de cátions metálicos (Devevre et al., 1996). Alguns trabalhos, no entanto, têm demonstrado que a sua produção varia em função da fonte do mineral utilizada. Fomina et al. (2003) identificaram três ácidos orgânicos (fumarato, citrato e malato) em meio de cultura na presença de óxido de zinco. Enquanto na ausência do zinco apenas uma pequena quantidade de ácido fumárico foi detectada (Martino et al., 2003). Isso indica que a produção desses ácidos é fundamental para a solubilização deste mineral.

Os fungos são essenciais na solubilização de nutrientes que se encontram indisponíveis nos solos (Gadd et al., 1993). Logo, vermicompostos que apresentam uma grande diversidade de fungos com capacidade de produzir e exsudar ácidos orgânicos e prótons podem servir de fonte para desenvolvimento de processos microbiológicos direcionados à agricultura sustentável e economicamente viável.

4.4.2 Solubilização de Fosfato Tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

O crescimento e a atividade de fungos solubilizadores de fosfato de tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) foram avaliados em meio sólido Pikovskaya pela presença

de um halo transparente ao redor da colônia. Os isolados foram classificados quanto a habilidade de solubilização em baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS \leq 4$) e alta capacidade de solubilização ($IS > 4$) (Berraquero et al., 1976). Na triagem dos 170 isolados estudados, 125 foram classificados como baixo, o que representa 73 % dos fungos avaliados (Tabela 6). Trinta e quatro isolados atingiram média capacidade e apenas 2 apresentaram alta capacidade para solubilizar fosfato ($IS \geq 4$).

Tabela 6. Índice de solubilização de fosfato dos fungos isolados de esterco bovino e torta de filtro nos diferentes estádios de maturação.

	Índice solubilização			Total
	IS < 2	$2 \leq IS \leq 4$	IS > 4	
Tempo Zero				
EB	8(4)*	7(5)*	–	15(9)*
TF	5	5	–	10
30				
EB	17(5)*	7	–	24(5)*
TF	7	1	1	9
60				
EB	22(1)*	9	1	32(1)*
TF	3	3	–	6
90				
EB	38(10)*	5(1)*	–	43(11)*
TF	17	1	–	18
120				
EB	25(1)*	1	–	26(1)*
TF	4	1	–	5

- Ausência de isolados capazes de produzir índice de solubilização.

* Número de Isolados presentes nos dois vermicompostos.

O maior índice foi alcançado pelos isolados 131 e 292, provenientes da segunda e terceira avaliações (30 e 60 dias, respectivamente), sendo que ambos atingiram $IS = 4,1$. Apenas a segunda (30 dias) e terceira (60 dias) avaliação estavam presentes nas três classes de resposta. A quarta avaliação (90 dias de vermicompostagem) proporcionou um maior número de isolados com capacidade de solubilizar fosfato, sendo os mesmos enquadrados em duas classes de resposta caracterizadas como baixa e média (Tabela 6).

Assim como na avaliação dos fungos solubilizadores de zinco, o tempo zero apresentou menor número de isolados (15 isolados) com competência para

solubilizar fosfato. Destes, 9 exibiram baixa capacidade e 7 isolados média capacidade de solubilização.

No solo o fosfato existe principalmente em forma insolúvel, tais como fosfato tricálcico, encontrado em solos alcalinos e fosfatos de ferro (FePO_4) e de alumínio (AlPO_4) em solos ácidos (Rawat e Tewari, 2011). Para os compostos, FePO_4 e AlPO_4 ou estruturas mais complexas, como os fosfatos naturais de rocha, a produção de ácidos orgânicos é provavelmente o principal mecanismo de solubilização (Mendes et al., 2014). Para o fosfato tricálcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ utilizado nesse trabalho a acidificação do meio, resultante da atividade metabólica é o mecanismo mais importante para solubilização eficaz desta fonte (Whitelaw et al., 1999).

Com base nos resultados (Tabela 6, 11, 12, 13, 14 e 15), 94 isolados apresentaram índice de solubilização compreendido entre 1-1,5, indicando bom crescimento micelial. No entanto, a ausência da formação da zona de solubilização em torno da hifa em placa de petri poderia indicar que estes isolados estariam mobilizando quantidade significativa de fosfato em meio líquido (Fankem et al., 2006). Isto sugere que a formação da zona de halo como critérios não é suficiente para a prospecção e seleção qualitativa de microrganismos solubilizadores (Fankem et al., 2006). Embora este meio tenha desempenhado um papel importante na triagem de microrganismos solubilizadores, novos estudos devem ser realizados, mas desta vez utilizando fontes mais complexas de fosfato, além da confirmação quantitativa desses isolados em meio líquido.

O fosfato aplicado via adubação é rapidamente convertido em formas insolúveis, devido à sua fixação irreversível nas partículas do solo (Brady e Weil, 2013). Logo, os fungos desempenhariam um importante papel na recuperação desses fosfatos pela liberação de ácidos orgânicos e prótons. Esses microrganismos são reconhecidos como um possível meio para superar alguns dos desafios no manejo da adubação fosfatada (Mendes et al., 2014). Principalmente se for considerado que os fertilizantes fosfatos são obtidos especialmente a partir da reação entre rochas fosfatadas e ácidos fortes em um processo que envolve altos custos e danos ambientais (Vassilev et al. 2006).

4.4.3 Atividade celulolítica

Apenas 19 isolados apresentaram índices enzimáticos (IE) superiores a 1,5, o que representa 11 % dos fungos isolados (Tabela 7). Os maiores IEs foram alcançados pelos isolados 415, 292 e 216 atingindo valores de 5,6, 4,4 e 3,5, respectivamente. Embora, a capacidade celulolítica seja comum a vários fungos e estes governem a decomposição da celulose (de Boer et al., 2005), poucos isolados apresentaram $IE > 1,5$. Provavelmente, o índice enzimático não foi um parâmetro adequado para avaliar a capacidade de degradar celulose (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004). Em um trabalho avaliando a atividade celulolítica de actinomicetos, Nurkanto (2009) observou que os maiores índices enzimáticos em placa não foram capazes de apresentar maior atividade enzimática em meio líquido. No entanto, alguns autores têm considerado sua medida simples e rápida para selecionar microrganismos com potencial para a produção de enzimas celulolíticas (Yoon et al., 2007). Contudo, conforme proposto por (Khohat et al., 2012), se considerar que o $IE \geq 1$ estimula o crescimento do fungo, 110 isolados (64 %) foram capazes de utilizar a CMC como fonte única de carbono, mas não produziram IE superior a 1,5 (Tabela 7).

Tabela 7. Índices enzimáticos dos fungos isolados de esterco bovino e torta de filtro nos diferentes estádios de maturação.

		Índice Enzimático			Total
		$1,0 \leq IE < 1,5$	$1,5 \leq IE < 2$	$IE \geq 2$	
Tempo Zero	EB	3(3)*	1	–	4(3)*
	TF	4	–	–	4
30	EB	14(4)*	4(1)*	1	19(5)*
	TF	9	1	–	10
60	EB	24(1)*	2	2	28(1)*
	TF	5	–	–	5
90	EB	28(9)*	6	2(1)*	36(10)*
	TF	11	1	1	13
120	EB	25(1)*	–	–	25(1)*
	TF	5	–	–	5

- Ausência de isolados capazes de produzir índice de solubilização.

* Número de Isolados presentes nos dois vermicompostos.

O EB (112 isolados) apresentou maior número de isolados com capacidade hidrolítica ($IE \geq 1$) em comparação com a torta de filtro (37 isolados). Destes, os menores valores foram recuperados no início da vermicompostagem e os maiores valores no final da vermicompostagem. No tempo zero, apenas 8 isolados (4 de EB e 4 de TF) foram capazes de degradar a celulose. O maior número de isolados com capacidade hidrolítica foi alcançado aos 90 dias de vermicompostagem (28 EB e 11 TF). Esse aumento na recuperação de isolados com o avanço da vermicompostagem tem sido associado à mineralização do substrato.

A redução do teor de carbono orgânico em função da decomposição, observada nos primeiros 30-40 dias de vermicompostagem, foi relacionada ao aumento acentuado da população fúngica, especialmente celulolítica (Pramanik et al., 2011a). O crescimento desses fungos ativado na presença de minhocas estimula a decomposição da celulose durante a vermicompostagem, sendo possível o isolamento desses microrganismos com capacidade celulolítica (Aira et al. 2006).

A triagem de fungos com capacidade hidrolítica ofereceu a possibilidade de selecionar 149 isolados com habilidade de decompor a celulose. O menor número de isolados no tempo zero de vermicompostagem com aptidão para solubilizar fosfato e zinco, além de produzir enzimas hidrolíticas capazes de quebrar a celulose demonstra a importância do processo de vermicompostagem para aumentar a diversidade microbiana. Apesar disso, diversos trabalhos têm realizado o isolamento dos micróbios benéficos apenas no final da vermicompostagem. No entanto, mesmo no final da maturação da vermicompostagem podem existir populações de microrganismos benéficos à planta que não são detectáveis pelos métodos tradicionais de isolamento e cultivo (Aguiar, 2012). Neste sentido de acordo com os resultados apresentados, a quarta avaliação (90 dias) seria a época ideal para proporcionar melhores condições para acomodar uma comunidade microbiana polifuncional. Nesta avaliação, dos isolados analisados, apenas 10 não foram capazes de solubilizar zinco, fosfato e decompor a celulose. Assim, ter um vermicomposto com a capacidade de abrigar microrganismos multifuncionais é altamente desejável não apenas para prospectar microrganismos para construção de inoculantes, mas também para promover o crescimento e desenvolvimento vegetal (Srivastava et

al., 2011). A promoção do crescimento vegetal pelos fungos através de diferentes mecanismos pode melhorar significativamente a saúde e o crescimento vegetal.

4.5 Interação entre isolados de *Trichoderma* e bactérias diazotróficas (IFB)

Para avaliar a interação fungo-bactéria foram selecionados dois isolados de *Trichoderma* spp. identificados em nível de gênero com base nas suas características morfológicas (Figura 5) e três bactérias diazotróficas provenientes da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (UENF).

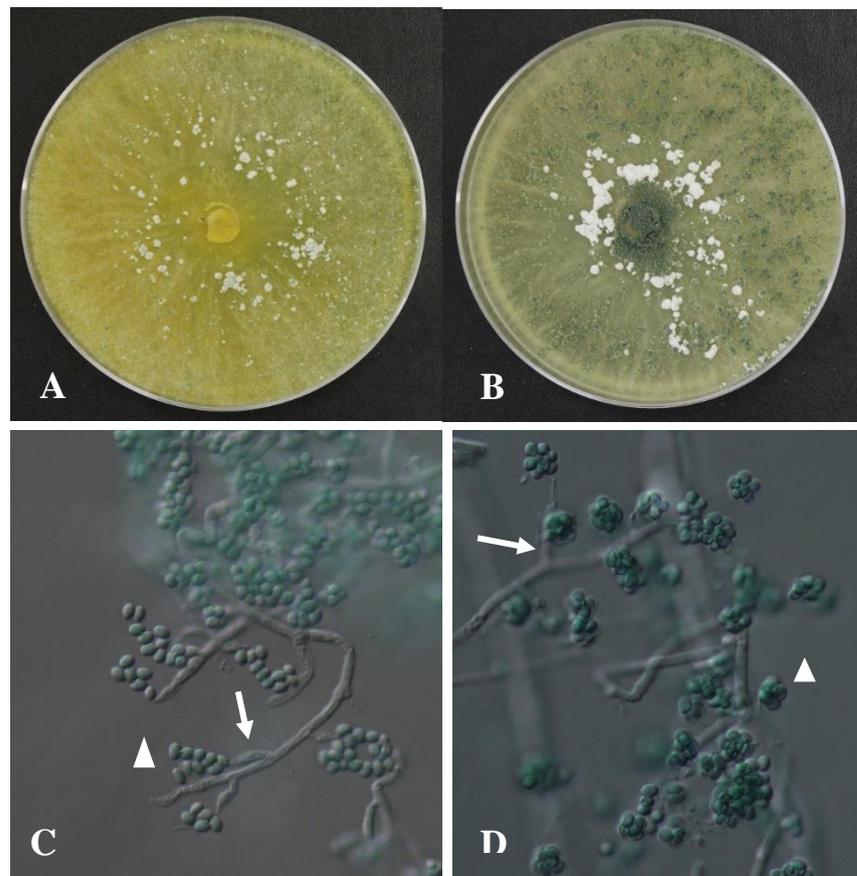


Figura 5. Isolados dos fungos *Trichoderma* spp. obtidos a partir da vermicompostagem de esterco bovino com 90 dias de maturação. (A e B) Colônias em meio de cultura BDA crescidas a 25°C por 5 dias. (A) Isolado 467 e (B) 476. Características microscópicas da esporulação da microcultura com distinção na formação de conídios (triângulo) e conidióforos (seta) dos isolados (C) 467 e (D) 476.

4.5.1 Ensaio de Compatibilidade *in vitro* entre isolados de *Trichoderma* e bactérias diazotróficas

Os testes de compatibilidade *in vitro* entre os isolados do fungo *Trichoderma* 467 e 476 e as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 e *H. seropedicae* HRC 54 demonstraram que nenhum dos metabólitos produzidos por estas bactérias foram capazes de prejudicar o crescimento dos dois isolados de *Trichoderma*. Já *Burkholderia phytatum* STM 815 exerceu atividade antagonística contra os isolados testados (Tabela 8, Figura 6). A inibição da *Burkholderia phytatum* sobre a *Trichoderma* foi considerada moderada pela ausência da região típica de inibição. Talvez a utilização de meios de cultivo mais pobres possibilite a visualização característica desta interação, que se expressa como uma zona clara em torno da colônia, uma vez que os resultados de compatibilidade geralmente variam em função do meio utilizado. As combinações compatíveis em um meio rico nem sempre são compatíveis em um meio pobre (Georgakopoulos et al., 2002). Isso ocorre provavelmente porque uma das motivações para produção de metabólito secundário pelos microrganismos é a competição por nutrientes.

Uma observação interessante na relação antagonística entre os isolados 467 e 476 e a *Burkholderia* foi uma provável resistência adquirida pelo fungo. Durante o teste de compatibilidade foi possível visualizar a formação de uma linha de hifas esporuladas emparelhadas bem próximas da colônia da bactéria, mas sem contato direto. Após dois dias dessa formação, o fungo avançou no crescimento, indo em direção à colônia e realizando o contato. Um provável motivo para este avanço subsequente seria a resistência já reconhecida do gênero *Trichoderma* a muitos compostos tóxicos, o que provavelmente permite sua recuperação e contínua exploração do meio em que se encontra após a adição de doses subletais de alguns compostos tóxicos (Benítez et al., 2004).

Tabela 8. Compatibilidade *in vitro* entre os isolados do fungo de *Trichoderma* 467 e 476 e as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* RAM10, *H. seropedicae* HRC 54 e *Burkholderia phytatumum*

Isolados do fungo	Bactéria		
	<i>H. seropedicae</i> RAM10	<i>H. seropedicae</i> HRC54	<i>B. phytatumum</i> STM815
<i>Trichoderma</i> 467	C	C	I
<i>Trichoderma</i> 476	C	C	I

C = Compatível; I = Incompatível.

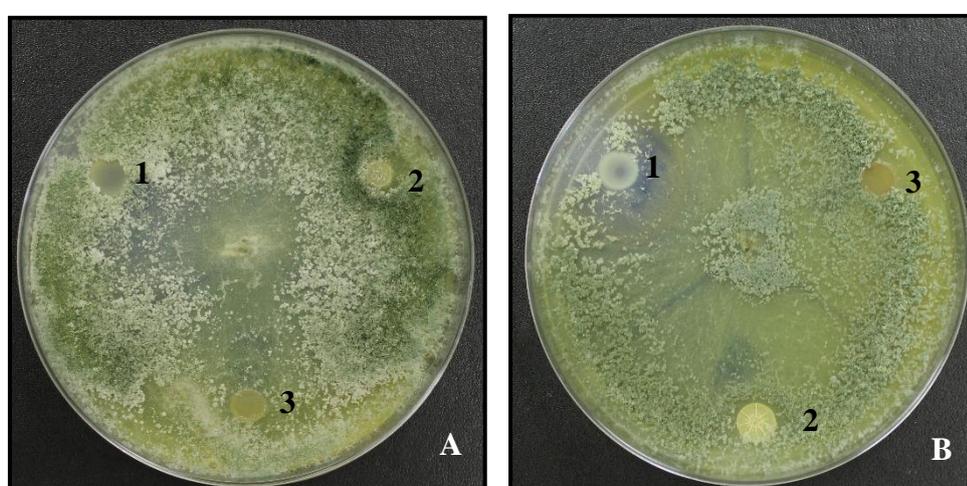


Figura 6. Teste de compatibilidade *in vitro* entre isolados de *Trichoderma* sp. com bactérias promotoras do crescimento vegetal. (A) *Trichoderma* 476 e (B) *Trichoderma* 467. (1) *Herbaspirillum seropedicae* RAM10; (2) *Burkholderia phytatumum*; (3) *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54.

Um dos princípios básicos para o sucesso da tecnologia de construção de inoculantes mistos é a avaliação da compatibilidade entre os microrganismos envolvidos, uma vez que o contato entre eles pode resultar em interações antagônica, sinérgica ou neutra. A atividade antagonista de bactérias pode se expressar pela produção de enzimas líticas (Rezzonico et al. 2007) e metabólitos secundários, tais como sideróforos (Botelho et al., 2006), antibióticos ou antifúngicos (Hu e Young, 1998). Entre as interações negativas, a categoria mais conhecida e mais estudada da comunicação bactéria-fungo é antibiose, uma guerra química que é tipificada pela difusão de moléculas prejudiciais de um parceiro para o outro (Frey-Klett et al., 2011).

Sendo assim, os resultados indicam a capacidade da *bactéria H. seropedicae* estirpes HRC54 e RAM10 de interagir de forma positiva ou neutra com os isolados de *Trichoderma*. Estas bactérias foram selecionadas para os experimentos posteriores, com o objetivo de avaliar uma possível interação positiva entre o fungo e a bactéria. No entanto, apesar da *bactéria H. seropedicae* estirpe HRC54 apresentar compatibilidade, apenas a *H. seropedicae* estirpe RAM10 foi selecionada por ser marcada com GFP.

4.5.2 Análise de viabilidade celular

O crescimento da estirpe de *H. seropedicae* RAM10 não foi afetado pelo isolado fúngico 467. Células da estirpe RAM10 emitindo forte sinal de fluorescência foram encontradas associadas às hifas, formando biofilmes ou em colônias próximas às hifas (Figura 7).

A emissão de alta fluorescência pode ser o indicativo de metabolismo ativo e alta taxa de crescimento. Assim, a estirpe RAM10 que interagiu com as hifas de *Trichoderma* manteve a integridade celular, possivelmente pela presença de algum mecanismo de adaptação para suportar possíveis interações negativas. A expressão de novos genes modulados nas células do biofilme é, em parte, a grande responsável desta possível adaptação (Peter et al., 2010).

Estes resultados permitem concluir que a co-inoculação não foi prejudicial à integridade da membrana celular da *Trichoderma* e da bactéria *H. seropedicae* estirpe RAM10. Embora muitas interações envolvendo fungos e bactérias resultem na morte do fungo e/ou da bactéria (Peter et al., 2010) as interações aqui observadas parecem não causar morte celular em nenhum dos organismos envolvidos.

Apesar dos dois isolados pertencerem ao gênero *Trichoderma*, espécies distintas dentro do mesmo gênero podem apresentar variabilidade fenotípica quanto à capacidade de sobreviver a estresses bióticos e abióticos (Galvagno e Forchiassin, 2010). Durante a interação dos isolados fúngicos com a bactéria *H. seropedicae* estirpe RAM10 foi possível verificar que esta bactéria parece ser capaz de afetar a integridade da membrana do isolado 476, pois este apresentou hifas com coloração vermelha indicativo de morte celular (Figura 6). No entanto, esta estirpe não foi capaz de afetar a viabilidade das células do isolado 467,

sugerindo que este isolado possui algum mecanismo de resistência não observado no isolado 476.

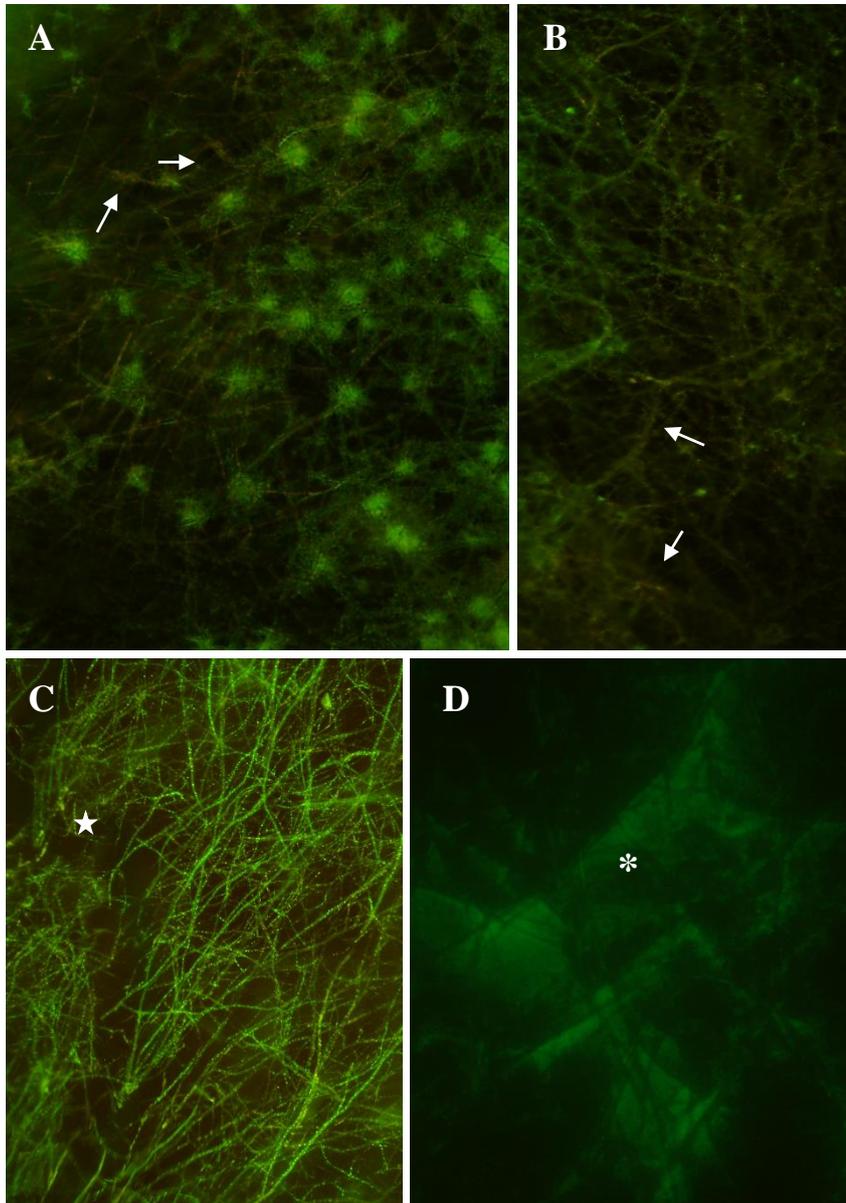


Figura 7. Viabilidade celular de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 coexistindo com os isolados (A, B) 476 e (C, D) 467, Utilizando o LIVE/DEAD® BacLigth™ Bacterial Viability Kit, 24 horas após a inoculação da bactéria. (A,B) coloração vermelha indicativo de inviabilidade celular (seta). (C,D) Viabilidade das hifas do isolado 467 de *Trichoderma* (estrela) e das células da *H. seropedicae* estirpe RAM10 na hifosfera (asterístico).

Outro provável motivo pelo qual possa ter aparecido a coloração avermelhada nas zonas de interação entre o isolado fúngico 476 e a bactéria *H. seropedicae* estirpe RAM10 é o meio de cultivo utilizado no segundo

compartimento (Phytigel 0,4%). Este ambiente é ausente de carbono e nutriente, o que pode ter dificultado o crescimento do fungo e provocado sua morte. Por apresentar um crescimento micelial muito superior ao do isolado 467, o isolado 476 poderia estar entrando na fase estacionária antes do isolado 467, quando as condições do meio deixam de ser ótimas, por esgotamento de substrato. Já a presença de hifas de cor verde, mais presentes no isolado 476, indica a viabilidade celular.

4.5.3 Avaliação da capacidade da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 de obter nutriente diretamente da hifa

Para avaliar a capacidade da *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 obter nutrientes diretamente da hifa do fungo, foi realizado um experimento em placas compartimentadas. A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 cresceu (Figura 8) na ausência do fungo. Talvez traços do meio de cultivo utilizado tenham estimulado o crescimento da bactéria, já que foi realizada apenas uma lavagem das células bacterianas. No entanto, houve uma perda significativa na densidade celular em função da ausência do fungo na ordem de 3 unidades logarítmicas quando comparada às bactérias que cresceram na presença dos isolados 467 e 476 (Figura 8). Compostos orgânicos tais como a trealose, polióis ou ácidos orgânicos abundantes no exsudado fúngico (Boer et al., 2005) têm sido indicados como principal fator de estímulo da bactéria associada ao fungo. Em *Bradyrhizobium*, por exemplo, um aumento considerável na população bacteriana foi observado (cerca de 10^8 /mL) quando tratadas com exsudados fúngicos (Seneviratne, 2003). O mesmo aconteceu nos compostos sintetizados pelo fungo *Paxillus involutus* capaz de estimular o crescimento das bactérias *Sphingomonas paucimobilis*, *Ralstonia picketti* e *Sphingomonas* sp. (Hryniewicz, et al., 2010).

No entanto, o que tem sido observado é uma especificidade neste tipo de interação. A seleção tem se mostrado fortemente relacionada com a capacidade da bactéria em utilizar fontes específicas de carbono exsudado pelas hifas como observado em basidiomicetos (Warmink et al., 2009). Hooker et al., (2007) verificaram que a liberação de açúcares totais e da maioria dos monossacarídeos foram elevadas na hifosfera de *Glomus* E3, mas não em *Glomus tenue* sugerindo que o nível de açúcares liberados por diferentes espécies fúngicas provavelmente seja diferente.

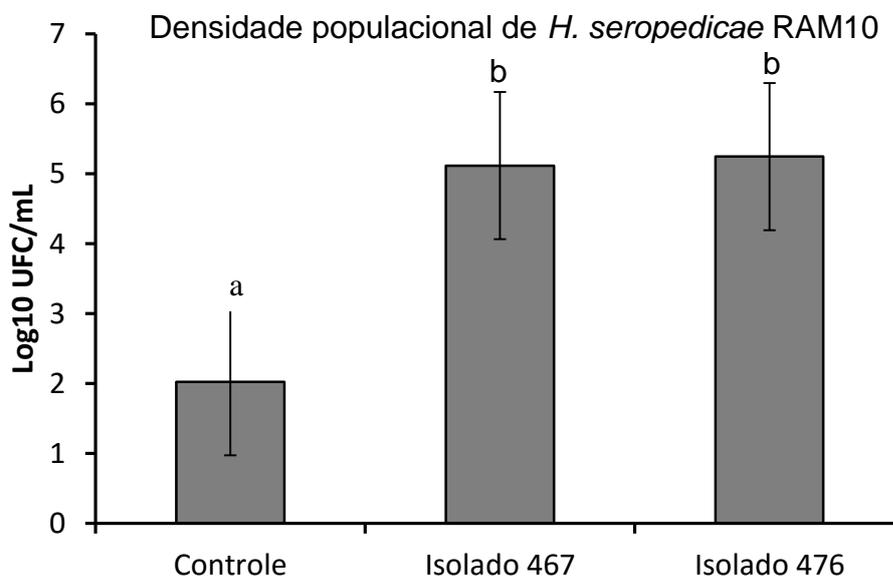


Figura 8. Densidade populacional de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 em co-cultivo com os isolados 467 e 476 de *Trichoderma* spp em placas compartimentadas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey em 5% (n=3, barras correspondem ao desvio padrão).

Embora exista uma especificidade neste tipo de interação, padrões semelhantes de estabelecimento e crescimento foram observados nesse trabalho. A contagem dentro da área escolhida (lamínula) confirmou as observações feitas por microscopia. Não houve diferença significativa durante a coexistência da bactéria com os isolados 467 e 476 (Figura 8), apesar desses fungos aparentemente pertencerem a espécies distintas. Pela série de imagens obtidas foi possível constatar que a bactéria *H. seropedicae* estirpe RAM10 se distribui na vizinhança da hifa, formando colônias (Figura 9). Além de ser observada a ampla colonização nas proximidades das hifas, as bactérias apresentavam-se ligadas à hifa fúngica formando biofilme ao longo da mesma. A fixação dos microrganismos nas superfícies bióticas ou abióticas para formar biofilme é uma característica do crescimento microbiano na natureza (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2005). Essa associação torna a bactéria consideravelmente diferente na fisiologia e no modo de ação em comparação com suas células individuais (Seneviratne et al., 2008). A possibilidade da *H. seropedicae* estirpe RAM10 aderir a superfícies ricas em nutrientes, como é o caso da hifa fúngica, permite que ela permaneça em um nicho mais favorável. Neste ambiente os nutrientes são mais abundantes e

constantemente repostos levando a um aumento na densidade das bactérias. Esse fato foi observado nesse trabalho. Além disso, as bactérias quando associadas formando biofilme apresentam diferenças fisiológicas distintas, tais como a resistência a antibióticos, ao stress do meio, bem como a uma expressão alterada em genes de virulência (Harriott e Noverr, 2010).

Outro importante papel conferido ao biofilme é a sobrevivência da bactéria no solo na ausência da planta. No caso específico do rizóbio (bactéria que interage em simbiose com leguminosas), ainda não está claro como essa bactéria sobrevive sob tais condições, já que não formam esporos de resistência (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2005).

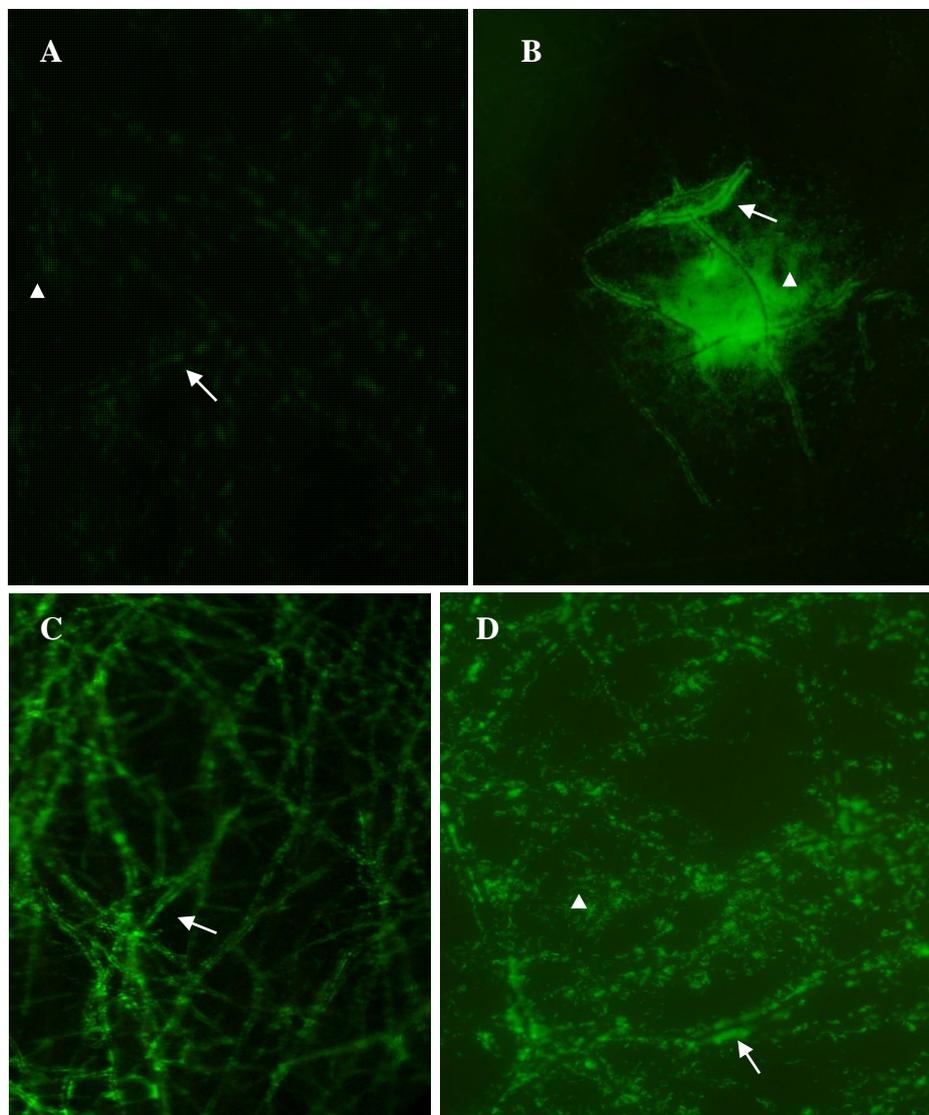


Figura 9. *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 formando biofilme e colonizando a hifosfera dos isolados (A, B) *Trichoderma* 476 e (C, D) *Trichoderma* 467 durante a co-incubação em placa bicompartimentada. (A, B, C, D) *H. seropedicae* formando biofilme (seta) e (A, B, D) na hifosfera (triângulo).

A formação do biofilme com fungos comuns do solo tem se tornado uma estratégia plausível para justificar a sua sobrevivência (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2003). Estes biofilmes podem então ser usados para introduzir com sucesso a bactéria no solo, devido à proteção contra condições ambientais adversas e competição por populações nativas do solo (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2005). Assim, o uso do biofilme se torna uma alternativa extremamente atraente, principalmente se considerar o emprego de um fungo antagonista, como é o caso do *Trichoderma* obtido e utilizado em nosso trabalho.

A elevada capacidade de reprodução, sobrevivência às condições desfavoráveis, a eficiência na utilização de nutrientes, agressividade forte contra fungos fitopatogênicos e a eficiência na promoção do crescimento vegetal (Benítez et al., 2004) são alguns dos benefícios conferidos ao gênero *Trichoderma*. Então, por meio da fixação, as bactérias não só se posicionam sobre a superfície fúngica, como também obtêm os benefícios da versatilidade fenotípica de seu vizinho (Davey e O'toole, 2000). Sendo então, possível a sua sobrevivência mesmo em condições competitivas extremas, uma vez que estarão associadas ao fungo *Trichoderma* que é adaptado para sobreviver nessas condições.

4.5.4 Interação e sobrevivência da *H. seropedicae* RAM10 em co-cultivo com isolados de *Trichoderma*

A co-inoculação da bactéria *H. seropedicae* RAM 10 com os isolados de *Trichoderma* 467 e 476, afetou fortemente a densidade populacional da bactéria *H. seropedicae* RAM10 nos dois tratamentos. Na ausência do fungo, a bactéria foi incapaz de crescer quando o substrato utilizado foi o bagaço de cana. Entre os isolados 467 e 476 não houve diferença significativa no crescimento da bactéria nos dois substratos utilizados (Tabela 9). O estímulo do crescimento da bactéria *H. seropedicae* estirpe RAM10 na presença do fungo, sugere que os isolados 467 e 476 estão disponibilizando nichos seletivos e/ou nutrientes com recursos que as bactérias sozinhas não seriam capazes de adquirir pelo ataque do substrato bagaço de cana, através do seu sistema enzimático (Romani et al., 2006). Confirmando este tipo já reconhecido de interação facilitadora.

Tabela 9. Densidade populacional da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 (UFC/mL) em co-cultivo com os isolados do fungo *Trichoderma* aos 10 dias após a inoculação no substrato.

	Controle	Isolado 467	Isolado 476
Bagaço de cana	0 aC	6,4 x 10 ⁴ bA	1,8 x 10 ⁴ bB
Solo	3,3 X10 ³ aB	8,9 x 10 ⁴ aA	9,6 x 10 ⁴ aA

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, em 5%.

De fato, os microrganismos do solo são conhecidos pela diferença na capacidade de utilizar diferentes compostos orgânicos. Os fungos geralmente estão associados à decomposição da lignina e celulose, embora a celulose possa também ser degradada pelas bactérias (Boer et al., 2005). Em alguns casos, as bactérias contribuem para a degradação da lignina (particularmente os actinomicetos) (Benner et al., 1984) ou utilizam produtos intermediários liberados pelos fungos através da sua atividade metabólica (Ruttimann et al., 1991). Essa preferência das bactérias por compostos prontamente disponíveis, devido à sua baixa atividade hidrolítica (Sala e Gude, 2004), as tornam dependentes do carbono liberado na rizosfera. Portanto, na ausência da planta no campo ou no solo não rizosférico, a zona de influência da hifa (hifosfera) pode passar a ter o mesmo papel da rizosfera para essas bactérias. Esse ambiente pode se tornar o "hotspot" das interações microbianas (Baschien et al., 2009), devido principalmente à liberação de compostos através da atividade das exoenzimas dos fungos ou do carbono orgânico liberado através das hifas fúngicas.

O *Trichoderma* não afetou negativamente a bactéria RAM10 promovendo seu crescimento. A degradação inicial da celulose em monômeros, por ser extracelular, provavelmente possibilita que as bactérias possam atuar como agentes de limpeza, assimilando e crescendo sobre estes monômeros ou em moléculas orgânicas liberadas pelos fungos durante o seu crescimento (Meidute et al., 2008).

5. CONCLUSÕES

- I. O vermicomposto produzido a partir de esterco bovino abrigou uma diversidade de fungos superior à torta de filtro;
- II. A torta de filtro proporcionou densidade populacional superior ao Esterco Bovino em todas as épocas de maturação;
- III. A utilização de sete diferentes meios de cultivo (AH, Cel, Man, Sab, MS, Asp, BDA) e três temperaturas (25, 37 e 45°) permitiu maior amplitude de isolados fúngicos. A utilização de um único meio teria limitado a obtenção de um inventário de fungos associados a vermicompostos;
- IV. O Esterco bovino demonstrou ser uma fonte de diversidade para bioprospecção de microrganismo para serem utilizados como candidatos na construção de inoculantes;
- V. Os isolados 98, 637 foram mais eficientes na solubilização de zinco. Para a solubilização da celulose, os isolados 292, 216 e 415 apresentaram

maiores índices enzimáticos. Quanto à solubilização de fosfato os Isolados 131 e 292 exibiram mais índice de solubilização. Estes isolados demonstraram potencial para ser usado nas próximas etapas visando o desenvolvimento de bioinoculantes;

- VI. A quarta avaliação (90 dias) proporcionou condições de abrigar um maior número de microrganismos multifuncionais, com aptidão para solubilizar P e Zn e degradar celulose. Apenas 10 desses isolados não foram polifuncionais;

- VII. A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 foi capaz de se beneficiar dos exsudados produzidos isolados 467 e 476 e colonizar eficientemente a superfície da hifa e a hifosfera dos isolados de *Trichoderma*. A combinação dos isolados de *Trichoderma* com a *H. seropedicae* estirpe RAM10 pode ser utilizada na construção de inoculantes mistos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, K. P. (2012) *Prospecção de Bactérias Promotoras do Crescimento vegetal Associadas em Vermicomposto*. Tese de Mestrado em Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro.
- Aira, M., Monroy, F., Domínguez, J. (2006) *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) activates fungal growth, triggering cellulose decomposition during vermicomposting. *Microbial Ecology*, 52:738-746.
- Ajilogba, C. F., Babalola, O. O. (2013) Integrated management strategies for tomato fusarium wilt. *Biocontrol Science*, 18: 117-127.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (4ed) (2002) *Biologia molecular da célula*, Porto Alegre: Artmed. 1396p.
- Amchentsev, A., Kurugundla, N., Saleh, A. G. (2008) Aspergillus-related lung disease. *Respiratory Medicine CME*, 1: 205-215.
- Anastasi, A., Varese, G. C., Marchisio, V. F. (2005) Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*, 97: 33-44.
- Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. J. (2008) Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1733-1740.
- Baldani, V. L. D., Döbereiner, J. (1999) Alternativa para uma agricultura mais ecologia. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição mineral de plantas: Base para um novo paradigma na agrotecnologia do século XXI. In: *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição mineral de plantas*. Siqueira, J. O. Viçosa: SBCS.

- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 215–242.
- Martinez-Balmori, D., Olivares, F. L., Spaccini, R., Aguiar, K. P., Araujo, M. F., Aguiar, N. 11 O., Guridi, F., Canellas, L. P. (2013) Molecular characteristics of vermicompost and their relationship to preservation of inoculated nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104: 540–550
- Baschien, C., Rode, G., Böckelmann, U., Götz, P., Szewzyk, U. (2009) Interactions Between Hyphosphere-Associated Bacteria and the Fungus *Cladosporium herbarum* on Aquatic Leaf Litter. *Microbial Ecology*, 58: 642–650.
- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant grown-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16: 729-770.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., Hernandez, J.P. (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 378: 1–33.
- Bashan, Y., Levanony, H. (1988) Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. *Journal of General microbiology*, 134: 1811-1820.
- Baskar, G., Renganathan, S. (2011) Screening of supplementary nitrogen source for fungal L-asparaginase production from soya bean meal flour using latin square design. *International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry*, 1: 1-7.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- Benner, R. Newell, S.Y., Maccubbin, A.E., Hodson, R.E. (1984) Relative contributions of bacteria and fungi to rates of degradation of lignocellulosic detritus in salt-marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 36-40.
- Berraquero, F. R., Baya, A. M., Cormenzana, A. R. (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, 17:399-406.
- Bills, G. F., Christensen, M., Powell, M., Thorn, G. (2004) 'Saprobic soil fungi'. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Amsterdam: Elsevier.
- Boer, W., Folman, B. L., Summerbell, R. C., Boddy, L. (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 795-811.
- Botelho, G. R., Xavier, G. R., Neves, M. C. P., Rumjanek, N. G. (2006) A importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas fluorescens* a

- supressão de doenças de plantas. Seropédica: Embrapa Documentos. 211, 31p.
- Brady, N. C.; Weil, R. R. (3ed) (2013) *Elementos da Natureza e Propriedade dos Solos*. Porto Alegre: Livraria Freitas Bastos. 685p.
- Budi, S. W., van Tuinen, D., Martinotti, G., Gianinazzi. S. (1999) Soilborne Fungal Pathogens Development and Antagonistic towards Compatible with Arbuscular Mycorrhiza Mycorrhizosphere of a Bacterium Isolation from the Sorghum bicolor. *Applied and Environmental Microbiology*, 11: 5148–5150.
- Chigineva, N. I., Aleksandrova, A. V., Tiunov, A. V. (2009) The addition of labile carbon alters litter fungal communities and decreases litter decomposition rates. *Applied Soil Ecology*, 42: 264–270.
- Coopercana (2015) *Inoculante reduz uso de nitrogênio no canavial*. <http://www.copercana.com.br/index.php?xvar=ver-ultimas&id=2550> em 24/01/2015.
- Das, S., Sharma, S., Kar, S., Sahu, S. K., Samal, B., Mallick, A. (2010) Is inclusion of Sabouraud dextrose agar essential for the laboratory diagnosis of fungal keratitis? *Indian Journal of Ophthalmology*, 58: 281-286.
- Davey, M. E., O'toole, G. A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology*, 64:847–867.
- Deacon, L. J., Pryce-Millera, E. J., Franklandb, J. C., Bainbridgea, B. W., Moorea, P. D., Robinsona, C. H. (2006) Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 7–20.
- Devevre, O., Garbaye, J., Botton, B. (1996) Release of complexing organic acids by rhizosphere fungi as a factor in Norway Spruce yellowing in acidic soils. *Mycological Research*, 100: 1367–1374.
- Devi, S.H., Vijayalakshmi, K., Pavana Jyotsna, K., Shaheen, S. K., Jyothi, K., Surekha Rani, M. (2009) Comparative assessment in enzyme activities and microbial populations during normal and vermicomposting. *Journal of Environmental Biology*, 30: 1013-1017.
- Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., Baldani, J. I. (1995) *Como Isolar e Identificar Bactérias Diazotróficas de Plantas Não-Leguminosas*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia.
- Dominguez, J., Edwards, C. A. (2010). Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. In: C.A. Edwards, N.Q. Arancon, and R.L. In: Edwards, C. A, Arancon, N. Q., Sherman, R. L. *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Waste and Environmental Management*. Boca Raton: CRC Press.

- Edwards, C. A., Fletcher, K. E. (1988) Interactions between earthworms and microorganisms in organic matter breakdown. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 24: 235-247.
- Elvira, C., Goicoechea, M., Sampedro, L., Mato, S., Nogales, R., (1996) Bioconversion of solid paper-pulp mill sludge earthworms. *Bioresource Technology*, 57: 173–177.
- Embrapa. (2015) Embrapa Soja coordena o primeiro banco de microorganismos virtual do país http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=488 Em 24/01/2015.
- Epstein, E. (1997) *The Science of Composting*. Lancaster: Technomic Publishing Company.
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W., Etoa, F. X. (2006) Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeisguineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 5: 2450–2460.
- Fernández-Gómez, M. J., Nogales, R., Insam, H., Romero, E., Goberna, M. (2012) Use of DGGE and COMPOCHIP for investigating bacterial communities of various vermicomposts produced from different wastes under dissimilar conditions. *Science of the Total Environment*, 414: 664–671.
- Ferraz, A. L. (2 ed) (2010) Fungos decompositores de material lignocelulósicos. in: Esposito, E., Azevedo, J. L. Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educ. 638p.
- Fomina, M. A., Alexander, I. J., Colpaert, J. V., Gadd, G. M. (2005) Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 851–866.
- Fomina, M. A., Ritz, K., Gadd, G. M. (2003) Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. *Mycological Research*, 107: 861–871.
- Fravel, D., Olivian, C., Alabouvette, C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157: 493-502.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M. (2011) Environmental and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75:583-609.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. (2005) Mycorrhiza helper bactéria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions. *New Phytologist*, 168: 4–8.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka. (2007) The mycorrhiza helper bactéria revisited. *New Phytologist*, 176:22–36.

- Gadd, G. M. (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124:25–60.
- Galvagno, M. A., Forchiassin, F. (2 ed) (2010) Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: Esposito, E., Azevedo, J. L. Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs. 638p.
- Gans, J., Wolinsky, M., Dubar, J. (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 26: 1387-1390.
- Garbaye, J. (1994) Helper bacteria—a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128:197–210.
- Georgakopoulos, D. G., Fiddaman, P., Leifert, C., Malathrakis, N. E. (2002) Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 1078–1086.
- Gómez-Brandón, M., Domínguez, J. (2014) Recycling of Solid Organic Wastes Through Vermicomposting: Microbial Community Changes Throughout the Process and Use of Vermicompost as a Soil Amendment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44: 1289–1312.
- Gopal, M., Gupta, A., Sunil, E. Thomas, G. V. (2009) Amplification of plant beneficial microbial communities during conversion of coconut leaf substrate to vermicompost by *Eudrilus* sp. *Current Microbiology*, 59:15–20.
- Gray, K. R., Sherman, K., Biddlestone, A. J. (1971) A review of composting – Part 1. *Process Biochemistry*, 6: 32–36.
- Griffiths, B. S., Ritz, K., Ebbelwhite, N., Dobson, G., (1999) Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 145–153.
- Grinhut, T., Hadar, Y., Chen, Y. (2007) Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. *Fungal biology reviews*, 21: 179 – 189.
- Grinhut, T., Salame, T. M., Chen, Y., Hadar, Y. (2011) Involvement of ligninolytic enzymes and Fenton-like reaction in humic acid degradation by *Trametes* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91: 1131–1140.
- Grishkan, I., Beharav, A., Kirzhner, V., Nevo, E. (2007) Adaptive spatio temporal distribution of soil microfungi in ‘Evolution Canyon’ III, Nahal Shaharut, extreme southern Negev Desert, Israel. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90: 263–277.
- Haas, H. (2014) Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Natural Product Reports*, 31: 1266–1276.

- Hankin, L., Anagnostakis, S.L. (1975) The use of solid media for solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, 67:597-607.
- Harriott, M. M., Nover, M. C. (2009) *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 914-3922.
- Harriott, M. M., Noverr, M. C. (2010) Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus vancomycin* resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrob. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 3746–3755.
- Hättenschwiler, S., Fromin, N., Barantal, S. (2011) Functional diversity of terrestrial microbial decomposers and their substrates. *Comptes Rendus Biologies*, 334: 393–402.
- HIMEDIA, *Agar Sabouraud Dextrose* - Modelo M063 – Technidal Data. 1-2011.
- Hiscox, J., Savoury, M., Vaughan, I. P., Muller, C. T., Boddy, L. (2015) Antagonistic fungal interactions influence carbon dioxide evolution from decomposing wood. *Fungal ecology*, 14: 24 – 32.
- Hoffman, M. T., Arnold, A. E. (2010) Endophytes Phylogenetically Diverse Fungal Diverse Bactéria Inhabit Living Hyphae of Phylogenetically Diverse Fungal Endophytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 4063–4075.
- Hofrichter, M., Steinbüchel, A. (2001) Biopolymers. Wiley-VCH, Weinheim.
- Holden, S. R., Gutierrez, A., Treseder, K. K. (2013) Changes in Soil Fungal Communities, Extracellular Enzyme Activities, and Litter Decomposition Across a Fire Chronosequence in Alaskan Boreal Forests. *Ecosystems*, 16: 34–46.
- Hooker, J. E., Piatti, P., Cheshire, M. V., Watson, C. A. (2007) Polysaccharides and monosaccharides in the hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus* E3 and *Glomus tenue*. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 680-683.
- Hryniewicz, K., Ciesielska, A., Haug, I., Baum, C. (2010) Ectomycorrhiza formation and willow growth promotion as affected by associated bacteria: role of microbial metabolites and use of C sources. *Biology and Fertility of Soils*, 46: 139–150.
- Hu, F. P., Young, J. M. (1998) Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 263–271.
- Hungria, M. *Embrapa e UFPR desenvolvem primeiro inoculante para milho e trigo*: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/agosto/1a-semana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiro-inoculante-para-milho-e-trigo-em-09/03/2012>.
- Iffs, B., St-Arnaud. M., Mohamed, H. (2014) Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated

- with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS Microbiology Letters*, 358: 44–54.
- Ingham, E. R., Klein, D. A. (1984) Soil fungi: relationships between hyphal activity and staining with fluorescein diacetate. *Soil Biology and Biochemistry*, 16: 273–278.
- Ingestad, T., Nilsson, H. (1964) The effects of soil fumigation, sucrose application, and inoculation of sugarfungi on the growth of forest-tree seedlings. *Plant and Soil*, 20: 74-84.
- Jardim Freire, J. R., Verneti, F. J. A. (1999) Pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e produção de inoculantes no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 5: 117-126.
- Jayasinghearachch, H. S., Seneviratne, G., Jayasekara, A. P. D. A., De Silva, M. S. D. L., Abeysekera, U. P. (2011) Developed microbial biofilms can restore deteriorated conventional agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1059-1062.
- Jayasinghearachchi, H. S., Seneviratne, G. (2004) A bradyrhizobial-*Penicillium* spp. biofilm with nitrogenase activity improves N₂ fixing symbiosis of soybean. *Biology and Fertility of Soils*, 40: 432–434.
- Jennings, D. H. (1984) Polyol metabolism in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 25: 149–193.
- Johansson, J. F., Paul, L. R., Roger, D. F. (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 1–13.
- Junior, W. M., Welington, L., Lima, A. O. S. (2ed) (2010) Ecologia; habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: Esposito, E., Azevedo, J. L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs.
- Khan, S. A., Hamayun, M., Yoon, H., Kim, H., Suh, S-J., Hwang, S-K., Kim, J-M., Lee, Z., Choo, Y-S., Yoon, U-H., Kong, W-S., Lee, B., Kim, J-G. (2008) Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiology*, 8:231.
- Khokhar, I., Haider, M. S., Mushtaq, S., Mukhtar, I. (2012) Isolation and Screening of Highly Cellulolytic Filamentous Fungi. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 16, 223 – 226.
- Kodsueb, R., McKenzie, E. H. C., Lumyong, S., Hyde, K. D. (2008) Fungal succession on woody litter of *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). *Fungal Diversity*, 30: 55-72.
- Koide, K., Osono, T., Takeda, H. (2005) Fungal succession and decomposition of *Camellia japonica* leaf litter. *Ecological Research*, 20: 599-609.

- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wasilewska, W. M., Cho, N. S., Hofrichter, M., Rogalski, J. (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 175-185.
- Lumini, E., Ghignone, S., Bianciotto, V., Bonfante, P. (2006) Endobacteria or bacterial endosymbionts? To be or not to be. *New Phytologist*, 170: 205–208.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J. , van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577.
- Mader, P., Kaiser, F., Adholeya, A., Singh, R., Uppal, H. S., Sharma, A. K., Srivastava, R., Sahai, V., Aragno, M., Wiemken, A., Bhavdish, N. J., Fried, P. M. (2011) Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat-rice and wheat-black gram rotation in India. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 608-619.
- Maity, A., Pal, R. K., Chandra, R., Singh, N. V. (2014) *Penicillium pinophilum*—A novel microorganism for nutrient management in pomegranate (*Punica granatum L.*). *Scientia Horticulturae*, 169: 111–117.
- Mansfeld-Giese, K., Larsen, J., Larsen, J., Bodker, L. (2002) Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiology Ecology*, 41:133-140.
- Marina, M. A. S., Flores, M. A. S., esBadillo, M. G. C., Saavedra, M. T. R., Osuna, M. A. I., Flores, S. C. (2011) The Plant Growth Promoting Fungus *Aspergillus ustus*: Promotes Growth and Induces Resistance Against Different Lifestyle Pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 686-696.
- Maron, P. A.; Mougel, C., Ranjard, L. (2011) Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies.*, 334: 403–411.
- Martinez-Romero, E., Rosenblueth, M. (1990): Increases bean (*Phaseolus vulgaris L.*) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2384-2388.
- Martino, E., Perotto, S., Parsons, R., Gadd, G. M. (2003) Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 133–141.
- Mcguire, K. L., Bent, E., Borneman, J., Majumder, A., Allison, S. D., Treseder. K. K. (2010) Functional diversity in resource use by fungi. *Ecology*, 91: 2324–2332.
- Meidute, S., Demoling, F., Baath, E. (2008) Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen source. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2334–2343.

- Mendes, G. O., Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., Silva, I. R., Vassilev, N. B., Costa, M. D. (2014) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64: 239–249.
- Mille-Lindblom, C., Tranvik, L. J. (2003) Antagonism between bacteria and fungi on decomposing aquatic plant litter. *Microbial Ecology*, 45: 73–182.
- Mishra, B., Srivastava, L. L. (1986) Degradation of humic acid of a forest soil by some fungal isolates. *Plant and Soil*, 96: 413-416.
- Molecular Probes (2004) *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit*.
- Moorhead, D. L., Sinsabaugh, R. L. (2006) A theoretical model of litter decay and microbial interaction. *Ecological Monographs*, 76: 151-174.
- Moreira, F. M. S., Huising, E. J., Bignell, D. E. (2010) *Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade*. Lavras: UFLA.
- Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. (2ed.) (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: UFLA.
- Murray, P. R., Baren, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Tenover, R. C. (8ed) (2003) *Manual of Clinical Microbiology*, Washington, D.C: ASM.
- Nawar, L. S. (2015) Studies on the Efficacy of Non-Pathogenic Fusarium Oxysporum Isolate to Control Fusarium Wilt of Tomato Plants in Saudi Arabia. *International Journal of Science and Research*, 4: 1949-1954.
- Nesci, A., Barros, G., Castillo, C., Etcheverry, M. (2006) Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. *Soil and Tillage Research*, 91: 143–149.
- Nurkanto, A. (2009) Cellulolytic Activities of Actinomycetes Isolated from Soil Rhizosphere of Waigeo, Raja Ampat, West Papua. *Journal of Tropical Soils*, 14: 239-244.
- Olivares, F.L. Bactéria promotora do crescimento vegetal. (2009) *Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa – MG, p.33-34.
- Osono, T. (2009) Decomposition of grass leaves by ligninolytic litter-decomposing fungi. *Grassland Science*, 56: 31–36.
- Partida-Martinez, L. P., de Loos, C. F., Ishida, K., Ishida, M., Roth, M., Buder, K., Hertweck, C. (2007a) Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:793–797.
- Partida-Martinez, L., Monajembashi, S., Greulich, K., Hertweck, C. (2007) Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism. *Current Biology*, 17: 773–777.

- Pathma, J., Sakthivel, N. (2013) Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. *Applied Soil Ecology*, 70: 33– 47.
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. M., Shirliff, M. A. (2010) Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* *Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Medical Microbiology and Immunology*, 59: 493–503.
- Pikovskaya, R. I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17: 362-373.
- Pramanik, p., Chung, Y. R. (2011) Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*: Documentation of cellulase isozymes in vermicompost. *Waste Management*, 31: 1169–1175.
- Pramanik, P., Chung, Y. R. (2011a) Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by *Eudriluseugeniae* and *Eiseniafetida*: Documentation of cellulose isozymes in vermicompost *Waste Management*, 31: 1169–1175.
- Pramanik, P., Ghosh, G.K., Banik, P. (2009) Effect of microbial inoculation during vermicomposting of different organic substrates on microbial status and quantification and documentation of acid phosphatase. *Waste Management*, 29: 574–578.
- Qi, B. C., Aldrich, C., Lorenzen, L., Wolfaardt, G. M. (2004) Degradation of humic acids in a microbial film consortium from landfill compost. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 43: 6309–6316.
- Radheshyam, S., Joshi, A., Dhake, R. S. A (2012) Brief review on mechanism of trichoderma fungus use as biological control agents. *International Journal of Innovations in Bio-Sciences*, 2: 200-210.
- Rawat, R., Tewari, L. (2011) Effect of Abiotic Stress on Phosphate Solubilization by Biocontrol Fungus *Trichoderma* sp. *Current Microbiology*, 62: 1521–1526.
- Reis, R. J. A. (2014) *Dinâmica populacional de bactérias cultiváveis durante a vermicompostagem e avaliação do potencial bioinoculante dos isolados bacterianos*. Tese de Mestrado em produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro.
- Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moénne-Loccoz, Y., Défago, G. (2007) Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytologist*, 173: 861-872.

- Romani, A. M., Fisher, H., Mille-Lindblom, C., Tranvik, L. J. (2006) Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecological Society of America*, 87: 2559-2569.
- Ruegger, M. J., Tauk-Tornisielo, S. M. (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. *Revista Brasileira de botânica*, 27: 205-211.
- Ruttimann, C., Vicuna, R., Mozuch, M.D., Kirk, T. K. (1991) Limited bacterial mineralization of fungal degradation intermediates from synthetic lignin. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3652-3655.
- Sala, M. M., Gude, H. (2004) Ectoenzymatic activities and heterotrophic bacteria decomposing detritus. *Archiv fur Hydrobiologie*, 160: 289–303.
- Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2010) Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, 161: 168-175.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., Thangaraju, M. (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66: 1794–1798.
- Sarquis, M. I. M., Oliveira, E. M. M., Santos, A. S., Costa, G. L. (2004) Production of L-asparaginase by Filamentous Fungi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 489-492.
- Scarlett, K., Tesoriero, L., Daniel, R., Maffi, D., Faoro, F., Guest, D. I. (2015) Airborne inoculum of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*. *The european journal of plant pathology*. DOI 10.1007/s10658-014-0578-3.
- Schimel, J. P., Bennett, J., Fierer, N. (2004) Microbial community composition and soil N cycling: Is there really a connection? In: *Annual Symposium: Soil Biodiversity and Function*. British Ecological Society, Lancaster, UK.
- Seneviratne, G. (2003) Development of eco-friendly, beneficial microbial biofilms. *Current Science*, 85: 1395–1396.
- Seneviratne, G., Jayasinghearachchi, H. S. (2003) Mycelial colonization by bradyrhizobia and azorhizobia. *Journal of Biosciences*, 28: 243–247.
- Seneviratne, G., Jayasinghearachchi, H. S. (2005) A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1975–1978.
- Seneviratne, G., Zavahir, J.S., Bandara, W.M.M.S., Weerasekara, M.L.M.A.W. (2008) Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:739-743.

- Silva, M., Esposito, E. (2ed) (2010) O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs. 337-375.
- Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. S.; Lopes, A. S.; Guilherme, L. R. G.; Faquin, V.; Furtini Neto, A. E.; Carvalho, J. G. (1999) *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Lavras: SBCS: UFLA.
- Sordi, L., Muhlschlegel, F. A (2009) Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *Federation of European Microbiological Societies*, 9: 990–999.
- Srivastava, P. K., Singh, P. C., Gupta, M., Sinha, A., Vaish, A., Shukla, A. Singh, N., Tewari, S. K. (2011) Influence of earthworm culture on fertilization potential and biological activities of vermicomposts prepared from different plant wastes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174: 420-429.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., Fortin, J. A. (1995) Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi* in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza*, 5: 431-438.
- Talbot, J. M., Treseder, K. K. (2012) Interactions among lignin, cellulose, and nitrogen drive litter chemistry–decay relationships. *Ecology*, 93: 345–354.
- Tarkka, M. T., Sarniguet, A., Frey-Klett, P. (2009) Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium-fungus interactions. *Current Genetics*, 55:233–243.
- Urquiaga, S., Boddey, R. M., Neves, M. C. P. (1999) A necessidade de uma revolução mais verde. In: *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Lavras.
- Vassilev, N., Medina, A., Azcon, R., Vassileva, M (2006) Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agroindustrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant Soil*, 287: 77–84.
- Verma, N., Kumar, K., Kaur, G., Anand, S. (2007) L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27: 45-62.
- Verkhovtseva, N. V., Osipov, G. A., Bolysheva, T. N., Kasatnikov, V. A., Kuzmina, N. V., Antsiferova, E. J., Alexeeva A. S. (2002) Comparative Investigation of Vermicompost Microbial Communities. *Microbiology of Composting*, 99-108. DOI: 10.1007/978-3-662-08724-48.
- Vinceslas-Akpa, M., Loquet, M. (1997) Organic matter transformations in lignocellulosic waste products composted or vermicomposted (*Eisenia fetida Andrei*): Chemical Analysis and ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:751-758.

- Wang, Z., Chen, S. (2009) Potential of biofilm-based biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 1–18.
- Warcup, J. H. (1955) On the origin of colonies of fungi developing on soil by guest dilution plates. *Transactions of the British Mycological Society*, 38: 298–301.
- Wargo, M. J., Hogan, D. A (2006) Fungal—bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 9:359–364.
- Warmink, J. A., Nazir, R., van Elsa, J. D. (2009) Universal and species-specific bacterial ‘fungiphiles’ in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environmental Microbiology*, 11: 300-312.
- Whitelaw, M. A, Harden, T. J., Helyar, K. R. (1999) Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology Biochemistry*, 31: 655–665.
- Wicklow, D. T. (1981) Interference competition and the organization of fungal communities. In: Wicklow, D. T., Carroll, G. C. *The Fungal Community. Its Role and Organization in the Ecosystem*. New York: Marcel Dekker.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M. (2014) Trichoderma-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8: 71-126.
- Yasir, M., Aslam, Z., Kim, S. W., Lee, S-W., Jeon, C. O., Chung, Y. R. (2009) Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. *Bioresource Technology*, 100: 4396-4403.
- Yoon, J. H., Park, J. E., Suh, D. Y., Hong, S. B., Ko. S. J., Kim, S. H. (2007) Comparison of Dyes for Easy Detection of Extracellular Cellulases in Fungi. *Mycobiology*, 35: 21-24.
- Zauza, E. A. V.; Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. (2007) Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa: UFV.
- Zhao, L., Xiao-Qin, W., Jian-Ren, Y., Hao, Li. (2014) Isolation and characterization of a mycorrhiza helper bacterium from rhizosphere soils of poplar stands. *Biology and Fertility of Soils*, 50:593–601.
- Zilli, J. E., Santos, E. L., Hagler, L. M., Neves, M. C. P., Rumjanek, N. G. (2003) Desenvolvimento de meio de cultura para microrganismo do solo utilizando solo como fonte de nutrientes. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis. Anais. Florianópolis, SC.

7. APÊNDICES

Tabela 10. Fungos isolados no meio BDA provenientes de Esterco Bovino e Torta de Filtro a 0, 30, 60, 90 e 120 dias de vermicompostagem.

Tempo Zero		
Espécies	Origem dos Isolados	
	EB	TF
<i>Aspergillus</i> sp1	x	x
<i>Aspergillus</i> sp2	x	x
<i>Aspergillus</i> sp3	x	x
<i>Aspergillus</i> sp4	x	x
<i>Aspergillus</i> sp5	x	x
<i>Aspergillus</i> sp6	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp7	nd	x
<i>Aspergillus</i> sp8	x	x
<i>Aspergillus</i> sp9	x	x
<i>Coprinus</i> sp1	x	x
<i>Fusarium</i> sp1	x	nd
<i>Fusarium</i> sp2	x	nd
<i>Fusarium</i> sp3	x	nd
<i>Gongronella</i> sp1	x	x
<i>Monilia</i> sp1	x	nd
<i>Paecilomyces</i> sp1	x	x
<i>Rhizopus</i> sp1	x	x
<i>Trichoderma</i> sp1	x	nd
<i>Trichoderma</i> sp2	x	nd
30 dias		
Espécies	Origem dos Isolados	
	EB	TF
<i>Aspergillus niger</i>	x	x
<i>Aspergillus</i> sp1	x	

<i>Aspergillus</i> sp10	nd	x
<i>Aspergillus</i> sp11	nd	x
<i>Aspergillus</i> sp12	nd	x
<i>Aspergillus</i> sp13	nd	x
<i>Aspergillus</i> sp14	x	x
<i>Aspergillus</i> sp15	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp16	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp17	x	nd
<i>Cladosporium</i> sp1	x	nd
<i>Colletotrichum</i> sp1	nd	x
<i>Colletotrichum</i> sp2	nd	x
<i>Fusarium</i> sp4	x	nd
<i>Fusarium</i> sp5	x	x
<i>Fusarium</i> sp6	x	nd
<i>Gongronella</i> sp2	nd	x
<i>Mortierella</i> sp1	x	nd
<i>Penicillium</i> sp1	x	nd
<i>Penicillium</i> sp2	x	x
<i>Scopulariosis</i> sp1	x	nd
<i>Trichoderma</i> sp3	x	x
Colônia branca densa, localizada	x	nd
Colônia branca densa, localizada	x	nd
Colônia branca floculosa	x	nd
Colônia clara, rala, hifas finas	nd	x
Colônia densa, negra, seca com aspecto quebradiço	x	nd
Colônia escura	nd	x
Hifa hialina, Colônia branca, começando a enovelar estruturas	x	nd
Hifa hialinas, Colônia branca, localizada, aspecto pulverulento	x	nd
Hifas hialinas não esporuladas	x	nd
Levedura	nd	x
NI*	nd	x
NI	x	nd
NI	x	x
NI	x	nd

60 dias

Espécies	Origem dos Isolados	
<i>Aspergillus niger</i>	x	x
<i>Aspergillus</i> sp1	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp12	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp13	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp15	x	x
<i>Aspergillus</i> sp18	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp19	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp20	x	nd
<i>Cladosporium</i> sp2	x	nd

<i>Cladosporium</i> sp3	x	nd
<i>Fusarium</i> sp10	nd	x
<i>Fusarium</i> sp11	x	nd
<i>Fusarium</i> sp12	x	nd
<i>Fusarium</i> sp13	x	nd
<i>Fusarium</i> sp14	x	nd
<i>Fusarium</i> sp6	x	nd
<i>Fusarium</i> sp7	x	nd
<i>Fusarium</i> sp8	x	nd
<i>Fusarium</i> sp9	x	nd
<i>Gongronella</i> sp3	x	nd
<i>Gongronella</i> sp4	x	nd
<i>Monilia</i> sp2	x	nd
<i>Mortierella</i> sp2	x	nd
<i>Mortierella</i> sp3	x	nd
<i>Paecilomyces</i> sp2	x	x
<i>Penicillium</i> sp3	x	nd
<i>Penicillium</i> sp4	nd	nd
<i>Penicillium</i> sp5	x	nd
<i>Trichoderma</i> sp4	nd	x
<i>Trichoderma</i> sp5	x	nd
<i>Trichoderma</i> sp6	x	nd
Colônia branca, hifas esparças e ralas	nd	x
Colônia branca	x	nd
Colônia clara, Micélio branco a creme, mais claro nas bordas	x	nd
Colônia escura	x	nd
Colônia escura sob Micélio branco alaranjado	x	nd
Colônia negra densa, rente ao meio	x	nd
Crescimento leveduriforme	x	nd
Micélio hialino, Colônia branca	x	nd
Micélio hialino, Colônia branca, relativamente ralo	nd	x
Micélio hialino, Colônia creme a branca	x	nd
NI	x	nd
90 dias		
Espécies		
Origem dos Isolados		
<i>Alternaria</i> sp1	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp24	nd	x
<i>Aspergillus niger</i>	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp 21	nd	x
<i>Aspergillus</i> sp12	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp22	x	x
<i>Aspergillus</i> sp23	nd	x
<i>Cladosporium</i> sp4	x	nd

<i>Cladosporium</i> sp5	x	nd
<i>Eurotium</i> sp1	x	x
<i>Fusarium</i> sp13	x	x
<i>Fusarium</i> sp15	x	nd
<i>Fusarium</i> sp16	x	nd
<i>Fusarium</i> sp17	nd	x
<i>Fusarium</i> sp18	nd	x
<i>Fusarium</i> sp19	x	nd
<i>Fusarium</i> sp20	x	nd
<i>Fusarium</i> sp21	x	x
<i>Fusarium</i> sp6	x	x
<i>Gongronella</i> sp3	x	nd
<i>Gongronella</i> sp5	x	nd
<i>Mortierella</i> sp4	nd	x
<i>Paecilomyces</i> sp3	x	nd
<i>Penicillium</i> sp 6	x	nd
<i>Penicillium</i> sp7	x	x
<i>Trichoderma</i> sp7	x	nd
Colônia cotonosa/floculosa, amarelada com micelio branco nas bordas	x	nd
Colônia adensada, cor marrom avermelhada	x	nd
Colônia branca	x	nd
Colônia branca, adensada, limitada	x	nd
Colônia branca, cotonosa	x	nd
Colônia Branca, densa, lisa, com crescimento lento	x	x
Colônia branca, hifas esparças, ralas	x	x
Colônia branca a creme, crescimento adensado	x	nd
Colônia creme, crescimento limitado	x	nd
Colônia limitada, adensada, cor marrom avermelhada	x	nd
NI*	x	x
NI	x	nd
NI	nd	x
NI	nd	x
NI	nd	nd
NI	x	nd
120 dias		
Espécies	Origem dos Isolados	
<i>Aspergillus niger</i>	nd	x

<i>Aspergillus</i> sp12	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp25	x	nd
<i>Aspergillus</i> sp26	x	nd
<i>Cladosporium</i> sp6	x	nd
<i>Eurotium</i> sp2	x	nd
<i>Fusarium</i> sp10	x	nd
<i>Fusarium</i> sp13	x	nd
<i>Fusarium</i> sp16	nd	x
<i>Fusarium</i> sp18	x	nd
<i>Fusarium</i> sp23	x	nd
<i>Fusarium</i> sp24	x	nd
<i>Fusarium</i> sp6	x	nd
<i>Helminthosporium</i> sp1	x	nd
<i>Nigrospora</i> sp1	x	nd
<i>Penicillium</i> sp8	x	nd
<i>Pestalotiopsis</i> sp1	x	nd
<i>Trichoderma</i> sp8	x	nd
<i>Trichoderma</i> sp9	x	x
Colônia branca adensada, frutificações amarelas no centro sendo formadas	x	nd
Colônia branca, centro concêntrico com tendência a mudar de cor		x
Colônia branca, centro escuro	x	nd
Colônia branca, densadas	x	nd
Colônia branca, hifas adensadas, não esporulada	x	nd
Colônia quase imperceptível, crescimento lento, leve coloração esverdeada	x	nd
Hifas hialinas, Colônia rala, formando flocos rasos levemente esverdeados	x	nd

*NI: Fungo esporulado, mas não identificado
nd: Fungo não detectado

Tabela 11. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC), halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados no tempo zero da vermicompostagem.

	Origem Isolados		Zinco			Celulose			Fosfato		
			HC	HS	IS	HC	HS	IE	HC	HS	IS
			----- cm -----			----- cm -----			----- cm -----		
1	EB		3,2	3,2	1,0	-	-	-	6,7	6,7	1,0
5	EB		2,6	2,6	1,0	-	-	-	8,0	8,0	1,0
7	EB		4,8	4,8	1,0	-	-	-	4,6	6,2	1,4
13	EB		2,0	2,4	1,2	-	-	-	1,4	4,3	3,1
31	EB	TF	1,9	1,9	1,0	7,9	7,9	1,0	1,5	4,2	2,7
43	EB	TF	1,1	1,8	1,6	6,4	6,4	1,0	2,2	3,8	1,7
44	EB	TF	4,0	4,0	1,0	-	-	-	2,1	4,1	2,0
47	EB	TF	2,3	6,0	2,7	-	-	-	1,9	4,2	2,3
48	EB	TF	1,9	4,9	2,6	-	-	-			
49	EB	TF	1,8	4,8	2,7	-	-	-	2,4	4,5	1,9
50	EB	TF	2,8	3,2	1,1	-	-	-	1,7	3,8	2,3
51	EB	TF	3,3	5,9	1,8	-	-	-	8,0	8,0	1,0
54	EB		1,2	2,8	2,3	-	-	-	1,3	4,8	3,8
55		TF	3,1	5,1	1,6	8,0	8,0	1,0	4,6	5,3	1,1
56	EB	TF	-	-	-	-	-	-	2,3	4,5	2,0

62	EB	TF	1,7	1,7	1,0	6,3	6,3	1,0	1,7	1,7	1,0
64	EB		1,3	1,3	1,1	4,2	8,0	1,9	8,0	8,0	1,0

(-) Fungos que não foram capazes de crescer

Tabela 12. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC) e halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados aos 30 dias da vermicompostagem.

	Origem Isolados	Zinco			Celulose			Fosfato			
		HC	HS	IS	HC	HS	IE	HC	HS	IS	
		----- cm -----			----- cm -----			----- cm -----			
71	EB	3,1	3,4	1,1	1,8	1,9	1,0	2,7	4,6	1,7	
74		3,4	3,9	1,1	3,3	3,3	1,0	3,3	5,5	1,7	
77	EB	1,5	1,5	1,0	3,9	3,9	1,0	1,8	4,4	2,5	
78	EB	0,8	0,8	1,0	1,1	1,1	1,0	0,9	1,8	1,9	
88		TF	-	-	-	3,6	2,4	0,7	-	-	-
89	EB	1,1	2,4	2,2	-	-	-	1,3	3,4	2,6	
90		TF	3,3	3,3	1,0	4,9	4,9	1,0	2,8	4,6	1,7
91	EB	1,7	2,8	1,6	2,2	2,2	1,0	1,1	3,3	3,1	
93	EB	-	-	-	-	-	-	1,1	4,2	3,9	
98	EB	0,9	3,5	3,7	1,2	1,8	1,5	1,7	4,8	2,8	
103	EB	-	-	-	-	-	-	2,5	2,5	1,0	
106		TF	2,3	2,3	1,0	3,7	3,7	1,0	3,7	4,8	1,3
108	EB	3,5	3,8	1,1	6,2	6,2	1,0	3,6	5,5	1,5	
115	EB	1,5	2,0	1,4	1,9	2,8	1,5	1,6	3,3	2,0	
118	EB	1,5	1,5	1,0	2,4	2,4	1,0	1,2	3,3	2,9	
124	EB	TF	3,1	3,1	1,0	4,7	4,7	1,0	3,9	5,1	1,3
128		TF	1,7	1,7	1,0	1,6	1,6	1,0	1,1	2,3	2,1

129	EB		2,4	2,4	1,0	-	-	-	4,6	5,1	1,1
131		TF	3,6	4,2	1,2	-	-	-	1,1	4,4	4,1
133	EB		1,3	4,2	3,2	-	-	-	2,2	2,8	1,3
134		TF	1,5	3,0	2,0	-	-	-	4,2	4,2	1,0
135	EB		1,0	1,0	1,0	2,7	2,7	1,0	1,0	1,0	1,0
136		TF	-	-	-	3,2	3,2	1,0	-	-	-
138	EB	TF	-	-	-	3,1	3,1	1,0	-	-	-
139	EB		1,3	2,4	1,9	0,8	0,8	1,0	1,2	2,2	1,9
140	EB		1,3	1,3	1,0	1,8	1,8	1,0	2,4	3,2	1,3
145	EB		5,2	5,2	1,0	1,2	2,7	2,3	1,8	3,6	1,9
147	EB		3,2	3,4	1,1	1,6	2,8	1,8	3,4	3,4	1,0
150	EB	TF	2,4	2,4	1,0	1,7	2,8	1,6	5,1	5,5	1,1
152	EB		4,6	4,6	1,0	-	-	-	4,1	5,0	1,2
153	EB	TF	3,9	4,3	1,1	5,0	5,0	1,0	3,4	4,7	1,4
154	EB	TF	7,2	7,2	1,0	8,0	8,0	1,0	7,3	7,3	1,0
159	EB		3,8	3,8	1,0	8,0	8,0	1,0	2,3	2,3	1,0

(-) Fungos que não foram capazes de crescer

Tabela 13. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC) e halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados aos 60 dias da vermicompostagem.

	Origem Isolados	Zinco			Celulose			Fosfato		
		HC	HS	IS	HC	HS	IE	HC	HS	IS
		----- cm -----			----- cm -----			----- cm -----		
201	EB	8,0	8,0	1,0	-	-	-	8,0	8,0	1,0
208	TF	3,3	4,0	1,2	6,5	6,5	1,0	2,5	5,0	2,0

211	EB		1,1	3,1	2,8	2,6	4,4	1,7	1,8	4,6	2,5
212	EB		1,3	2,2	1,7	5,2	5,2	1,0	1,2	3,6	3,1
216	EB		1,8	2,8	1,6	1,0	3,5	3,5	2,1	3,2	1,5
217		TF	5,1	5,2	1,0	7,5	7,5	1,0	8,0	8,0	1,0
220	EB		1,8	1,8	1,0	8,0	8,0	1,0	8,0	8,0	1,0
225	EB		1,2	4,4	3,7	–	–	–	0,7	1,4	2,0
227		TF	3,8	4,2	1,1	7,3	7,3	1,0	2,1	4,3	2,0
228	EB		3,8	4,4	1,2	7,3	7,3	1,0	3,3	5,5	1,7
232	EB		4,8	4,8	1,0	–	–	–	0,8	1,2	1,4
233	EB		3,3	4,7	1,4	7,1	7,1	1,0	3,2	5,2	1,6
243	EB		3,6	4,7	1,3	7,2	7,2	1,0	2,6	4,7	1,8
252	EB		5,4	5,6	1,0	8,0	8,0	1,0	2,3	4,4	1,9
256	EB		3,2	3,2	1,0	7,4	7,4	1,0	3,3	5,4	1,6
257	EB		6,1	6,1	1,0	8,0	8,0	1,0	6,2	6,2	1,0
264	EB		1,0	2,3	2,2	5,6	5,6	1,0	1,8	3,4	1,9
265	EB	TF	3,4	5,9	1,7	4,7	5,5	1,2	3,2	4,8	1,5
267	EB		3,7	5,9	1,6	7,3	7,3	1,0	2,2	4,2	1,9
268		TF	4,1	5,1	1,3	7,2	7,2	1,0	2,6	5,4	2,1
274	EB		6,3	6,3	1,0	4,7	4,7	1,0	6,3	6,3	1,0
275	EB		3,6	3,6	1,0	–	–	–	1,8	1,8	1,0
277	EB		4,0	4,0	1,0	2,1	2,1	1,0	4,2	5,5	1,3
278	EB		3,3	3,3	1,0	6,4	6,4	1,0	5,7	5,7	1,0
279	EB		2,4	2,4	1,0	2,6	3,1	1,2	1,7	4,1	2,5
282	EB		4,5	6,1	1,3	7,4	7,4	1,0	1,7	4,5	2,6
292	EB		1,0	2,1	2,1	0,6	2,6	4,4	0,4	1,8	4,1
302	EB		3,4	5,4	1,6	8,0	8,0	1,0	3,1	4,5	1,5
304		TF	2,8	5,7	2,1	–	–	–	3,3	4,3	1,3
310	EB		3,9	5,0	1,3	8,0	8,0	1,0	2,2	4,1	1,8

324	EB	1,0	2,5	2,5	2,1	3,8	1,8	1,3	3,1	2,5
325	EB	1,3	2,8	2,3	2,0	2,3	1,1	0,8	1,8	2,4
326	EB	0,6	0,6	1,0	-	-	-	0,5	0,5	1,0
335	EB	1,1	1,7	1,6	1,6	2,2	1,4	1,3	3,3	2,5
337	EB	4,3	4,9	1,1	7,1	7,2	1,0	3,3	5,6	1,7
342	EB	1,3	2,4	1,8	5,8	5,8	1,0	1,3	4,1	3,3
343	EB	3,4	4,4	1,3	8,0	8,0	1,0	3,3	5,7	1,7

(-) Fungos que não foram capazes de crescer

Tabela 14. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC) e halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados aos 90 dias da vermicompostagem.

	Origem	Isolados	Zinco			Celulose			Fosfato		
			HC	HS	IS	HC	HS	IE	HC	HS	IS
			----- cm -----			----- cm -----			----- cm -----		
414	EB		2,9	3,6	1,4	5,1	5,1	1,0	2,1	4,7	2,2
415	EB	TF	-	-	-	0,4	2,0	5,6	-	-	-
420	EB		2,1	3,1	1,7	3,2	3,2	1,0	1,6	4,1	2,5
421		TF	3,8	3,8	1,0	6,3	6,3	1,0	2,3	2,3	1,0
422	EB		2,6	3,2	1,5	-	-	-	2,7	4,4	1,6
423	EB		0,8	1,8	2,2	-	-	-	2,5	3,7	1,5
425	EB		2,0	3,1	2,0	-	-	-	3,2	5,2	1,6
426		TF	2,8	2,8	1,0	-	-	-	2,4	2,4	1,0
427	EB		1,1	1,3	1,4	1,9	3,0	1,6	1,5	2,3	1,5
428	EB	TF	0,8	1,1	1,6	-	-	-	0,5	0,5	1,0

430	EB		1,6	1,9	1,2	0,9	2,3	2,6	1,0	1,0	1,0
432	EB		1,4	2,1	1,4	2,7	4,0	1,5	1,2	2,2	1,9
433	EB	TF	1,1	1,2	1,2	3,0	3,0	1,0	6,2	6,2	1,0
438	EB		1,2	1,5	1,2	2,6	4,6	1,8	1,7	3,1	1,8
439	EB		0,9	1,1	1,2	8,0	8,0	1,0	0,9	0,9	1,0
442		TF	2,3	2,7	1,3	5,4	5,4	1,0	1,1	1,1	1,0
444	EB		4,0	4,0	1,0	8,0	8,0	1,0	1,5	1,5	1,0
449	EB		1,4	1,4	1,0	2,7	4,0	1,5	2,4	2,4	1,0
450	EB	TF	1,9	1,9	1,0	3,0	5,1	1,7	1,8	3,3	1,9
451	EB		3,3	3,3	1,0	8,0	8,0	1,0	3,1	4,5	1,4
453	EB	TF	2,2	2,2	1,0	-	-	-	1,0	1,0	1,0
454	EB		3,5	3,8	1,1	8,0	8,0	1,0	5,8	5,8	1,0
455	EB		2,5	3,6	1,5	-	-	-	1,8	2,3	1,3
458	EB		1,9	4,2	2,2	3,0	5,2	1,7	2,2	3,2	1,5
461	EB	TF	2,2	5,1	2,3	5,8	5,8	1,0	3,7	7,1	1,9
462	EB		1,7	3,3	1,9	3,2	4,5	1,4	1,6	3,7	2,3
463	EB	TF	2,2	2,6	1,3	-	-	-	1,6	4,3	2,7
466	EB	TF	4,2	4,5	1,1	8,0	8,0	1,0	5,5	6,1	1,1
469	EB		5,0	5,1	1,0	8,0	8,0	1,0	2,5	4,5	1,8
473		TF	6,0	6,0	1,0	8,0	8,0	1,0	2,8	2,8	1,0
479	EB	TF	6,0	6,1	1,0	-	-	-	8,0	8,0	1,0
482	EB		5,5	5,8	1,1	8,0	8,0	1,0	3,7	4,8	1,3
484	EB		4,5	4,9	1,1	8,0	8,0	1,0	3,5	4,6	1,3
485	EB	TF	3,2	4,1	1,4	8,0	8,0	1,0	7,0	7,0	1,0
487	EB		1,7	2,5	1,7	8,0	8,0	1,0	8,0	8,0	1,0
493	EB	TF	3,5	4,3	1,2	8,0	8,0	1,0	3,3	5,7	1,7
495	EB	TF	3,6	4,4	1,2	8,0	8,0	1,0	2,7	4,0	1,5
498	EB		3,8	4,6	1,2	8,0	8,0	1,0	2,7	4,6	1,7

501	EB		3,3	4,0	1,2	8,0	8,0	1,0	2,7	3,6	1,3
502		TF	3,1	4,7	1,5	6,6	6,6	1,0	3,3	5,5	1,7
506	EB		3,6	4,0	1,1	8,0	8,0	1,0	3,5	4,5	1,3
507	EB		3,9	3,9	1,0	8,0	8,0	1,0	3,3	6,2	1,9
508	EB		4,9	4,9	1,0	8,0	8,0	1,0	5,3	6,9	1,3
509	EB		3,4	3,6	1,1	8,0	8,0	1,0	3,7	4,4	1,2
511	EB		2,8	4,6	1,6	8,0	8,0	1,0	4,6	4,8	1,0
513		TF	2,9	5,7	1,8	8,0	8,0	1,0	4,3	5,2	1,2
515	EB		2,1	2,6	1,4	8,0	8,0	1,0	1,8	4,5	2,6
516	EB		3,5	3,5	1,0	8,0	8,0	1,0	3,2	4,2	1,3
522		TF	3,1	3,1	1,0	8,0	8,0	1,0	3,1	4,2	1,4
525	EB		4,0	4,0	1,0	8,0	8,0	1,0	6,9	8,0	1,2
526	EB		5,1	5,1	1,0	8,0	8,0	1,0	7,2	8,0	1,1

(-) Fungos que não foram capazes de crescer

Tabela 15. Média de três repetições dos halos de colonizações (HC) e halos de solubilização (HS) e índices de solubilização (IS) de Zinco e Fosfato e do índice enzimático (IE) da degradação da celulose dos fungos isolados aos 120 dias da vermicompostagem.

	Origem Isolados	Zinco			Celulose			Fosfato			
		HC	HS	IS	HC	HS	IE	HC	HS	IS	
		----- cm -----			----- cm -----			----- cm -----			
610	EB	1,9	6,2	3,2	7,1	7,1	1,0	3,0	5,2	1,7	
612	EB	2,6	5,7	2,2	3,8	3,8	1,0	4,4	7,2	1,6	
614		TF	2,0	2,7	1,4	5,3	5,3	1,0	1,6	2,5	1,5
615	EB		8,0	8,0	1,0	8,0	8,0	1,0	8,0	8,0	1,0
616	EB		8,0	8,0	1,0	8,0	8,0	1,0	5,8	3,8	0,7

617	EB		8,0	8,0	1,0	8,0	8,0	1,0	8,0	7,3	0,9
618	EB		7,8	7,8	1,0	8,0	8,0	1,0	7,8	7,8	1,0
619	EB	TF	8,0	8,0	1,0	8,0	8,0	1,0	7,0	7,0	1,0
623	EB		4,9	4,9	1,0	8,0	8,0	1,0	3,5	5,6	1,6
624	EB		4,8	7,3	1,5	8,0	8,0	1,0	3,6	5,2	1,5
625	EB		2,5	5,0	2,0	7,3	7,3	1,0	3,3	5,4	1,6
626	EB		2,0	2,5	1,3	8,0	8,0	1,0	5,2	6,2	1,2
627	EB		0,6	1,7	2,7	3,3	3,3	1,0	-	-	-
629	EB		3,1	6,7	2,1	4,0	4,0	1,0	2,9	3,7	1,3
631	EB		2,2	4,3	1,9	-	-	-	-	-	-
632	EB		3,2	6,4	2,0	4,4	4,4	1,0	3,1	3,7	1,2
633	EB		3,0	5,8	1,9	4,3	4,3	1,0	3,7	4,7	1,3
637	EB		1,3	5,9	4,6	3,2	3,2	1,0	2,2	4,3	1,9
38	EB		3,1	6,4	2,0	4,5	4,5	1,0	3,2	4,2	1,3
639	EB		2,5	4,5	1,8	4,2	4,2	1,0	1,8	2,2	1,2
646	EB		5,9	7,6	1,3	5,4	5,4	1,0	6,7	7,9	1,2
651	EB		3,5	6,6	1,9	8,0	8,0	1,0	3,7	4,4	1,2
658		TF	1,0	1,6	1,6	2,5	2,5	1,0	1,0	1,0	1,0
661	EB		8,0	8,0	1,0	-	-	-	8,0	8,0	1,0
662	EB		3,3	7,0	2,2	6,9	6,9	1,0	3,2	4,6	1,5
663	EB		3,5	3,5	1,0	8,0	8,0	1,0	2,6	5,1	2,0
665	EB		1,9	5,3	3,0	7,2	7,2	1,0	3,2	4,9	1,6
674		TF	1,3	3,4	2,7	5,4	5,4	1,0	2,9	5,9	2,0
675	EB		2,7	5,0	1,8	-	-	-	5,2	6,7	1,3
678	EB		1,0	1,0	1,0	0,6	0,6	1,0	2,2	2,2	1,0
684		TF	2,5	4,9	2,0	6,9	6,9	1,0	2,7	4,5	1,7
685	EB		2,4	4,7	2,0	7,1	7,1	1,0	2,9	5,2	1,8

(-) Fungos que não foram capazes de crescer