

ENRIQUECIMENTO BIOLÓGICO DE SUBSTRATOS PARA A
PRODUÇÃO DE MUDAS

RÉGIS JOSUÉ DE ANDRADE REIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2018

ENRIQUECIMENTO BIOLÓGICO DE SUBSTRATOS PARA A
PRODUÇÃO DE MUDAS

RÉGIS JOSUÉ DE ANDRADE REIS

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 Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

073/2018

R337 Reis, Régis Josué de Andrade.

Enriquecimento biológico de substratos para a produção de mudas / Régis Josué de Andrade Reis. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

91 f. : il.

Bibliografia: 72 – 81.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Fábio Lopes Olivares.

1. Vermicomposto. 2. *Herbaspirillum seropedicae*. 3. *Serratia marcescens*. 4. *Trichoderma longibrachiatum*. 4. Substratos Orgânicos I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 631.86

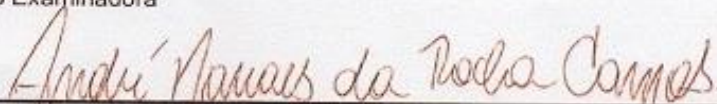
ENRIQUECIMENTO BIOLÓGICO DE SUBSTRATOS PARA A
PRODUÇÃO DE MUDAS

RÉGIS JOSUÉ DE ANDRADE REIS

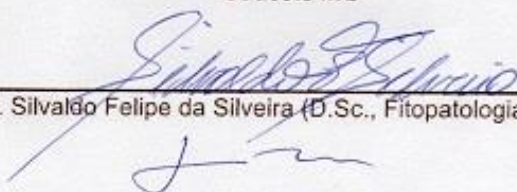
Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal

Aprovada em 23 de Março de 2018

Comissão Examinadora

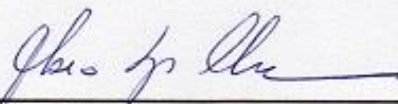


Prof. André Narvaes da Rocha Campos (D. Sc., Microbiologia Agrícola) – IF
Sudeste MG



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

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (D.Sc., Ciência do Solo) – UENF



Prof. Fábio Lopes Olivares (D.Sc., Ciência do Solo) – UENF
(Orientador)

Dedico

*A toda minha família e amigos que de alguma forma contribuíram para a
conclusão deste trabalho;*

À minha filha, Alícia Pazzini de Andrade;

A Deus, que está em tudo e em todos.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter me ungido todos os dias dessa caminhada;

Aos membros do grupo NUDIBA (Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura) por todo ensino e apoio;

A Koppert Biological Systems pela concessão do produto Trichodermil SC 1306[®] a base de conídios do isolado *Trichoderma harzianum* 1306;

Ao Grupo Farroupilha pela concessão do produto Quality[®] a base de conídios *Trichoderma asperellum*;

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense pela oportunidade de realização deste curso;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT-FBN) que viabilizaram a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Microrganismos promotores do crescimento vegetal	4
2.1.1 Fungos promotores do crescimento vegetal.....	4
2.1.2 Bactérias promotoras do crescimento vegetal	5
2.2 Bioinoculantes	8
2.3 Interação bactéria-fungo e suas aplicações	9
2.4 Vermicompostos	14
3. TRABALHOS	17
3.1 INTERAÇÕES MUTUALÍSTICAS ENTRE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL E TRICHODERMA spp VISANDO À FORMULAÇÃO DE INOCULANTES MISTOS	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAIS E MÉTODOS	21
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	42
3.2 FORTIFICAÇÃO BIOLÓGICA DE SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS DE TOMATE (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i>) E MAMÃO (<i>CARICA</i> <i>PAPAYA</i>).....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
INTRODUÇÃO	49
MATERIAIS E MÉTODOS	50
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	64
4. RESUMO E CONCLUSÕES	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RESUMO

REIS, Régis Josué de Andrade, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2018. **Enriquecimento biológico de substratos para a produção de mudas**. Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares.

Objetivou-se com este trabalho formular e avaliar diferentes substratos à base de vermicomposto de esterco bovino enriquecidos com microrganismos promotores do crescimento vegetal para produção de mudas. Inicialmente, *in vitro*, foi testada a compatibilidade entre bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 e *Serratia marcescens* estirpe UENF – 22 GI) com fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* spp. Avaliou-se o efeito positivo dos metabólitos produzidos pelo *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 sobre o crescimento das bactérias. Foi avaliada a influência do fungo na sobrevivência das bactérias quando coinoculados em vermicomposto. Verificou-se a compatibilidade entre o isolado F476 e as duas estirpes bacterianas. As bactérias aderiram às hifas fúngicas, formaram biofilmes e se dispersaram no espaço associadas às hifas em crescimento. Os metabólitos não voláteis produzidos pelo F476 promoveram o crescimento de ambas as estirpes bacterianas. A presença do F476 inoculado em conjunto com as bactérias influenciou significativamente a sobrevivência das estirpes bacterianas, mantendo um maior número de células bacterianas por grama de composto orgânico durante o tempo de incubação. No segundo experimento, avaliou-se a inoculação

de bioinoculantes mistos formados pelas interações do *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 com as bactérias HRC54 e UENF-22GI. Foi utilizado vermicomposto de esterco bovino em proporções em volume de 100, 75, 50 e 25 % diluídos em substrato comercial Basaplant® e/ou areia para a seleção do substrato com maiores rendimentos para mudas do tomateiro. Posteriormente, suspensões contendo 10^8 cel/mL das bactérias *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI ou *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, 10^6 conídios/g de arroz do fungo *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 foram inoculadas na taxa de 1 mL e 1 g de arroz por kg^{-1} de substrato. Os microrganismos foram testados em cultivos isolados e em suas interações fungo-bactéria (F476 + UENF-22GI e F476 + HRC 54). Após 20 e 25 dias as mudas do tomateiro e do mamoeiro, respectivamente, foram coletadas para as análises de crescimento. Verificaram-se aumentos significativos na promoção do crescimento das mudas quando utilizado o substrato formado por 50 % de areia e 50 % de vermicomposto de esterco bovino. A coinoculação fungo-bactérias aumentou significativamente o crescimento das mudas, com destaque para interação F476 + HRC54 com aumentos para mudas do tomateiro até 176 e 230 % e do mamoeiro de 72 e 69 % para massa seca da parte aérea e raízes, respectivamente. A interação mutualística pode trazer benefícios para a formulação de inoculantes mistos aumentando a eficiência e a persistência das bactérias promotoras do crescimento no ambiente agrícola. Substratos orgânicos à base de vermicompostos coinoculados com fungos e bactérias demonstram ser uma alternativa viável para a produção de mudas.

Palavras-chave: Vermicomposto, *Herbaspirillum seropedicae*, *Serratia marcescens*, *Trichoderma longibrachiatum*.

ABSTRACT

REIS, Régis Josué de Andrade, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2018. **Biological enrichment of substrates for the production of seedlings**. Advisor: Prof. Fábio Lopes Olivares.

The objective of this work was to formulate and evaluate different substrates based on bovine manure vermicompost enriched with plant growth promoter microorganisms for seedling production. Initially, in vitro tested the compatibility between plant growth promoting bacteria (*Herbaspirillum seropedicae* strain HRC54 and *Serratia marcescens* strain UENF - 22 GI) with fungi belonging to the genus *Trichoderma* spp. The positive effect of the metabolites produced by *Trichoderma longibrachiatum* isolated F476 on the growth of bacteria was evaluated. It evaluated the influence of the fungus on the survival of the bacteria when co-inoculated in vermicompost. The compatibility between F476 isolate and the two bacterial strains was checked. Bacteria adhered to fungal hyphae, formed biofilms, and dispersed in space associated with growing hyphae. The non-volatile metabolites produced by F476 promoted the growth of both bacterial strains. The presence of the inoculated F476 together with the bacteria significantly influenced the survival of the bacterial strains, maintaining a larger number of bacterial cells per gram of organic compound during the incubation time. In the second experiment, the inoculation of mixed bioinoculants formed by the interactions of *Trichoderma longibrachiatum* isolated F476 with the bacteria HRC54 and UENF-

22GI was evaluated. Bovine manure vermicompost was used in volume proportions of 100, 75, 50 and 25% diluted in commercial Basaplant® substrate and/or sand for substrate selection with higher yields for tomato seedlings. Subsequently, suspensions containing 10^8 cells/ml of the bacteria *Serratia marcescens* strain UENF-22GI or *Herbaspirillum seropedicae* strain HRC54, 10^6 conidia/g of rice of the fungus *Trichoderma longibrachiatum* isolated F476 were inoculated at the rate of 1 mL and 1 g of rice per kg^{-1} of substrate. The microorganisms were tested in isolated cultures and in their fungal-bacterial interactions (F476 + UENF-22GI and F476 + HRC 54). After 20 and 25 days the tomato and papaya seedlings, respectively, were collected for growth analyzes. Significant increases in seedling growth promotion were observed when the substrate formed by 50% sand and 50% bovine manure vermicompost was used. The fungal-bacterial co-inoculation significantly increased the growth of the seedlings, with emphasis on interaction F476 + HRC54 with increases for tomato seedlings up to 176 and 230% and papaya of 72 and 69% for shoot dry matter and roots, respectively. Mutual interaction can bring benefits to the formulation of mixed inoculants by increasing the efficiency and persistence of growth-promoting bacteria in the agricultural environment. Organic substrates based on vermicompost co-inoculated with fungi and bacteria prove to be a viable alternative for the production of seedlings.

Keywords: Vermicompost, *Herbaspirillum seropedicae*, *Serratia marcescens*, *Trichoderma longibrachiatum*.

1. INTRODUÇÃO

A prospecção de microrganismos com capacidade de estabelecer associações eficientes com os vegetais e o desenho de estratégias para maximizar essas ações tem sido alvo de estudo nas últimas décadas. Os microrganismos desempenham papéis ecológicos fundamentais nos ecossistemas, tais como ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e decomposição de compostos xenobióticos (Moreira e Siqueira, 2006). O investimento em tecnologias ambientalmente corretas e economicamente viáveis é essencial para ofertar alternativas ao atual modelo de produção, predominantemente baseado em insumos agrícolas que demandam alto custo energético e de uso de recursos naturais não renováveis.

Assim, microrganismos, seus produtos e processos na forma de insumos biológicos podem desempenhar um papel relevante nas mudanças dos paradigmas de produção agrícola, gerando inúmeras possibilidades para geração de bioinoculantes simples e mistos aplicados em substratos e plantas (Olivares et al., 2015). Inoculantes contendo microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) podem incluir efeitos biofertilizantes, bioestimulantes, biocontrole, biorremediação, resistência de estresses abióticos, associados às possibilidades de aplicação biotecnológica manifesta pela busca de moléculas bioativas e pela transgenia microbiana na planta hospedeira (Adesemoye et al., 2009). Inoculantes a base de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) vêm sendo

adotados em alguns países e demonstraram um grande potencial para o agronegócio (Bashan et al., 2014).

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; Hungria et al., 2010).

A maioria dos estudos relacionados a inoculantes está centrado em programas de seleção de microrganismos únicos, estes formulados e aplicados na planta. Absolutamente, todos os processos microbianos que ocorrem no sistema solo-planta resultam de interações múltiplas e complexas entre diferentes espécies, as quais são pouco exploradas científica e tecnologicamente. Supostamente, uma das interações ecológicas mais relevantes no mundo microbiano advém da coexistência entre bactérias e fungos. Geralmente, a literatura científica avalia o efeito das bactérias individualmente e não sua interação com outros microrganismos presentes na rizosfera, especialmente a interação com fungos que podem ocupar o mesmo nicho ecológico, estabelecendo interações metabólicas ainda pouco exploradas (Seneviratne et al., 2008).

A relevância da coexistência de populações mistas de bactérias e fungos ficou demonstrada por Baldoto e Olivares (2008) a partir de estudos ecológicos na filosfera de diferentes espécies vegetais em ambiente de produção agroecológica. Os autores relataram relações estruturais íntimas entre hifas e esporos fúngicos associadas a colônias variando de pequenos agregados até comunidades bacterianas estruturadas na forma de biofilmes. Tais observações motivaram a proposição de uma nova abordagem para inoculação de BPCV em diferentes plantas, essa baseada na coinoculação de estirpes bacterianas selecionadas na presença de fungos como estratégia para estabelecimento da bactéria na planta hospedeira e maximização das respostas a inoculação.

Estudos têm demonstrado aumento na atividade metabólica da bactéria quando associadas em biofilmes e na hifosfera de fungos (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2003; Jayasinghearachchi e Seneviratne, 2004; Roesti et al., 2006; Rinaudi et al., 2006). 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 escassas.

A estratégia de se utilizar bioinoculantes mistos para incrementar a fertilidade dos substratos vem sendo estudada pelo Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (NUDIBA). Incentivados pelo estudo de Busato et al., (2012), que observaram um incremento de N e P em vermicompostos quando inoculados com bactérias diazotróficas e solubilizadoras de P.

No presente projeto, pretende-se aprofundar no entendimento das relações ecológicas entre fungos e bactérias para seu aproveitamento tecnológico na forma de bioinoculantes mistos destinados ao enriquecimento biológico de substratos. Busca-se a maximização da fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato de rocha e conseqüentemente incrementar a disponibilidade de nitrogênio e fósforo, uma vez que a seleção de combinações de microrganismos eficientes é parte primordial das tecnologias para proposição de inoculantes microbianos para a agricultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos promotores do crescimento vegetal

2.1.1 Fungos promotores do crescimento vegetal

Fungos e bactérias constituem a fração majoritária da microbiota presente no solo. Quanto às suas interações com os vegetais, os fungos podem ser classificados como patogênicos, saprófitos ou benéficos. Os patogênicos atacam órgãos e tecidos vegetais como folhas, hastes e raízes, causando danos às plantas. Já os saprófitos vivem na matéria orgânica e são muito importantes na manutenção e ciclagem de nutrientes. Em suas interações benéficas com as plantas, os fungos podem estimular o crescimento das plantas e protegê-las de pragas e doenças (Moreira e Siqueira 2006).

Outros atributos como a supressão de microrganismos patogênicos (biocontrole) (John et al., 2010), produção de fitormônios (Li et al., 2011), solubilização de fosfatos (Singh e Reddy 2011) e indução de resistência (Fontenelle et al., 2011) podem ser igualmente explorados para fungos promotores do crescimento vegetal. Estudos como de Wahid e Mehana (2000) demonstraram sua relevância na nutrição mineral de plantas. Estes autores, inoculando fungos solubilizadores de P em plantas de trigo, observaram um aumento significativo na disponibilidade de P no sistema, aumentando consequentemente o rendimento dos grãos. Resultados similares foram obtidos por Wakelin et al., (2004), que observaram que a presença do fungo *Penicillium*

sp. em raízes de trigo, solubilizou 78% de P de rochas fosfatadas, aumentando a produtividade dos grãos.

Várias espécies de fungos vêm sendo documentadas como excelentes solubilizadoras de fosfato de rocha, como relatado por Vassilev e Vassileva (2003), que destacaram as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* neste contexto. Outros fungos que formam associações micorrizicas também são capazes de melhorar a absorção de P pelas plantas pela ampliação da área de exploração do substrato pelo sistema radicular (aumentando a área de absorção das raízes e a velocidade de absorção do P), além de possuírem a capacidade de absorver P de fontes não disponíveis para as plantas (Colozzi Filho e Cardoso, 2000).

Fungos podem atuar na promoção do crescimento vegetal indiretamente como demonstrado por John et al., (2010) em seus estudos, nos quais verificou-se que *Trichoderma viride* pode atuar como um agente de biocontrole contra *Fusarium oxysporum* e *Pythium arrhenomanes*. Espécies de *Trichoderma* são comumente encontrados em solos e associados a compostos orgânicos. Eles possuem um conjunto de características que lhe conferem o *status* de fungo mais utilizado na agricultura. Entre essas características estão a capacidade de produzir um amplo espectro de antibióticos, parasitismo de fungos fitopatogênicos, indução de resistência localizada e sistêmica em plantas, solubilização de nutrientes, alongamento de raízes de plantas aumentando a área de exploração e absorção de nutrientes e potencial de melhorar a eficiência de uso do nitrogênio pelas plantas. Para uma leitura detalhada sobre essas características das espécies de *Trichoderma* sugere-se a revisão de Harman et al., (2004).

Estudos com o uso de espécies de *Trichoderma* na agricultura são bem vistos pelo mercado agrícola, já que diversos isolados vêm sendo utilizados em escala comercial.

2.1.2 Bactérias promotoras do crescimento vegetal

Quanto à comunidade bacteriana do solo, uma parte atua na promoção do crescimento vegetal, sendo reconhecidas como “bactérias promotoras do crescimento vegetal” (BPCV). No que diz respeito à interação estrutural, as BPCV podem ocupar diferentes nichos no sistema solo-planta. As bactérias presentes no solo podem ter suas populações aumentadas pela exsudação de metabólitos

diversos pelas raízes. Tais bactérias estabelecidas na interface raiz-solo são conhecidas como rizosféricas (Elmerich e Newton 2007). Existem ainda aquelas bactérias que colonizam a superfície das plantas estabelecendo interações epifíticas com o rizoplano (raízes), cauliplano (caule) ou filoplano (folhas). Porém, no curso da coevolução, bactérias desenvolveram mecanismos para infectar e estabelecer-se no interior dos tecidos da planta hospedeira, que são as interações denominadas endofíticas. Neste caso, as bactérias colonizam principalmente os espaços intercelulares, pelo menos em parte de seu ciclo de vida, sem induzir sintomas aparentes de doença na planta (Rosenblueth e Martínez-Romero, 2006).

Dentre as características funcionais relacionadas à promoção do crescimento de plantas por microrganismos estão a capacidade de FBN, solubilização de minerais de fosfatos a partir de fontes de P não disponível às plantas e a capacidade de produzir e secretar compostos com atividade similar à dos fitormônios, entre outros (Vivanco-Calixto et al., 2016). Tais mecanismos estimulam o crescimento e desenvolvimento das plantas, seja pelo aumento direto na disponibilidade de nutrientes ou promovendo alterações na arquitetura do sistema radicular, incremento de biomassa, alterações nas relações biométricas entre raízes e parte aérea, aumento da germinação e indução da resistência a pragas e doenças (Dey et al., 2004). Estes mecanismos relacionados à biofertilização, à bioestimulação e ao biocontrole de patógenos motivam pesquisas tecnológicas, visando o desenvolvimento de novos insumos biológicos, na forma de inoculantes microbianos destinados ao incremento da produtividade das plantas (Kloepper et al., 1997).

As BPCV são capazes de disponibilizar nutrientes essenciais ao ciclo de vida dos vegetais, tais como N, Fe e P por meio de diferentes mecanismos (Chanway 1997). No caso do N, o processo é realizado por grupos específicos de bactérias chamadas de bactérias fixadoras de N₂ (diazotróficas), que promovem a conversão do nitrogênio atmosférico (N₂) a amônia NH₄⁺. Este processo conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é considerado um processo-chave no ciclo biogeoquímico do nitrogênio, sendo responsável por 65% das entradas de nitrogênio no sistema solo-planta (Moreira e Siqueira 2006). Outro grupo de bactéria que contribui com a nutrição vegetal são as solubilizadoras de P. No processo de solubilização de P, tais bactérias secretam ácidos orgânicos, que atuam na redução do pH e produção de efeitos quelantes.

Isto resulta na solubilização de fósforo a partir de fosfato de cálcio em solos menos intemperizados e de fosfato de ferro e alumínio em solos ácidos, tornando estes nutrientes prontamente disponíveis para as plantas (Marra et al., 2012).

Outro efeito às BPCV é o aumento da área de exploração do sistema radicular com consequente aumento da absorção de água e nutrientes do solo. O principal mecanismo responsável por este fenótipo advém da secreção de auxinas e compostos com atividade similar a fitormônios pelas bactérias (Lee et al., 2004). O incremento de biomassa, a área e o comprimento radicular, o número de raízes laterais e a densidade de pelos radiculares estão entre as modificações anatômicas mais relatadas para as BPCV (Vivanco-Calixto et al., 2016). Dentre os hormônios mais comuns encontra-se o grupo das auxinas (Lehmann et al., 2010), giberelinas (Gutierrez-Manero et al., 2001) e citocininas (Tsavkelova et al., 2005). Ainda, a aplicação de BPCV pode melhorar a resistência das plantas promovendo o controle biológico e/ou aumentando a tolerância a estresses abióticos (Mercado-Blanco e Lugtenberg 2014).

Vários trabalhos demonstraram os efeitos benéficos das bactérias endofíticas diazotróficas em plantas. Conceição et al., (2008) inocularam sementes de milho com tais bactérias na presença de ácidos húmicos, e observaram o estímulo de crescimento vegetal tanto no uso conjunto como na aplicação isolada. Marques Júnior et al., (2008) inocularam microtoletes de cana-de-açúcar com isolados de *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54 na presença de ácidos húmicos e observaram estímulo no crescimento radicular com incremento de massa de 120 %. Foi ainda observado um aumento da biomassa da parte aérea com o uso conjunto de ácidos húmicos e BPCV. Weber et al., (2000) observaram um melhor crescimento de mudas micropropagadas de bananeira inoculadas com bactérias endofíticas diazotróficas (*Herbaspirillum* sp. e *Burkholderia* sp.). *Azospirillum brasiliense* Sp245 inoculada em plântulas micropropagadas de *Prunus cerasifera* promoveu incremento da biomassa radicular com a produção de ácido indol butírico (Russo et al., 2008). *A. brasiliense* também favoreceu o sistema de defesa da planta contra fitopatógenos.

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* apresentou efeitos positivos na promoção do crescimento vegetal das culturas da cana-de-açúcar, feijão, milho e tomate quando aplicadas em conjunto com substâncias húmicas extraídas de vermicompostos (Olivares et al., 2017). Outros gêneros vêm sendo relatados

como promotores do crescimento vegetal. Exemplo, o gênero *Serratia* sp. Vinculado à patogenicidade humana e comumente isolado de material orgânico em decomposição (Houver et al., 2016). Hameeda et al., 2006 diagnosticaram a *Serratia marcescens* EB 67 como solubilizadora de P a partir de rocha fosfatada. A inoculação promoveu o aumento das plantas de milho em até 99 % em estufa e 66% no campo com aumento de 85% no rendimento de grãos. Jung et al., 2017 também demonstraram que a bactéria do mesmo gênero, *Serratia glossinae* GS2, apresenta característica de produzir compostos indólicos.

O uso de espécies de BPCV como as pertencentes dos gêneros *Herbaspirillum* e *Serratia* demonstra ser promissor para construção de bioinoculantes para aumento da produtividade das culturas agrícolas.

2.2 Bioinoculantes

A necessidade de incrementar a produção agrícola e de maneira sustentável, seja ela de forma orgânica ou agroecológica, enfatizou a importância dos processos biológicos (Siqueira et al., 1999). O cenário agrícola atual tem como objetivo aumentar o rendimento das culturas e melhorar a fertilidade do solo por meio de práticas de manejo (Sanchez 2002; Piccolo 2012), culturas com maior tolerância a estresses edáficos (Lynch 2007) e pelo desenvolvimento de novos insumos com base na otimização de processo biológico (Canellas et al., 2013). Assim, o interesse dos cientistas em inovações na produção vegetal abriu espaço para novos estudos de microrganismos e seus produtos. A área da nutrição mineral de plantas foi a que mais chamou a atenção dos pesquisadores.

A maior participação de processos biológicos aplicados à produção agrícola pode resultar em benefícios econômicos e socioambientais, reduzindo a dependência por fontes de energia não renováveis. No Brasil, um exemplo a ser seguido vem dos resultados obtidos na inoculação da soja com rizóbios. O mercado de bioinoculantes da soja gera um superávit de 6-7 bilhões de dólares ao ano com economia nos gastos com fertilizantes nitrogenados (Hungria, 2012). Recentemente a Embrapa Soja em parceria com a Total Tecnologia lançaram um bioinoculante para o capim-braquiária formulado com estirpes selecionadas de bactérias *Azospirillum brasiliense*. Autores diagnosticaram aumento de 15 % da produção e 25 % no conteúdo de proteínas (Embrapa, 2018). Assim, há um

grande interesse em métodos alternativos que reduzam a aplicação de fertilizantes minerais sem alterar a produtividade das diferentes culturas agrícolas.

A Embrapa Agrobiologia (Seropédica/RJ) desenvolveu um bioinoculante multiespécie recomendado para a cultura da cana-de-açúcar. Este é formulado em turfa como veículo e possui cinco estirpes (*Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103, *Azospirillum amazonense* CBAmC e *Burkholderia* sp. BR3407). Os estudos têm demonstrado uma redução nos custos de produção, com economia de 30 kg N/ha/ano (Hungria, 2012). No caso do milho, a adoção de bioinoculantes contendo duas estirpes de *Azospirillum* levou a um incremento de 25 a 30% no rendimento, podendo resultar em uma economia potencial estimada de até 1 bilhão de dólares por safra (Hungria et al., 2010).

Entretanto, quando as bactérias são inoculadas no campo não encontram um nicho ausente de microrganismos, exceto em solo esterilizado, condição essa inexistente na agricultura, o que pode comprometer a sobrevivência do inóculo (Bashan, 1998). Normalmente, o que acontece é que as bactérias têm que competir com a comunidade microbiana nativa extremamente complexa e adaptada, incluindo organismos saprófitos, epífitas, endófitos, patógenos e microrganismos benéficos (Avis et al., 2008). Assim, ao utilizar bioinoculantes deve-se obter uma eficiência na inoculação, que pode ser adquirida em parte pela introdução de estirpes altamente competitivas, usando altas taxas de inóculos (Martinez-Romero e Rosenblueth 1990) (10^9 células/g ou mL de inoculante) e/ou usando “veículos” de inóculo que promovam sua viabilização por mais tempo.

À luz das diferentes iniciativas aplicáveis em curto e médio prazo podem-se ressaltar o desenvolvimento de insumos de base biológica na forma de inoculantes, bioestimuladores e biofertilizantes (Olivares et al., 2017). Nesta direção, a construção de conhecimentos científicos baseados nas interações microbianas do solo entre bactérias e fungos, representa uma fonte de inspiração para o desenvolvimento de uma nova geração de insumos biológicos.

2.3 Interação bactéria-fungo e suas aplicações

A formação de biofilme é uma característica proeminente do crescimento microbiano na natureza. O tipo de "ecologia" que imaginava em relação aos

procariotos, ou seja, células individuais crescendo de maneira planctônica (livres em suspensão), raramente é encontrado na natureza. Em seus habitats naturais, via de regra as bactérias são encontradas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo biofilmes, isto é, uma comunidade estruturada e altamente dinâmica, que atua de maneira complexa, porém coordenada. Os biofilmes formam ecossistemas microbianos complexos, formados de populações desenvolvidas a partir de uma única ou múltiplas espécies, que são encontradas em uma variedade de superfícies bióticas e abióticas (Kyaw 2011). Os biofilmes podem ser constituídos de células microbianas (algas, fungos, bactérias, entre outros micróbios) e um biopolímero extracelular secretado por células originais, conhecido como EPS, que fornece estrutura e proteção para os microrganismos presentes (Seneviratne et al., 2008).

A formação de biofilmes se dá em etapas distintas. Inicialmente microrganismos denominados primários colonizam superfície abiótica multiplicando suas células, formando microcolônias, as quais sintetizam biopolímeros extracelulares (exopolissacarídeos) que passam a atuar como um substrato de aderência para os microrganismos secundários. Após a multiplicação das células, os biofilmes se maturam. Então, ocorre a manutenção e a dissociação de alguns microrganismos para formação de biofilmes distintos (Figura 1). Nesses biofilmes são formados os espaços intersticiais (canais), os quais permitem a circulação de nutrientes e a troca de metabólitos (Kyaw 2011).

Acredita-se que o que levou os microrganismos a formarem biofilmes esteja associado, por exemplo, à proteção contra fatores adversos, ou seja, bactérias em um biofilme encontram-se abrigadas e em relativa homeostase, graças à presença da matriz exopolissacarídica (EPS). Essa matriz contém vários componentes: exopolissacarídeo, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. Ao que parece, o EPS que é secretado para o meio externo é formado de diferentes estruturas e funções, dependendo das comunidades e/ou condições ambientais.

A formação de biofilmes é uma estratégia plausível para a sobrevivência de algumas comunidades microbianas em ambientes adversos, como observado por Seneviratne e Jayasinghearachchi (2003). A estrutura de um biofilme é influenciada por muitos fatores, incluindo as condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, motilidade, comunicação intercelular, bem como os

EPS e proteínas (Flemming e Wingender 2010). O EPS é um polímero que pode impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, principalmente aqueles hidrofílicos e carregados positivamente. Em alguns casos é capaz de sequestrar cátions, metais e toxinas além de ter um possível papel de proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (Davey e O'toole 2000; Kyaw 2011). Sem a matriz EPS não é possível a formação de biofilmes (Flemming e Wingender 2010).

Meneses et al., (2011) evidenciaram a importância do EPS na formação de um biofilme a partir do silenciamento do gene *gumD* da bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* responsável pela formação de EPS. Como resultado o mutante não foi capaz de produzir EPS. Quando colocado em meio de cultura sobre substrato físico e na presença das raízes de planta, não ocorreu a adesão e, conseqüentemente, a formação do biofilme. A aplicação de EPS no meio de cultura na presença da bactéria mutante e das raízes da planta restituiu parcialmente ao fenótipo de agregação, evidenciando a essencialidade do EPS nos eventos iniciais para formação do biofilme.

Em geral, quando os microrganismos coexistem em comunidades, as suas atividades metabólicas são alteradas (Gonzalez-Bashan et al., 2000). Abordagens da genética molecular utilizadas para estudar biofilmes bacterianos têm identificados genes e circuitos reguladores importantes para interações iniciais da superfície celular, maturação do biofilme e o retorno de microrganismos do biofilme para um modo planctônico de crescimento (O'Toole et al., 2000). Em *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, foi demonstrado que os genes de síntese de celulose têm participação na formação de biofilme. Uma mutação no gene *wssD* reduziu a produção de EPS e celulose. Houve alteração na produção de biofilme e na motilidade da estirpe mutante, indicando que a biossíntese de celulose pode ser importante para esses dois processos (Tuleski 2013). Já em estirpes de *Vibrio cholerae* não produtoras de EPS, observou-se que a adesão à superfície não foi afetada, porém a capacidade de formar biofilme foi comprometida, comprovando sua importância para o desenvolvimento da estrutura tridimensional do biofilme (Watnick e Kolter 1999). Assim como o EPS, as estruturas como pili, flagelos e sinais de "quorum sensing" são partes importantes para a formação de biofilme como revelado por meio de análises genéticas moleculares (Pratt e Kolter 1998; Flemming e Wingender 2010).

As aplicações biotecnológicas voltadas para o desenvolvimento de insumos biológicos vêm ganhando destaque no cenário agrícola. A indução de biofilmes microbianos em inoculantes para a agricultura pode ser uma estratégia plausível para incremento da sobrevivência das células no campo e a maximização das respostas da planta hospedeira a inoculação. Alguns estudos vêm destacando a importância de se aplicar bactérias e fungos em conjunto estimulando a formação de biofilmes mistos, porém estes estudos se limitam a rizóbios comerciais e fungos micorrízicos devido às suas características benéficas no crescimento e desenvolvimento vegetal, já documentado na literatura.

Seneviratne e Jayasinghearachchi (2003) em um estudo com a formação de biofilmes entre rizóbios e fungos comuns do solo, observaram com sucesso a interação bactéria-fungo devido às hifas servirem como uma superfície de adesão biótica para as bactérias, além de proporcionar uma fonte de nutrição através de seus exsudados. Neste estudo, os autores destacam a importância da formação de biofilme entre rizóbios e fungos comuns do solo para introduzir com eficácia inoculantes bacterianos de interesse, pois ao formarem biofilmes, podem proteger as bactérias contra condições ambientais adversas e competição por populações nativas do solo. Seneviratne e Jayasinghearachchi (2005) enfatizaram a importância da formação de biofilmes, quando observaram aumento da taxa de sobrevivência dos rizóbios na ausência de seu hospedeiro. Esta, se reveste de importância, não só pela ausência da planta hospedeira, como também pelas limitações nutricionais no substrato solo, as quais podem influenciar na sobrevivência microbiana. Rinaudi et al., (2006) observaram que bactérias simbiotes na ausência de seu hospedeiro e em ambientes com limitações nutricionais tendem a formar biofilmes para aumentar a superfície de contato e obter a nutrição essencial para a divisão celular.

Biofilmes microbianos podem ser igualmente importantes em solos agrícolas impactados pelo uso de agroquímicos, pois resíduos químicos podem afetar negativamente o desempenho de inoculantes microbianos, bem como comprometendo sua eficácia. Elvers et al., (2002) em um estudo de resistência de biofilmes mistos formado por bactérias e fungos filamentosos, observaram que quando houve formação dos biofilmes, necessitam-se de maiores doses de biocidas para causar mortalidade da comunidade microbiana. Demonstrou ainda que mesmo sob altas concentrações do biocida, a rápida regeneração da

comunidade estruturada em biofilme impede sua eliminação do ambiente. A dupla inoculação pode tratar solos contaminados, como visto por Ji et al., (2012), os quais observaram que um fungo coinoculado com uma bactéria, foi eficaz na biorremediação de solos contaminados com metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos, evidenciando outras aplicações para combinações fungo-bactéria.

Outro atributo da aplicação biotecnológica de inoculantes mistos expressando biofilmes advém da capacidade de converter nutrientes indisponíveis em formas assimiláveis pelas plantas, beneficiando seu crescimento e desenvolvimento. Está bem documentado na literatura que certas bactérias e fungos crescendo de forma planctônica expressam genes capazes de promover o crescimento vegetal. Entretanto, são escassas as informações sobre o metabolismo microbiano em comunidades estruturadas em biofilmes e suas aplicações no incremento da fertilidade do solo e enriquecimento biológico de substratos e/ou veículos de inóculo.

Os estudos frequentemente destacam que comunidades microbianas na forma de biofilmes apresentam melhor desempenho em processos específicos do que em suas formas planctônicas, sejam em comunidades exclusivamente por bactérias ou por bactérias e fungos. Holguin e Bashan (1996) testando a formação de biofilmes entre uma bactéria fixadora de N_2 (*Azospirillum brasilense*) e uma não fixadora (*Staphylococcus* sp.) e sua influência na FBN, observaram que além de ter ocorrido uma compatibilidade celular entre elas na formação de biofilmes, houve um aumento significativo de N_2 fixado em relação ao cultivo isolado da bactéria fixadora. Resultados semelhantes foram observados por Jayasinghearachchi e Seneviratne (2004), que estudaram a influência da formação de biofilmes entre uma estirpe de rizóbio comercial recomendado para a soja e fungos encontrados comumente no solo, os quais afetaram positivamente a eficiência da simbiose com a planta e as taxas de fixação de N_2 . Estes autores concluíram que em cocultivo, o desempenho da associação simbiótica foi superior, aumentando significativamente a disponibilidade de N para a planta hospedeira.

Seneviratne e Jayasinghearachchi (2005) testaram também a eficácia destes biofilmes em melhorar a fertilidade do solo. Neste estudo eles investigaram a formação de biofilmes entre *Bradyrhizobium elkanii* e fungos comuns, isolados do solo de jardim, na mineralização de nutrientes do solo. Os autores observaram

que o estabelecimento do biofilme aumentou significativamente a disponibilidade de N e P no solo. Em estudos subsequentes, Jayasinghearachchi e Seneviratne (2006) reforçaram a veracidade desses resultados quando estudaram a influência de biofilmes formados por um rizóbio e fungos do solo na presença de fontes insolúveis de P e verificaram aumento na fração de P-lábil em solução em comparação com a aplicação de bactérias isoladas. Resultados similares foram obtidos por Roesti et al., (2006), que testaram a bioinoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal com fungos micorrízicos em plantas de trigo e observaram que a coinoculação com esses micróbios dobrou o teor de P nas plantas.

Zavahir e Seneviratne (2007) observaram que a coinoculação de *Penicillium* sp. e *Bradyrhizobium elkanii* aumentou significativamente a concentração de compostos bioativos em comparação com a inoculação de suas culturas isoladas. Hameeda et al., (2007) observaram que a coinoculação de BPCV, incluindo a *Serratia marcescens*, com fungos micorrízicos incrementou em 17 a 20 % a produtividade do sorgo, assim como uma melhor interação entre micróbios e planta. Rodriguez-Romero et al., (2005) também observaram aumentos nos parâmetros de crescimento de banana na coinoculação de fungos micorrízicos e bactérias.

Apesar desses estudos da coinoculação de fungos-bactérias relatados, a aplicação de espécies de *Trichoderma* em conjunto com BPCV se faz escassa se não ausente. A aplicação dessa coinoculação apresenta ser promissora visto que já se faz uso desses microrganismos isolados na agricultura.

2.4 Vermicompostos

Vermicomposto (VC) é a transformação de resíduos orgânicos em matéria orgânica estabilizada pela ação conjunta de minhoca e microrganismos. Os VC quando adicionados aos solos melhoram sua estrutura física, química e biológica por apresentarem boa porosidade, boa capacidade de retenção de água, elevada atividade microbiana e quantidades satisfatórias de nutrientes essenciais para plantas (Edwards e Burrows 1988). Além disso, os vermicompostos podem induzir resistência às plantas contra fitopatógenos (Singh et al., 2003, Zaller 2006, Serfoji et al., 2010).

Pelo uso positivo dos VC no crescimento vegetal tem havido interesse nestes na utilização para a produção de mudas e na fertilização orgânica na agricultura (Edwards e Burrows 1988; Arancon et al., 2008; Olivares et al., 2015; Canellas et al., 2015). Foi relatado que a aplicação de VC pode resultar em mudas com volumes maiores de raízes, colmos mais grossos, maiores números de folhas, ou seja, mudas vigorosas mais resistentes às condições de estresse ao serem transplantadas para o campo (Lazcano et al., 2009). Além disso, existem diferentes relatos sobre a aplicação de VC na germinação. Edwards e Burrows (1988) relataram que uma grande variedade de plantas teve a germinação antecipada quando foi aplicado VC. Outros autores relataram que doses mais elevadas de VC são capazes de retardar ou inibir a germinação de plantas. Levinsh (2011) observou que diluições de VC em substituição ao substrato comercial retardaram ou inibiram a germinação de algumas culturas de acordo com a concentração utilizada. Para rabanete, repolho, nabo sueco, beterraba, feijão e ervilha as diluições de 30 a 50 % de VC em substrato comercial resultaram na inibição de até 50 % da germinação. Joshi e Vig (2010) observaram que a germinação de tomate foi afetada negativamente quando concentrações de 30 e 45 % de vermicomposto foram misturadas ao solo.

Em condições de campo, VC também tem demonstrado sucesso na promoção do crescimento de plantas. Joshi e Vig (2010) analisaram o efeito de diferentes concentrações de 15, 30 e 45 % de VC aplicados ao solo no crescimento de tomate em condições de campo e observaram que todas essas concentrações aumentaram os parâmetros de crescimento das plantas e até mesmo a produtividade dos frutos. Kashem et al., 2015 aplicaram taxas de 5, 10, 15 e 20 t ha⁻¹ de VC de esterco bovino em plantas de tomate. Estes autores observaram aumentos significativos nas plantas e na produtividade dos frutos. Concluíram que o VC possui potencial na nutrição das plantas. Vaidyanathan e Vijaylakshmi (2017) observaram que o VC aumenta a disponibilidade de nutrientes, resultando em rápida absorção, conseqüentemente aumentando os parâmetros de crescimento e rendimento das plantas de tomate. As substâncias húmicas presentes nos vermicompostos aumentam a capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas, melhoram o seu metabolismo e estimulam o crescimento de raízes laterais (Canellas et al., 2015).

Ademais, VC possuem altas concentrações de fitormônios produzidos pela atividade microbiana e apresentam concentrações relativamente altas de ácidos húmicos com elevada atividade biológica (Canellas et al., 2000). Estudos relataram que mesmo sob a aplicação de doses recomendadas de fertilizantes inorgânicos, os VC promoveram o crescimento vegetal. Arancon et al., (2008) compararam e avaliaram os efeitos de diferentes misturas de VC (esterco de gado, restos de alimentos e resíduos de papel) com um substrato comercial na germinação, crescimento e floração de petúnias em estufa. Os autores observaram que os três tipos de VC promoveram aumentos significativos em massa seca da parte aérea e raízes de petúnia mesmo sob aplicação regular de fertilizantes inorgânicos em todos os tratamentos. Atribuíram esse aumento no crescimento de plantas a substâncias biologicamente ativas. Kashem et al., (2015) observaram que a aplicação de VC no campo obteve melhor performance no crescimento e produtividade de tomate mesmo quando doses recomendadas para a cultura de NPK foram aplicadas.

VC apresentam uma elevada quantidade de microrganismos potencialmente promotores do crescimento vegetal, tais como, bactérias fixadoras de nitrogênio (Reis 2014). Além disso, demonstram ser um excelente veículo de inóculo microbiano, pois apresentam características capazes de preservar estes micróbios. Kalra et al., (2010) testaram a eficácia do vermicomposto como veículo microbiano e obtiveram sucesso, demonstrando que o VC constitui veículo eficiente para o inóculo de *Rhizobium*. Martinez-Balmori et al., (2013) também observaram que os VC podem ser utilizados como veículo microbiano apresentando características que preservam a viabilidade dos bioinoculantes em longos prazos.

Esses relatos mostram que os VC utilizados como substratos podem resultar em aumentos na produtividade de mudas e, ainda, servir como veículo de inóculo de microrganismos promotores do crescimento vegetal.

3. TRABALHOS

3.1 INTERAÇÕES MUTUALÍSTICAS ENTRE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL E *TRICHODERMA* spp. VISANDO À FORMULAÇÃO DE INOCULANTES MISTOS

Régis Josué de Andrade Reis^(1,2), Pedro Henrique Dias dos Santos, Kamilla Pereira Aguiar^(1,2), Luciano Pasqualoto Canellas⁽¹⁾, Fábio Lopes Olivares^(1,2)

¹Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura & ²Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego 2000, 28013-602 Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

e-mail: andradereis@yahoo.com.br;

RESUMO

A interação entre bactérias e fungos com a formação de biofilmes é uma estratégia ainda pouco utilizada para formulação de inoculantes mistos mais eficientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a interação mutualística entre *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e *Serratia marcescens* UENF-22GI e os fungos *Trichoderma* sp. isolado F476 e *Trichoderma harzianum* isolado SC 1306. Foi testada a compatibilidade entre os microrganismos *in vitro*. Foram selecionados os pares de microrganismos que apresentaram compatibilidade em placas. Foi identificada a espécie do isolado F476. Avaliou-se o efeito positivo de metabólitos produzidos pelo isolado F476 sobre o crescimento das bactérias. Foi observada a influência do isolado F476 na sobrevivência das bactérias promotoras do crescimento vegetal quando coinoculadas em vermicomposto. Verificou-se a compatibilidade entre o F476 e as duas estirpes bacterianas. Foram selecionados os pares F476 + HRC54 e F476 + UENF-22GI. O isolado F476 foi identificado como *Trichoderma longibrachiatum*. As bactérias aderiram às hifas fúngicas, formaram biofilmes e se dispersaram no espaço associadas às hifas em crescimento. Os metabólitos não voláteis produzidos pelo F476 promoveram o crescimento de ambas as estirpes bacterianas. A presença do F476 inoculado em conjunto com as bactérias influenciou significativamente a sobrevivência das estirpes bacterianas, mantendo um maior número de células bacterianas por grama de composto orgânico, durante o tempo de incubação. A interação mutualística pode trazer benefícios para a formulação de inoculantes mistos aumentando a eficiência e a persistência das bactérias promotoras do crescimento no ambiente agrícola.

Palavras-chave: sobrevivência bacteriana, dispersão bacteriana, *Serratia marcescens*, *Herbaspirillum seropedicae*.

ABSTRACT

The interaction between bacteria and fungi with the formation of biofilms is a strategy still little used for the formulation of more efficient mixed inoculants. The objective of this study was to evaluate the mutual interaction between *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 and *Serratia marcescens* UENF-22GI and the fungi *Trichoderma* sp. isolated F476 and *Trichoderma harzianum* isolated SC 1306. The compatibility between microorganisms in vitro was tested. The pairs of microorganisms that showed compatibility in plaques were selected. The F476 isolate species was identified. The positive effect of metabolites produced by the F476 isolate on bacterial growth was evaluated. The influence of the F476 isolate on the survival of the plant growth promoting bacteria when co-inoculated in vermicompost was observed. The compatibility between F476 and the two bacterial strains was checked. It was selected pairs of F476 + HRC54 and F476 + UENF-22GI. The F476 isolate was identified as *Trichoderma longibrachiatum*. Bacteria adhered to fungal hyphae, formed biofilms, and dispersed in space associated with growing hyphae. The non-volatile metabolites produced by F476 promoted the growth of both bacterial strains. The presence of the inoculated F476 together with the bacteria significantly influenced the survival of the bacterial strains, maintaining a larger number of bacterial cells per gram of organic compound during the incubation time. Mutual interaction can bring benefits to the formulation of mixed inoculants by increasing the efficiency and persistence of growth-promoting bacteria in the agricultural environment.

Keywords: bacterial survival, bacterial dispersion, *Serratia marcescens*, *Herbaspirillum seropedicae*.

INTRODUÇÃO

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) têm grande potencial para reduzir o uso de fertilizantes na agricultura (Bashan et al., 2014). O sucesso dos inoculantes é, no entanto, dependente da sua sobrevivência que, por sua vez, é significativamente influenciada pelas condições de solo, rizosfera, micorrizosfera e micosfera (Nazir et al., 2010). Além disso, a comunidade nativa é altamente competitiva e pode limitar a sobrevivência dos inoculantes microbianos formulados com estirpes selecionadas em laboratório (Mallon et al., 2015).

Os gêneros *Herbaspirillum* e *Serratia* têm sido usados como inoculantes com resultados positivos para a promoção do crescimento vegetal (Olivares et al., 2015; Jung et al., 2017). Entretanto, BPCV apresentam baixa capacidade de sobrevivência no solo na ausência da planta hospedeira (Baldani et al., 1997; Bashan e Vazques 2000; Oliveira et al., 2004). A interação mutualística com fungos do solo pode ser uma estratégia viável para aumentar a eficiência dos inoculantes.

Trichoderma spp. são fungos amplamente distribuídos no ambiente e encontrados em solos e substratos orgânicos tanto de regiões temperadas como tropicais. A produção de vários antibióticos e a capacidade de parasitar outros fungos conferem competitividade nos solos e rizosfera. Além disso, possuem capacidade de se associar endofiticamente com raízes, assimilando metabólitos antes mesmo da exsudação (Harma et al., 2004). A interação mutualística entre BPCV e *Trichoderma* pode favorecer o estabelecimento, o crescimento e a dispersão do inóculo no ecossistema resultando em incremento da sobrevivência no sistema solo-planta. Apesar desse potencial, essa interação ainda foi pouco estudada ou inexistente.

Bactérias podem colonizar fungos saprófitos cujas hifas servem de superfície biótica para o acoplamento e formação de biofilmes (Wamink e van Elsas 2009; Warmink et al., 2011). Esse micro-habitat foi denominado de saprorizosfera (Balhausem e de Boer 2016) e pode auxiliar a dispersão das bactérias no ambiente (Warmink e van Elsas 2009; Stopnisek et al., 2016). Além disso, os fungos do solo podem degradar substratos complexos (Kramer et al., 2016) e beneficiar as bactérias em cooperação metabólica.

O favorecimento da nutrição bacteriana pelos fungos já foi demonstrado (Leveau e Preston 2008; Nazir et al., 2013; Rudnick et al., 2015; Stopnisek et al., 2016). As bactérias da rizosfera não dependem exclusivamente da fonte de carbono exsudado pelas plantas e a contribuição dos exsudados liberados por fungos na nutrição bacteriana é bem conhecida (Seneviratne e Jayasinghearachchi 2003; Ballhausen e de Boer 2016), incluindo restos fúngicos como parede celular (Bai et al., 2016) e até mesmo hifas vivas (Leveau e Preston 2008).

A relevância da coexistência de populações mistas de bactérias e fungos foi demonstrada por Baldotto e Olivares (2008) em estudo ecológico na filosfera de diferentes espécies vegetais em ambiente de produção agroecológica. Foram descritas relações estruturais íntimas entre hifas e esporos fúngicos associados às colônias variando de pequenos agregados até comunidades bacterianas estruturadas na forma de biofilmes. Tais observações motivaram a proposição de uma nova abordagem para inoculação de BPCV baseada na sua coinoculação com fungos como estratégia para aumentar o estabelecimento da bactéria na planta hospedeira. O objetivo desse trabalho foi, portanto, investigar as interações mutualísticas entre fungos do gênero *Trichoderma* e duas espécies de BPCV (*H. seropedicae* e *S. marcescens*) visando o aumento da sobrevivência das estirpes bacterianas inoculadas em substratos de crescimento de plantas.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos utilizados e métodos de cultivo

Foram selecionadas duas bactérias (estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* e estirpe UENF-22GI de *Serratia marcescens*) e dois fungos provenientes da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). O isolado SC 1306 de *Trichoderma harzianum* foi isolado do produto comercial TRICHODERMIL SC 1306® e o isolado F476 de *Trichoderma* sp foi obtido de vermicomposto de esterco bovino. A estirpe HRC54 foi selecionada pelos efeitos positivos na promoção do crescimento vegetal (Olivares et al., 2017). A estirpe UENF-22GI foi isolada de vermicomposto de esterco bovino e se apresenta com características

promissoras no crescimento vegetal (dados não apresentados). Já as espécies de *Trichoderma* foram selecionadas por apresentarem características que proporcionam o crescimento vegetal e que são amplamente utilizadas na agricultura (Harman et al., 2004). Para crescimento e manutenção das bactérias foram utilizados meios de cultura líquido (8 g de caldo nutritivo, NB), sólido (8 g de NB e 15 g de ágar) e semissólido (JNFb) (Olivares et al., 1996). Em meio líquido, o crescimento foi sob agitação constante por 48 h a 30 °C, para o meio sólido em plaqueamento foram feitas estrias das culturas e incubados por 24 h a 30 °C e em meio semissólido foi incubado por sete dias a 30 °C. Já os fungos, foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias em B.O.D. a 28 °C.

2.2 Seleção das combinações *Trichoderma* spp. e *H. seropedicae* e *S. marcescens* compatíveis em meio de cultura

Foram semeados no centro das placas de Petri discos de 5 mm de diâmetro cortados no bordo das colônias dos fungos purificados e, ao redor, foram semeadas alíquotas de 5 µL das bactérias (10^8 células. mL⁻¹). Incubou-se a 28 °C por sete dias. Após esse período foi avaliada a formação da zona de compatibilidade ou halo de inibição do fungo sobre o crescimento das colônias bacterianas. A compatibilidade entre os microrganismos foi classificada de acordo com os seguintes critérios: quando as hifas do fungo ultrapassaram totalmente as colônias da bactéria considerou-se alta compatibilidade (C1); quando as hifas tocaram as colônias bacterianas, sem ultrapassá-las, média compatibilidade (C1/2) e considerou-se baixa compatibilidade (C2) no caso das hifas fúngicas não tocarem nas colônias. Foram selecionadas as combinações que apresentaram alta compatibilidade para os ensaios subsequentes. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas.

2.3 Identificação do isolado fúngico F476

2.3.1. Isolamento das pontas das hifas do isolado fúngico F476

O isolamento das pontas das hifas foi obtido a partir do fungo purificado. Um disco (5 mm de diâmetro) do isolado foi transferido para placas contendo ágar-água (20 %) e incubado por dois dias a 28 °C. Ao observar a formação das

primeiras hifas fúngicas, essas estruturas foram removidas com auxílio de um bisturi esterilizado e transferidas para placas de Petri contendo meio BDA com a utilização de uma lupa. Após sete dias na estufa a 28 °C, o isolado foi utilizado na extração de DNA genômico.

2.3.2 Extração de DNA e sequenciamento

O DNA genômico do fungo foi extraído pela maceração utilizando protocolo reportado por (Santos et al., 2017). Após a maceração a extração seguiu o protocolo utilizado por (Pinho et al., 2013), utilizando o kit de purificação de DNA genômico da Promega (WizardGenomic DNA Purification Kit). O DNA eluído foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

A qualidade da extração do DNA genômico foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose em 1 %. O gel consiste em 100 mL de solução TAE 1 X e 1 g de agarose. Essa mistura foi dissolvida em forno micro-ondas e posteriormente resfriada para aplicação dos DNAs. Uma alíquota de 2 µL de cada amostra de DNA foi misturada a 3 µL de gelred e 3 µL de blue Juice e aplicados ao gel de eletroforese em tampão TAE 1X. A corrida de eletroforese foi realizada a 80 V por 1 hora. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador. Foi utilizado marcador Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 I.

As reações de amplificação foram realizadas com os primers ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3"), ITS4 (5"-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3") (White et al., 1990). As condições da reação foram as seguintes: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de Taq polimerase, 0,06 µM de primers (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, e volume final de 50 µl.

A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® Thermal Cycler, com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguido de extensão final de 3 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o sistema comercial de purificação Agencourt AMPure XP (Ambion Magnetic Stand-96). As amostras

purificadas foram enviadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil).

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNA Dragon (Hepperle 2011). Todas as sequências foram corrigidas manualmente e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas corrigidos utilizando as sequências dos primers no sentido 5'-3' e 3'-5'. As novas sequências foram depositadas no GenBank (Tabela 2) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A identificação do isolado seguiu o protocolo sugerido pela Comissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH), utilizando o programa TrichOKEY (Druzhinina et al., 2005). O isolado foi alocado na seção Longibrahium, e para a confirmação da identificação foi realizado um estudo filogenético dentro desta seção.

2.3.3 Análises filogenéticas

Regiões consenso foram comparadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa Mega BLAST. As novas sequências foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar 2004) existente no software MEGA v. 5 (Tamura et al., 2013). Espaços (Gaps) (inserções/deleções) foram tratados como inexistentes.

A análise de Inferência Bayesiana (BI) empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST (Posada e Buckley 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI.

Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). O modelo de evolução selecionado para ITS foi HKY+I+G. A análise de BI foi concluída com MrBayes v.3.1.1 (Ronquist e Huelsenbeck 2003). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 107 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1 000 gerações, resultando em 10 000 árvores. As primeiras 2 500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7 500 árvores remanescentes. A convergência dos logs de

verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (Rambaut e Drummond 2013). A árvore foi visualizada no software FigTree (Rambaut 2009) e exportada para programas gráficos. A espécie *Penicillium glabrum* SQU-QU09 foi utilizada como grupo externo (outgroup) nas análises.

Tabela 1. Isolados incluídos no estudo filogenético de fungos endofíticos.

Espécie	Isolado	Fonte	Genbank – ITS ¹
<i>T. citrinoviride</i>	B163	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KR812250
	GJS 90-140	-	X93957
<i>T. reesei</i>	ATCC 13631	-	Z31016
	IMI 192654*	<i>Gossypium hirsutum</i>	NR120297
<i>H. novaezelandiae</i>	GJS 81-264	-	X93968
	GJS 81-265	-	X93969
<i>T. andinense</i>	LESF560	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KT278909
	LESF541	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KT278891
<i>T. patella</i>	BPI GJS 91-141*	Madeira decorticada	NR134338
	GJS 91-141	-	AF487663
<i>T. poronioideum</i>	BPI GJS 01-203*	Madeira decorticada	NR134446
	GJS 01-203	Madeira decorticada	KP109821
<i>T. cerebriforme</i>	GJS 85-245	Madeira	KP109822
	BPI GJS 85-245*	Madeira	NR134447
<i>T. pseudokoningii</i>	T-KN9	Solo	LT707591
	GJS 81-300	Casca de Árvore	DQ083025
<i>T. effusum</i>	MYA-4837*	Solo	NR111833
	UFMGCB9736	Endofítico em <i>Vellozia gigantea</i>	KU727722
<i>T. ghanense</i>	HB40016	Solo	KY764894
	ATCC 208858*	Solo	NR120299
<i>T. konilangbra</i>	SD3604	Solo de plantação de Arroz	KT314324
	CY161	Ninhos de <i>Cyphomyrmex wheeleri</i>	HQ607999
<i>T. saturnisporum</i>	ATCC 28023	-	X93977
	QT22143	Solo	KY225677
<i>T. sinensis</i>	SH4206	-	JQ040381
	DAOM 230004	Casca de Árvore	HQ260623
<i>Trichoderma</i> sp. MA 3642	mms1397	Sedimentos	JQ653083
	mms852	Sedimentos	JQ653070
<i>T. orientale</i>	CBS 130428*	Toco de <i>Plagianthus</i> sp. queimado	NR111317
	LESF544	Ninhos de <i>Atta capiguara</i> vermicomposto	KT278894 MF497762
<i>T. longibrachiatum</i>	LESF009	Ninhos de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	KT278853
	CBS 816.68*	-	NR120298

¹ITS = “internal transcribed spacer”; *Espécie Tipo. O isolado obtido neste estudo está destacado em negrito.

2.4 Avaliação da capacidade das bactérias se aderirem e migrarem nas hifas do *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476

Foi testada a capacidade das bactérias migrarem de um ambiente pobre para outro rico em nutrientes para o seu estabelecimento e crescimento através do auxílio das hifas fúngicas. O método foi adaptado da técnica utilizada por Rudnik et al., (2015). Foram utilizadas placas bipartidas com compartimentos (A e

B). O compartimento (A) continha meio pobre em nutrientes (ágar-água 2 %), onde foi semeado um disco de 5 mm de diâmetro do fungo. Neste mesmo compartimento foram semeadas gotas de 2 μL da suspensão bacteriana. No compartimento (B) foi adicionado meio rico NB. Incubou-se por sete dias a 28 °C. Período este, no qual as hifas cresceram e atravessavam o anteparo dividindo os compartimentos. Avaliou se houve o crescimento das colônias bacterianas no compartimento (B). Paralelamente, foi realizada a análise em lâminas. Para realização desta análise adaptou - se a técnica do microcultivo em lâmina por Ridell (1950). Discos de 5 mm de diâmetro contendo micélio fúngico foram inoculados no centro de lâminas previamente autoclavadas a 121 °C por 15 minutos. Alíquotas de 2 μL da suspensão bacteriana (10^8 células mL^{-1}) foram inoculadas em pontos equidistantes do fungo sobre as lâminas. As lâminas foram imediatamente transferidas para o interior de placas de petri estéril forradas com papel filtro e embebidas com água destilada esterelizada para manutenção da umidade. Ao final, vedaram-se as placas de petri contendo o material e incubaram-se por sete dias a 28 °C. Utilizaram-se três repetições para cada combinação (HRC54 + F476 e UENF-22GI + F476). O controle não foi inoculado com o fungo. As amostras foram observadas em microscópio óptico de campo claro e epifluorescência.

2.5 Interação entre a bactéria *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI e o fungo *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476

Foram conduzidos ensaios em lâmina de vidro para avaliação da interação estrutural entre a *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI e o *T. longibrachiatum* isolado F476. Estes microrganismos apresentaram interação mutualística nos ensaios anteriores e foram selecionados para avaliação estrutural em lâmina de vidro. Utilizou-se a mesma técnica descrita no item 2.4. A seguir, observações do crescimento das hifas e sua interação com a colônia de bactérias foram feitas em microscópio óptico invertido Zeiss Axio 10 Observer A1 pelas técnicas de campo claro, contraste de fase e contraste diferencial e interferencial, e fotodocumentadas com câmera digital AxioCam MRC5. Nestes ensaios, a localização específica, viabilidade e atividade da bactéria na presença e ausência

do fungo foram possíveis pela visualização do pigmento avermelhado expresso na bactéria.

2.6 Influência do líquido metabólico produzido por *T. longibrachiatum* isolado F476 no crescimento das bactérias *H. seropedicae* estirpe HRC54 e *S. marcencens* UENF-22GI

O fungo foi cultivado em meio NB líquido por dez dias a 28 °C para obtenção do pré-inóculo. Após, 1 mL do fungo contendo 1×10^6 conídios/mL foram adicionados em 50 mL de meio líquido NB e incubou-se sob agitação constante por dez dias a 28 °C. Após este tempo, o meio de crescimento foi filtrado em filtro milipore 0,22 µm. Diluições crescentes do líquido metabólico filtrado em água destilada esterelizada foram utilizadas nos tratamentos: 1/100 (50 µL), 1/10 (500 µL) e 1/1 (2.500 µL) diluídos em 4,95, 4,5 e 2,5 mL de água, respectivamente. Foi utilizado o controle com 5 mL de água destilada esterelizada. Em seguida, 10 µL das suspensões bacterianas (10^8 células. mL⁻¹) foram inoculadas nos tratamentos com três repetições para cada diluição e incubadas sob agitação constante a 28 °C. O crescimento bacteriano foi mensurado no tempo de 24, 48 e 72 h por densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro de luz a 492 nm e 590 nm.

2.7 Sobrevivência das bactérias aplicadas em composto orgânico na presença e ausência do *T. longibrachiatum* isolado 476 no curso do tempo

O composto utilizado foi obtido do processo de vermicompostagem de esterco bovino. Fungo e bactérias foram ajustados em 1×10^6 esporos/mL e 1×10^8 células/mL, respectivamente. Suspensões de 100 µL bacterianas e do fungo foram inoculadas em 1 g do composto em vidros de 5 mL. Estes foram tampados com algodão e mantidos à temperatura ambiente. Os tratamentos foram os seguintes: HRC54; HRC54 + F476; UENF-22GI; UENF-22GI + F476 e controle (não inoculado). Utilizaram-se três repetições por tratamento e as amostras coletadas nos tempos de 1h, 14, 28, 56 e 112 dias após a inoculação. Utilizou-se a técnica de número mais provável (NMP) usando a tabela de Mc Crady (com três repetições por diluição) para determinar a concentração celular bacteriana ao longo do tempo.

2.8 Análises estatísticas

A análise de sobrevivência das bactérias inoculadas no composto e avaliação da relação entre o volume do líquido metabólico do isolado F476 e o crescimento bacteriano foi realizada por meio da análise de regressão linear com auxílio do programa computacional GraphPad Prisma® versão 7.

RESULTADOS

Seleção das combinações *Trichoderma* spp. e *H. seropedicae* e *S. marcescens* compatíveis em meio de cultura

Nas quatro combinações possíveis para avaliação de compatibilidade entre os dois fungos e as duas bactérias (F476 vs HRC54; F476 vs UENF-22GI; SC 1306 vs HRC54 e SC 1306 vs UENF-22GI) observou-se a compatibilidade do tipo (C1) e (C1/2). As hifas do *T. longibrachiatum* cresceram e ultrapassaram as colônias bacterianas demonstrando alta compatibilidade (C1) entre os pares de microrganismos (Fig. 1). Já as hifas do *T. harzanium* não ultrapassaram as colônias demonstrando média compatibilidade (C1/2) com as bactérias (dados não apresentados). O isolado F476 de *T. longibrachiatum* apresentou maior velocidade de crescimento em relação ao isolado SC 1306 de *T. harzanium*, crescendo por toda a placa de petri após 60 h de incubação. Portanto, foram selecionados os pares HRC54 + F476 e UENF-22 GI + F476 para os estudos subsequentes.

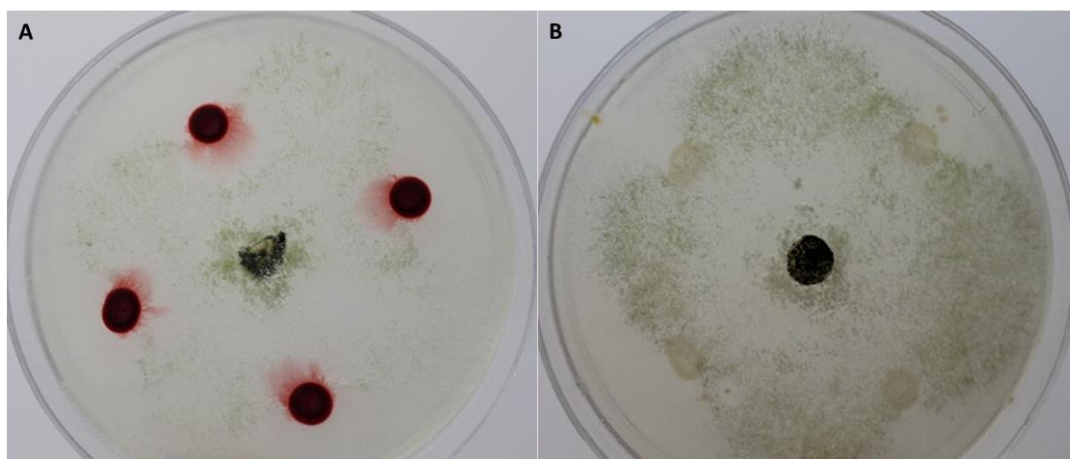


Figura 1. Placas de petri contendo meio BDA inoculadas com pares de microrganismos e incubadas por quatro dias a 28 °C. *A: Compatibilidade entre UENF – 22 GI e F476. *B: Compatibilidade entre HRC 54 e F476.

Identificação do isolado fúngico F476

A análise filogenética foi realizada com 32 táxons, e o alinhamento das sequências resultou em um total de 744 caracteres, dos quais 85 foram informativos para parcimônia, 219 foram variáveis e 475 foram conservados. Pela análise filogenética utilizando o gene ITS foi possível a identificação do isolado no clado de *T. longibrachiatum*, bem suportado ($pp = 0.96$) (Fig. 2), confirmando a identificação anterior pelo software TrichOKEY, o qual alocou o isolado em estudo na mesma seção (Fig. 2).

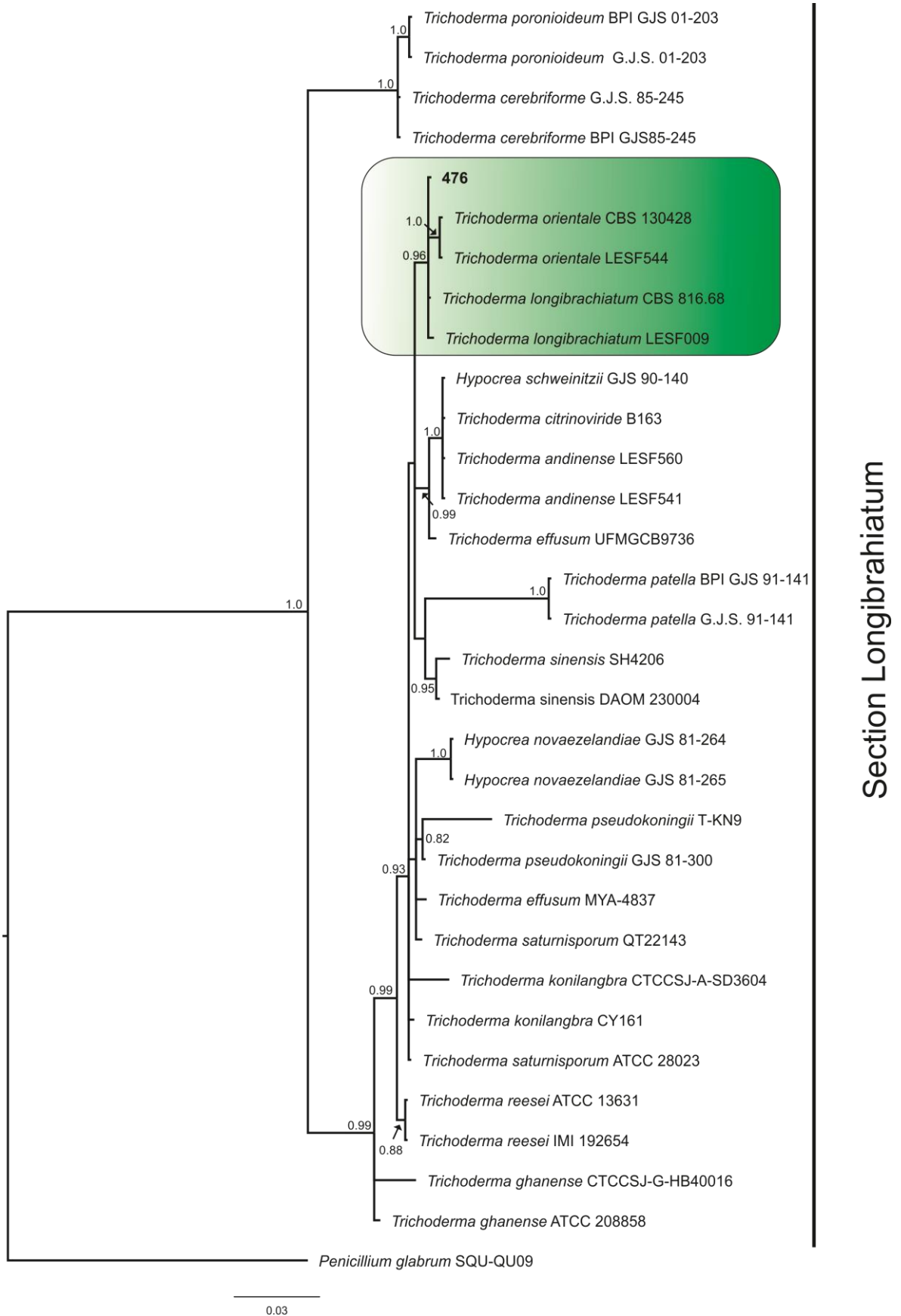


Figura 2. Filograma baseado na Inferência Bayesiana de sequências do gene ITS de isolados de *Trichoderma* sp. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Penicillium glabrum* SQU-QU09.

Avaliação da capacidade de aderência e migração das bactérias nas hifas do isolado F476 de *T. longibrachiatum*

Foi observado o crescimento das hifas do isolado F476 superando a barreira física entre os compartimentos (A) e (B), colonizando e esporulando no meio rico em nutrientes (B). As hifas ao passarem pelas colônias de ambas as estirpes bacterianas transportaram suas células do compartimento (A) para o (B) (Fig. 3 A e B). Já as bactérias inoculadas isoladamente no compartimento (A) não apresentaram mobilidade para o compartimento (B) e tiveram suas células ressecadas junto ao meio, perdendo a viabilidade (dados não apresentados). As bactérias foram capazes de aderir às hifas do isolado F476 e se dispersar no espaço, colonizando local rico em nutrientes favorável ao seu estabelecimento e crescimento (Fig. 3 D e C).

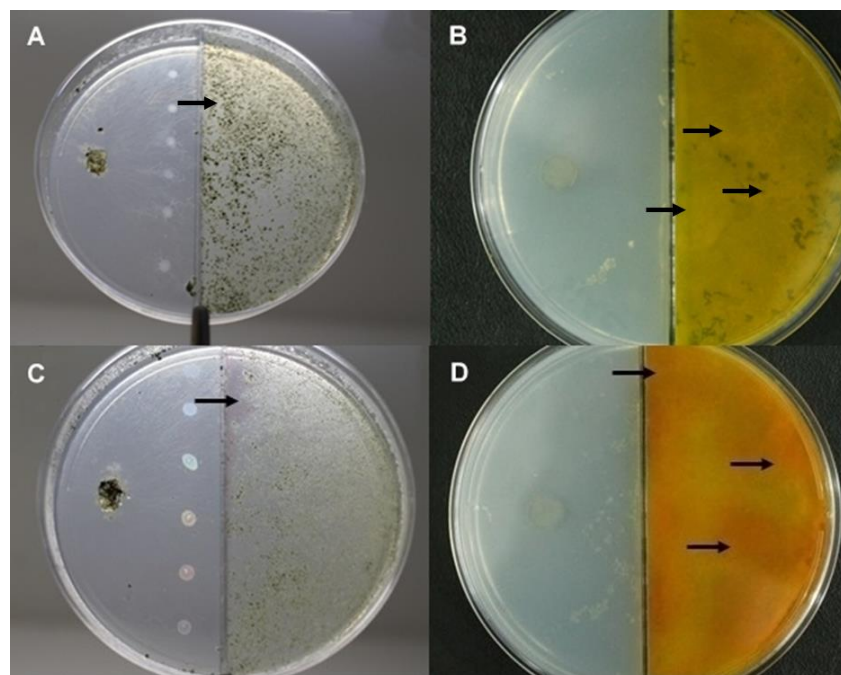


Figura 3. Dispersão das estirpes bacterianas aderidas às hifas fúngicas entre os compartimentos em 60 h de incubação a 30 °C. (A e C) Coinoculação e contato entre o isolado F476 e as estirpes HRC54 e UENF-22GI, respectivamente. (B e D) Colonização do compartimento (B) pelas estirpes bacterianas HRC54 e UENF-22GI, respectivamente. → = Dispersão bacteriana do compartimento (A) para o (B) aderida às hifas.

Foi observada a aderência das estirpes bacterianas às hifas demonstrando uma possível interação mutualística, as quais formaram agregados microbianos (Fig. 4). Nos ensaios em lâminas de vidro não existiam fontes de nutrientes para o

crescimento bacteriano e mesmo assim foi possível observar a dispersão das células bacterianas por toda lâmina em associação com as hifas do fungo (Fig. 4). Neste ensaio, também foi observada a presença de um nicho preferencial inicial de adesão, os septos das hifas, pela colonização bacteriana (Fig. 4 A e D). No controle, ausência do fungo, as células bacterianas secaram (dados não apresentados). Não foi observada nenhuma inibição do crescimento micelial do isolado F476 *T. longibrachiatum* pelas bactérias.

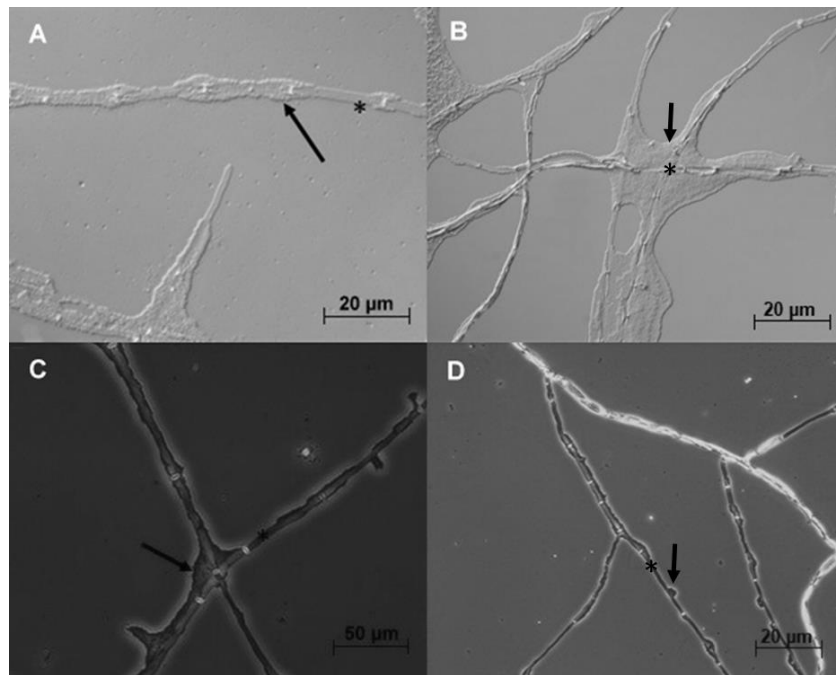


Figura 4. Aderência e dispersão das estirpes bacterianas nas hifas do isolado F476 variando de pequenos agregados a biofilmes estruturados. (A e B) Microscopia óptica de contraste diferencial e interferencial (CDI) das estirpes HRC54 e UENF-22GI, respectivamente, aderidas à superfície das hifas em pequenos agregados a biofilmes estruturados dispersados sob a lâmina. (C e D) Microscopia óptica de epifluorescência destacando as hifas e sua região septal colonizadas pelas estirpes HRC54 e UENF-22GI, respectivamente. *= Hifas do isolado F476. →= Colônias bacterianas aderidas às hifas.

Interação entre a bactéria *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI e o fungo *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476

Foi possível observar a interação mutualística entre a estirpe UENF-22GI e o isolado F476 de *T. longibrachiatum* (Fig. 5). As hifas (Fig. 5 A), ao crescerem sob as colônias (Fig. 5 B), associaram-se permanentemente com a bactéria. As hifas tornaram-se pigmentadas indicando a presença da bactéria (Fig. 5 C). Com

sete dias de interação foi evidente a adesão das bactérias à superfície da parede das hifas, com adesão preferencialmente na região septal (Fig. 5 D/E). Hifas explorando novos ambientes permaneceram associadas a agregados discretos de *S. marcescens*, em intervalos regulares coincidentes com o tipo de crescimento e septos que são, provavelmente, regiões de efluxo de metabólitos (Fig. 5 G/H). Nas regiões mais velhas os agregados bacterianos se converteram em biofilmes (Fig. 5 H/I).

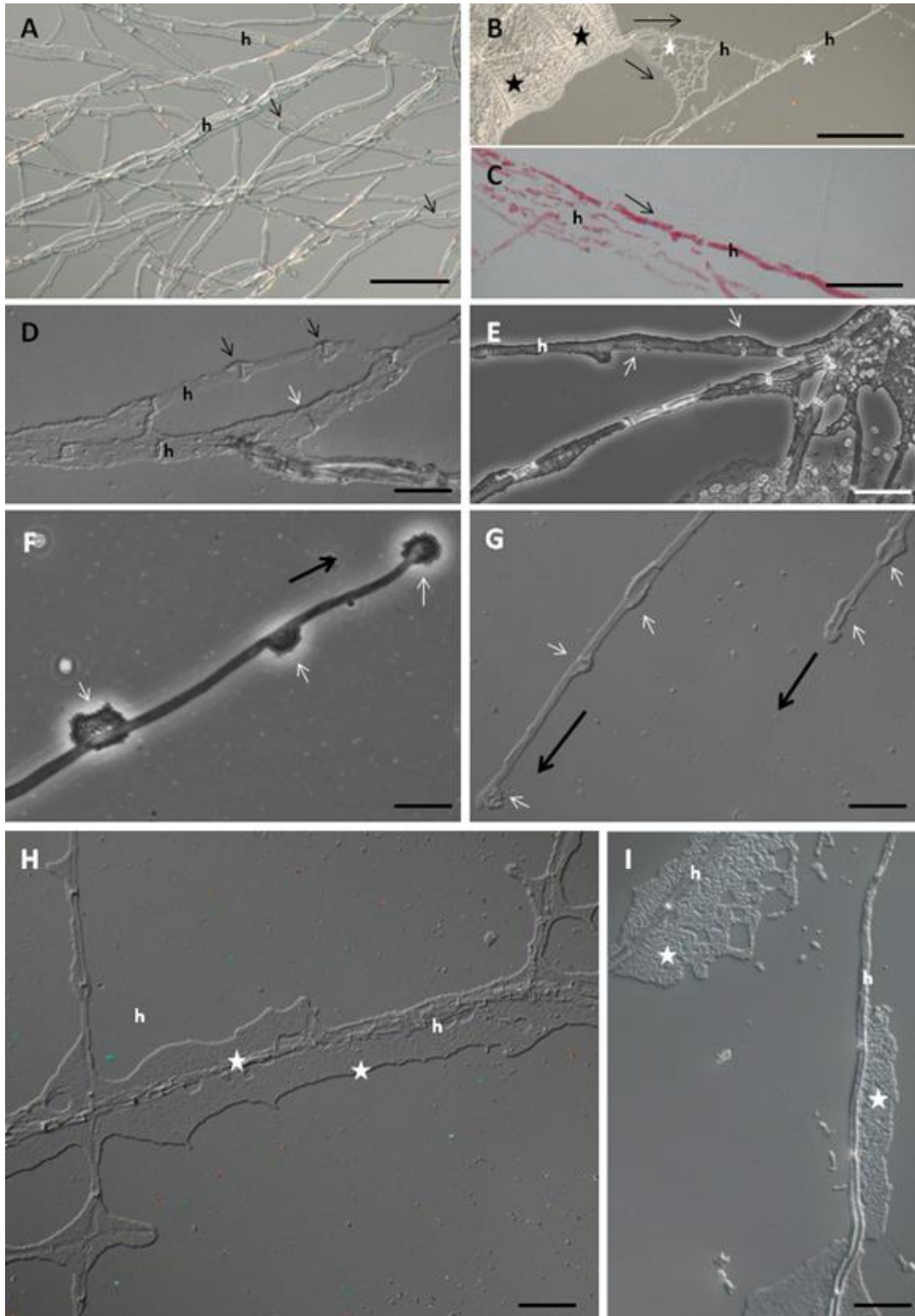


Figura 5. Microscopia óptica de campo claro (CC), contraste diferencial e interferencial (CDI) e contraste de fase (CF) da interação entre a bactéria *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI e o fungo *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 em lâmina de vidro. (A) Microscopia CDI das hifas do fungo (h) espalhando-se pela superfície da lâmina antes do contato com as colônias de UENF-22GI. (B) Microscopia CDI de hifas (h) que atravessaram colônias da bactéria (estrela branca), a partir do inóculo de UENF-22GI depositado na lâmina (estrela preta). (C) Microscopia CC evidenciando hifas em crescimento que interagiram com colônias de UENF-22GI e apresentam pigmentação avermelhada, que evidencia a presença da bactéria na superfície da parede da hifa fúngica (h). (D) Microscopia CDI dos sítios de adesão apolar específica da bactéria sobre a superfície da parede da hifa do fungo (h). Notar agregados bacterianos discretos (setas

negras) coincidentes com a região septal da hifa (seta branca). Microscopia CC evidenciando os agregados de UENF-22GI associados aos septos (setas brancas). F/G respectivamente para Microscopia CC/CDI evidenciando hifas isoladas em crescimento (setas indicam a direção do crescimento) associadas a agregados da bactéria (setas brancas) em dispersão no espaço que compreende a superfície da lâmina de vidro. H/I Microscopia CDI de hifas do fungo (h) colonizadas por biofilmes da bactéria (estrelas brancas) em sítios distantes do ponto inicial de inoculação da bactéria. Barras de escala de A-I, respectivamente iguais a 50, 150, 100, 50, 50, 15, 50, 40 e 50 μm .

Influência do líquido metabólico produzido por *T. longibrachiatum* isolado F476 no crescimento das bactérias *H. seropedicae* estirpe HRC54 e *S. marcencens* UENF-22GI

Após dez dias de crescimento do isolado F476 em meio de cultivo líquido NB, foi obtido o líquido metabólico não volátil através da filtração. Ambas as estirpes bacterianas cresceram sob doses crescentes do líquido metabólico (Fig 6). Foi observado aumento da concentração celular proporcional ao aumento das doses do líquido metabólico (Fig. 6). O volume de 2.500 μL apresentou a maior concentração celular para ambas as estirpes bacterianas. Foi demonstrado que o líquido metabólico do isolado F476 promoveu o crescimento bacteriano das estirpes aqui testadas.

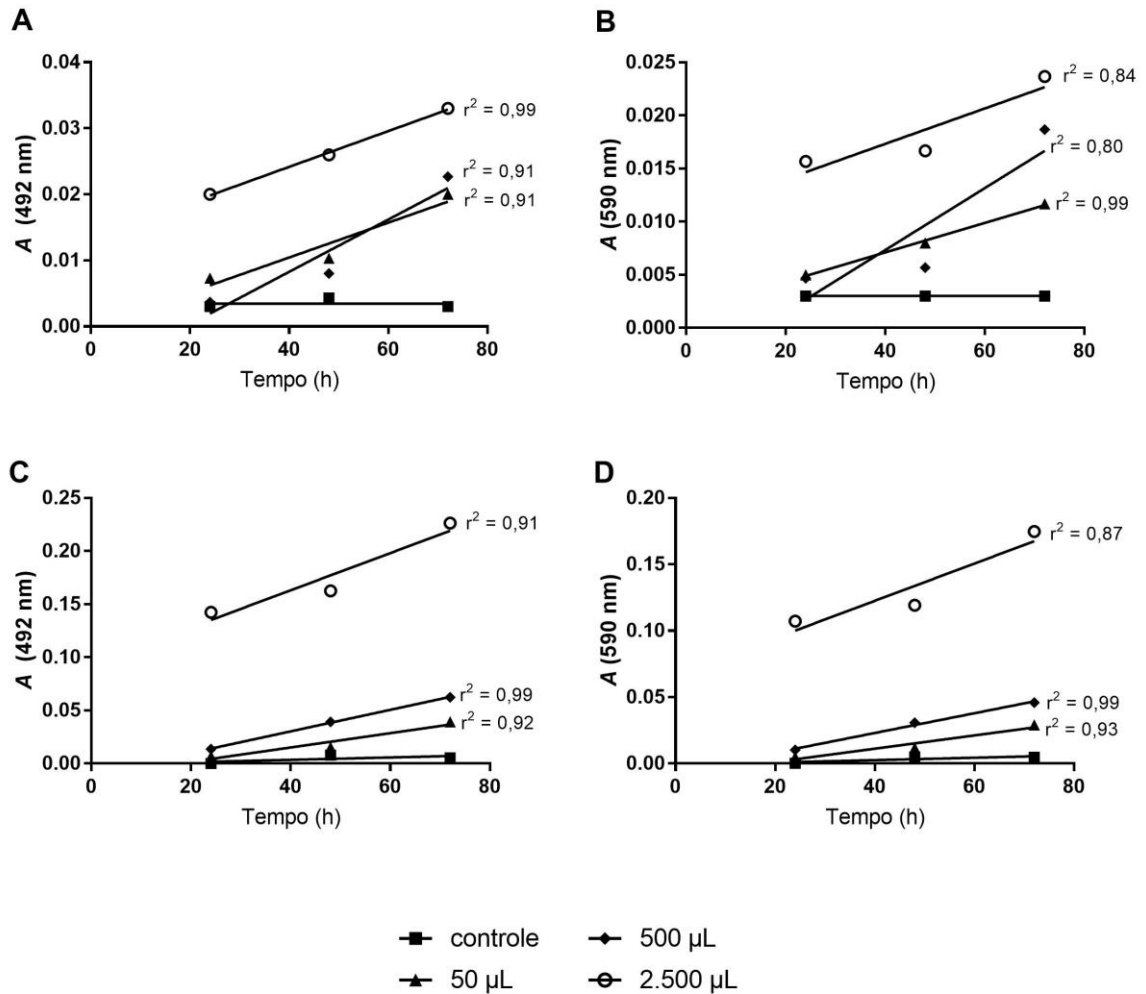


Figura 6. Conversão do líquido metabólico do isolado fúngico F476 em biomassa bacteriana. (A e B) = Concentração celular expressa em absorvância (A) da estirpe HRC 54 em leitura 492 e 590 nm, respectivamente, em espectrofômetro. (C e D) = Concentração celular expressa em absorvância (A) da estirpe UENF-22GI em leitura 492 e 590 nm, respectivamente, em espectrofômetro.

Sobrevivência das bactérias aplicadas em composto orgânico na presença e ausência do *T. longibrachiatum*

O isolado F476 influenciou a sobrevivência das bactérias. A análise de regressão revelou diferença significativa ($p < 0,05$ para UFC e $p < 0,005$ para células) na sobrevivência das bactérias quando coinoculadas com o isolado F476 em composto no curso do tempo. Até os 28 dias, o declínio das células bacterianas não diferiu entre os tratamentos. Após esse período foi observada a maior sobrevivência das bactérias quando coinoculadas com o fungo (Fig 7). Além disso, em todos os meios de cultivos utilizados para isolamento e contagem

das bactérias, houve o crescimento do F476 quando coinoculado com bactérias, demonstrando persistência de associação fungo-bactéria.

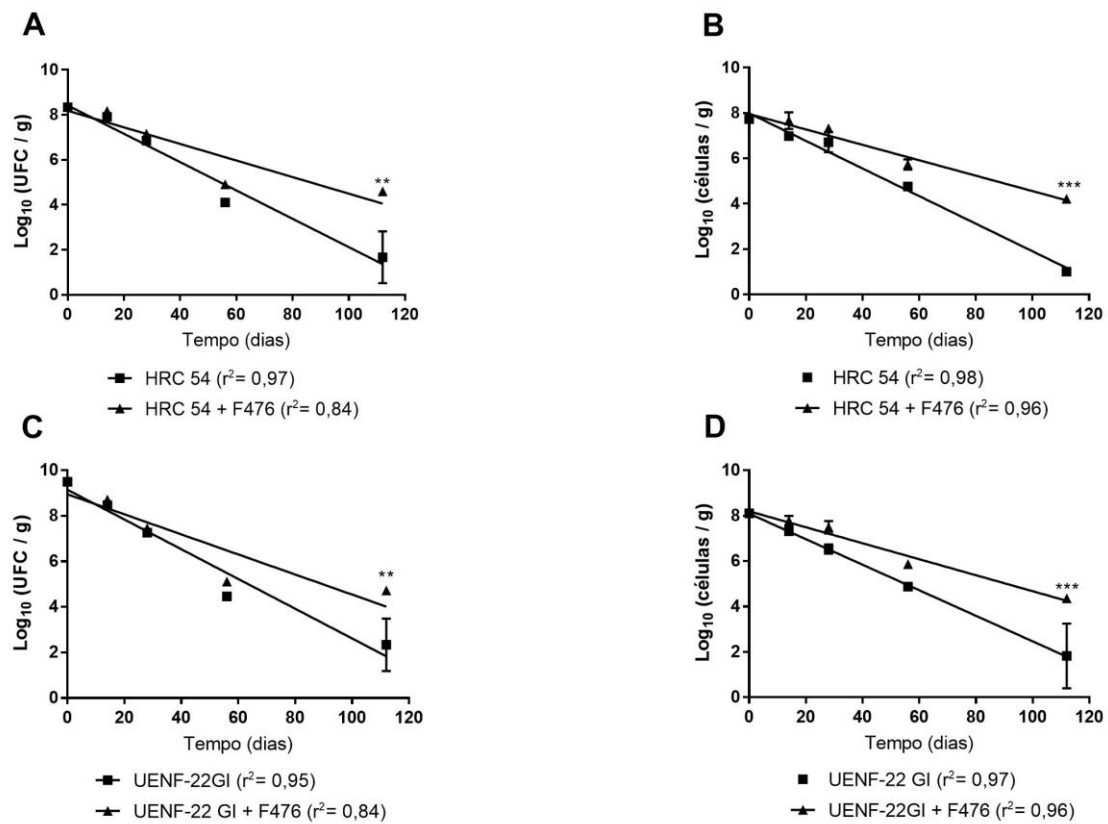


Figura 7. Sobrevivência das bactérias no curso do tempo. (A e C) UFC expressas em Log 10 para as estirpes HRC54 e UENF-22GI, respectivamente. (C e D) Concentração celular expressa em Log 10 das estirpes HRC54 e UENF-22GI, respectivamente. (**) = significância $p < 0,05$. (***) = significância $p < 0,005$.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observada uma interação mutualística entre o *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 e as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 e *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI. Em estudos prévios foi observado que *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI possui a capacidade de migrar sobre as hifas de diferentes fungos, matando-os (dados não apresentados), o que não ocorreu com o isolado F476. As interações bactéria-fungo não são bem exploradas para a formulação de inoculantes mistos. Uma condição essencial é que a coinoculação de BPVC e fungos não pode comprometer a sobrevivência dos mesmos. Bactérias pertencentes ao gênero *Serratia* possuem um histórico de estudos de ação antifúngica (Bai et al., 2016).

Mesmo em mutantes de *Serratia marcescens*, com a exclusão de genes responsáveis pela produção de quitinase, Houver et al., (2016) observaram a capacidade desse mutante em matar os fungos.

O isolado F476 cresceu em todos os meios de cultivo utilizados neste estudo, com variações nas faixas de pH e temperatura. Esse fungo também demonstrou um rápido crescimento e estabelecimento, explorando as placas de petri por completo em 60 h de incubação. Essas características do gênero *Trichoderma* e seu clado *Longibrachiatum* são sustentadas pelos trabalhos de Druzhinina et al. (2012) e Samuels et al., (2012).

Uma vez ocorrendo a interação mutualística e sinérgica entre os pares, BPCV podem se beneficiar quanto a sua introdução, estabelecimento, dispersão e crescimento nos ambientes, processos considerados importantes para o sucesso dos bioinoculantes (Mallon et al., 2015). Os fungos têm maior versatilidade metabólica por possuírem mecanismos de degradação de substratos orgânicos complexos como relatado por Kramer et al., (2016).

Foi observada a dispersão de ambas as estirpes bacterianas quando coinoculadas com o isolado F476 de *T. longibrachiatum* sem comprometer o crescimento micelial do mesmo. Observou-se a adesão e dispersão das bactérias junto às hifas em sítios pobres para ricos em nutrientes sob impedância física entre eles. Estes resultados evidenciam a contribuição do fungo na dispersão bacteriana para regiões propícias para o seu estabelecimento e crescimento. A rizosfera possui um ambiente heterogêneo com limitações à mobilidade bacteriana (Warminink e van Elsas 2009) e altamente competitivo por nutrientes (Ballhausen e de Boer 2016). Warmink e van Elsas (2009) estudaram a capacidade de uma comunidade bacteriana em migrar por microcosmos do solo através das hifas do fungo saprófito *Lyophyllum* sp. e verificaram a estruturação em biofilmes e a dispersão bacteriana junto às hifas. Estes autores, ainda evidenciaram uma correlação unilateral da migração com a presença de um gene *hrcR* responsável pela secreção de tipo III (TTSS), indicando este como âncora para a migração das bactérias pelas hifas (Warmink et al., 2011).

A adesão e dispersão de ambas as estirpes bacterianas estudadas junto às hifas foi observada por microscopia, verificando-se a preferência na região septal das hifas na colonização. Observou-se agregados microbianos circundados pela matriz EPS entre os pares de microrganismos sobre lâminas em condições

adversas para a sobrevivência bacteriana (Fig. 3). Na ausência do fungo, as alíquotas bacterianas secaram. Esses resultados indicam a cooperação metabólica de *T. longibrachiatum* com as bactérias. A capacidade de se dispersar no solo permite aos microrganismos introduzidos vantagem competitiva na captação de recursos em comparação com aqueles com pouca mobilidade. A estruturação em biofilmes mistos pode ainda fornecer vantagens nutricionais para os membros da comunidade, pois uma matrix EPS retém enzimas extracelulares gerando um sistema digestivo versátil, no qual nutrientes dissolvidos e até mesmo não solúveis podem ser capturados, armazenados e utilizados em tempo de escassez (Flemming e Wingender 2010).

Estudos demonstraram a coexistência de bactérias com fungos e a capacidade destes procaríotos se dispersarem junto com a expansão das hifas no meio (Stopnisek et al., 2016). Os autores relataram que bactérias do gênero *Burkholderia* sp. coexistem com vários fungos do solo. Quatro destes fungos foram utilizados para o teste de dispersão de quatro estirpes de *Burkholderia* sp., e observaram que três das quatro estirpes testadas foram capazes de migrar junto às hifas sem comprometer o crescimento micelial. Os autores observaram que após a migração para um meio rico para o seu crescimento, as bactérias continuaram associadas às hifas, indicando que estas lhes forneciam algo a mais. Também, relataram que a *Burkholderia glathei* foi capaz de utilizar substratos fornecidos pelos fungos, reduzindo significativamente a expressão de reguladores transcricionais relacionados à escassez de nutrientes em relação a seu cultivo isolado.

Neste estudo foi demonstrado que as bactérias foram capazes de utilizar o líquido metabólico do fungo *T. longibrachiatum* para o seu crescimento (Fig. 5). Leveau e Preston (2008) revelaram a existência de biotróficos extracelulares em que as bactérias possuem a capacidade de colonizar as hifas fúngicas vivas e obterem nutrientes de seus exsudados sem levar a morte dos fungos. A capacidade das bactérias em tolerar ou suprimir a produção de compostos antibacterianos produzidos por fungos também foi reportada mostrando que as bactérias são capazes de modular o metabolismo fúngico para a liberação de nutrientes aproveitados por elas para a conversão em biomassa. Nazir et al., (2013) verificaram que a bactéria *Burkholderia terrae* BS001, quando coinoculada com fungo, fez com que esse exsudasse maiores concentrações de compostos

pelas suas hifas. O glicerol foi a principal fonte de carbono utilizada pela bactéria. O glicerol é utilizado como aditivo nas formulações de bioinoculantes a fim de manter a sobrevivência bacteriana e sua viabilidade, pois evita o ressecamento das bactérias (Bashan et al., 2014). Seneviratne e Jayasinghearachchi (2003) observaram que tratamentos com exsudados de fungos do solo aumentaram significativamente a quantidade de UFC de *Bradyrhizobium elkani* SEMIA 5019. Utilizando dois fungos saprófitos, sendo um destes pertencentes ao gênero *Trichoderma* como o utilizado aqui nesse estudo, Rudnick et al., (2015) relataram que parte das bactérias do solo foi capaz de colonizar as hifas dos fungos e obter alimentos através destas convertendo-os em biomassa bacteriana.

Os relatos das atribuições da associação entre o *T. longibrachiatum*, isolado F476, com as bactérias *H. seropedicae* estirpe HRC54 e *S. marcescens* estirpe UENF-22GI citados acima, motivaram o estudo da coinoculação dos pares de microrganismos em composto orgânico para avaliar a sobrevivência das bactérias no tempo. A presença de *T. longibrachiatum* aumentou significativamente a sobrevivência das bactérias ao longo do tempo. Quando coinoculadas com o fungo, foi possível a detecção bacteriana na casa logaritmo acima de 10^4 tanto para UFC quanto para concentração de células mesmo 112 dias após a inoculação.

A bactéria *H. seropedicae* estirpe HRC54 utilizada nesse estudo é endofítica obrigatória e não sobrevive em solos por muito tempo na ausência da planta hospedeira (Baldani et al., 1997). Caruso e Baldani (1995) estimaram a sobrevivência de duas bactérias endofíticas obrigatórias, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae*, em solo natural e estéril. A *G. diazotrophicus* não foi detectada em 2 dias após a inoculação em solo natural, entretanto sobreviveu 10 dias em solos esterilizados. O mesmo foi revelado para *H. seropedicae*, embora tenha sobrevivido por mais tempo que a *G. diazotrophicus*. Neste estudo observaram-se resultados similares em composto natural e esterilizado (dados não apresentados). Em ambos os casos o declínio da população bacteriana foi observado após a inoculação, mas com redução somente após 28 dias nos tratamentos coinoculados com o fungo. Esse declínio inicial pode estar ligado ao tempo necessário para o estabelecimento do fungo no composto. Essa observação pode levar a proposição de um novo ensaio com a inoculação prévia do fungo em relação às bactérias. Neste mesmo contexto, as

bactérias simbiotas pertencentes ao gênero *Rhizobium*, amplamente comercializadas como bioinoculantes, na ausência da planta hospedeira, não sobrevivem por muito tempo nos solos. No entanto, estudos têm demonstrado uma maior sobrevivência destas quando coinoculadas com fungos do solo, creditando esse efeito à associação em biofilme (Seneviratne e Jayasinghearachchi 2003, 2005).

A sobrevivência das bactérias obtidas nesse estudo pode, em parte, ser justificada pela associação em biofilmes com o isolado F476 de *T. longibrachiatum*. Estudos indicam os benefícios dos biofilmes circundados pela matriz EPS (Flemming e Wingender 2010). Elvers et al., (2002) estudaram a resistência de biofilmes homo e heterogênicos de bactérias e fungos filamentosos a tratamentos de biocidas utilizados por indústrias na esterilização de equipamentos. Foi observada maior resistência das células envolvidas em biofilmes aos tratamentos com biocidas, creditando essa resistência à matriz EPS que dificulta a penetração dos compostos biocidas ou até mesmo neutralizando sua ação nas células. Oliveira et al., (2004) estudaram a influência da umidade do solo na sobrevivência de três estirpes bacterianas inoculadas, sendo duas endofíticas obrigatórias (*G. diazotrophicus* e *Azospirillum amazonense*) em contraste com uma de vida livre (*Azospirillum brasilense*). Foi observada uma redução do número de células das três estirpes bacterianas logo após serem inoculadas em solo esterilizado, porém, a redução desse declínio celular foi influenciada por um maior nível de umidade. Nadell et al., (2015) relataram que a estrutura da matriz EPS de biofilme bacteriano confere proteção contra o ataque e invasão de micróbios indesejáveis.

As interações mutualísticas em formas de biofilmes estruturados entre bactérias e fungos podem ser uma estratégia plausível para o desenvolvimento e uso de inoculantes mistos. O uso do composto orgânico inoculado com combinações fungo-bactéria na promoção do crescimento vegetal é um veículo promissor para introdução de microrganismos benéficos na agricultura.

REFERÊNCIAS

Bai Y, Eijsink VGH, Kielak AM, van Veen JA, de Boer W (2016) Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and aquatic bacteria. *Environ. Microbiol* 18: 38-49.

Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29: 911–922.

Baldotto LEB, Olivares FL (2008) Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 918-931.

Balhousem M-B, de Boer W (2016) The sapro-rhizosphere: Carbon flow from saprotrophic fungi into fungus-feeding bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 102: 14-17.

Bashan Y, Vazquez P (2000) Effect of calcium carbonate, sand, and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils. *Biol. Fertil. Soils* 30: 450-459.

Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez J-P (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 378: 1-33.

Caruso LV, Baldani JI (1995) Monitoring the survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil using Lac-Z fusion. In: *International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation*. pp 108.

Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komoń-Zelazowska M et al (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol* 42: 813–828.

Druzhinina IS, Komoń-Zelazowska M, Ismaiel A, Jaklitsch W, Mullaw T, Samuels GJ, Kubicek C (2012) Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49: 358-368.

Elvers, KT, Leeming, K, and Lappin-Scott, HM. (2002). Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29: 331-338.

Flemming, HC, and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8: 623-633.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species – Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol* 2: 43-56.

Hermosa, MR, Grondona, I, Iturriaga, EA, Diaz-Minguez, JM, Castro, C, Monte, E, Garcia-Acha, I. (2000) Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol* 66: 1890–8.

Kramer S, Dibbern D et al (2016) Resource partitioning between bacteria, fungi, and protists in the detritosphere of an agricultural soil. *Front. Microbiol* 7: 1524.

Leveau JHJ, Preston GM (2008) Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction. *New Phytol* 177: 859-876.

Mallon CA, van Elsas JD, Salles JF (2015) Microbial invasions: the process, patterns, and mechanisms. *Trends in Microbiology* 23: 719-729.

Nadell CD, Drescher K, Wingreen NS, Bassler BL (2015) Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms. *The ISME Journal* 9: 1700-1709.

Nazir R, Warmink JA, Boersma H, Van Elsas JD (2010) Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal affected soil microhabitats. *FEMS Microbiol Ecol* 71: 169–185.

Nazir R, Warmink J, Voordes D, van de Bovenkamp H, van Elsas J. (2013). Inhibition of mushroom formation and induction of glycerol release—ecological strategies of *Burkholderia terrae* BS001 to create a hospitable niche at the fungus *Lyophyllum* sp. Strain Karsten. *Microb Ecol* 65: 245–254.

Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils* 21: 197-200.

Oliveira ALM, Canuto EL, Silva EE, Reis VM, Baldani JI (2004) Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian Journal of Microbiology* 35: 295-299.

Rosado, AWC, Machado, AR, Freire, F. das CO, Pereira, OL. (2016) Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil. *Plant Dis* 561–568.

Rudnick MB, van Veen JA, de Boer W (2015) Baiting of rhizosphere bacteria with hyphae of common soil fungi reveals a diverse group of potentially mycophagous secondary consumers *Soil Biol. Biochem* 88: 73-82.

Samuels GJ, Ismaiel A, Mulaw TB, Szakacs G, Druzhinina IS, Kubicek CP, Jaklitsch WM (2012) The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity* 55: 77-108.

Santos PHD, Carvalho BM, Aguiar KP et al (2017) Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection. *Genet Mol Res* 16: 1–14.

Seneviratne, G., and Jayasinghearachchi, H. S. (2003). Mycelial colonization by bradyrhizobia and azorhizobia. *Journal of Biosciences* 28: 243-247.

Seneviratne, G., and Jayasinghearachchi, H. S. (2005). A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1975-1978.

Stopnisek N, Zühlke D et al., (2016) Molecular mechanisms underlying the close association between soil *Burkholderia* and fungi. *The ISME Journal* 10: 253-264.

Warmink JD, van Elsas JD (2009) Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2820-2830.

Warmink JA, Nazir R, Corten B, Van Elsas (2011) Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 760-765.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols*. pp 315–322.

3.2 FORTIFICAÇÃO BIOLÓGICA DE SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS DE TOMATEIRO (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) E MAMOEIRO (*CARICA PAPAYA*)

Régis Josué de Andrade Reis^(1,2), Vicente Gomes Martins⁽³⁾, Luciano Pasqualoto Canellas⁽¹⁾, Fábio Lopes Olivares^(1,2)

andrareis@yahoo.com.br *; vicente.gomes@iff.edu.br; lucianocanellas@gmail.com; fabio.olivares@gmail.com

¹Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamego 2000, 28013-602 Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

²Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, UENF. Av. Alberto Lamego 2000, 28013-602 Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

³Setor de Agroecologia, Instituto Federal Fluminense – *campus* Avançado de Cambuci. Estrada Cambuci – Três irmãos, Km 05, 28430-000 Cambuci, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

A transformação de resíduos sólidos de origem animal e/ou vegetal, por meio da vermicompostagem, em adubos e substratos promove a destinação adequada desses potenciais contaminantes, evitando a poluição ambiental. O enriquecimento de substratos à base de vermicompostos com microrganismos promotores do crescimento vegetal apresenta potencial em função da facilidade de manejo da inoculação. O objetivo desse estudo foi avaliar distintos substratos formulados com vermicomposto e enriquecidos com microrganismos promotores de crescimento na produção de mudas de tomateiro e mamoeiro. Foi utilizado vermicomposto de esterco bovino em proporções de 0, 25, 50, 75 e 100 % diluídos em substrato comercial Basaplant® e/ou areia para a seleção do substrato com maiores rendimentos para mudas do tomateiro. O substrato de melhor desempenho selecionado foi confrontado com o substrato comercial Basaplant® para o crescimento de mudas de mamoeiro. Suspensões contendo 10^8 cel/mL das bactérias *Serratia marcescens* estirpe UENF 22 GI e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54, 10^6 conídios/g de arroz do fungo *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 foram inoculadas na taxa de 1 mL e 1 g de arroz por kg^{-1} do substrato selecionado. Os microrganismos foram testados em cultivos isolados e combinados em pares fungo-bactéria (F476 + UENF-22GI e F476 + HRC 54). Verificaram-se aumentos significativos na produção das mudas quando utilizado o substrato formado por 50 % de areia e 50 % de vermicomposto de esterco bovino. A coinoculação do substrato com fungo-bactérias aumentou significativamente o crescimento das mudas, com destaque para a combinação F476 + HRC54 que propiciou rendimentos entre 171 e 230 % e 72 e 69 % para massa seca da parte aérea e raízes do tomateiro e mamoeiro, respectivamente. Substratos orgânicos à base de vermicompostos coinoculados com fungos e bactérias demonstraram ser uma alternativa viável para os viveiricultores uma vez que as mudas apresentaram-se mais vigorosas e com crescimento acelerado que, possivelmente, diminuirá o estresse no transplante para o campo.

PALAVRAS-CHAVE: Vermicompostos; *Serratia marcescens*; *Herbaspirillum seropedicae*.

ABSTRACT

The transformation of solid animal and/or vegetal waste, through vermicomposting, into fertilizers and substrates promotes the adequate destination of these potential contaminants, avoiding environmental pollution. The enrichment of substrates based on vermicompost with plant growth promoting microorganisms has potential due to the ease of inoculation management. The objective of this study was to evaluate different substrates formulated with vermicompost and enriched with growth promoting microorganisms in the production of tomato and papaya seedlings. Bovine manure vermicompost was used in proportions of 0, 25, 50, 75 and 100% diluted in Basaplant® commercial substrate and/or sand for the substrate selection with higher yields for tomato seedlings. The selected best performance substrate was compared to the commercial substrate Basaplant® for the growth of papaya seedlings. Suspensions containing 10^8 cells/mL of the *Serratia marcescens* strain UENF 22 GI and *Herbaspirillum seropedicae* strain HRC 54, 10^6 conidia/g of rice of the fungus *Trichoderma longibrachiatum* isolated F476 were inoculated at the rate of 1 mL and 1 g of rice per kg^{-1} of selected substrate. The microorganisms were tested in culture isolates and combined in fungal-bacterial pairs (F476 + UENF-22GI and F476 + HRC 54). Significant increases in seedlings production were observed when the substrate composed of 50% sand and 50% bovine manure vermicompost was used. The co-inoculation of the substrate with fungus-bacteria significantly increased seedling growth, especially the F476 + HRC54 combination that yielded yields between 171 and 230% and 72 and 69% for shoot dry matter and tomato and papaya roots, respectively. Organic substrates based on vermicompost co-inoculated with fungi and bacteria have proven to be a viable alternative for nursery farmers since the seedlings presented greater vigor and accelerated growth that will possibly reduce the transplant stress to the field.

KEYWORDS: Vermicomposts; *Serratia marcescens*; *Herbaspirillum seropedicae*.

INTRODUÇÃO

A transformação de resíduos sólidos de origem animal e/ou vegetal, por meio da vermicompostagem, em adubos e substratos promove a destinação adequada desses potenciais contaminantes, evitando a poluição ambiental. O desenvolvimento de substratos alternativos eficientes para produção de mudas a partir de recursos locais oportuniza a reciclagem de subprodutos. A redução do uso e até mesmo a substituição de substratos comerciais à base de turfa por vermicompostos (VCs) já foi relatada com êxito (Zaller 2007, Arancon et al., 2008; Lazcano et al., 2009), sendo esta importante demanda no nicho de mercado para atender a produção orgânica.

Vermicomposto (VC) é o produto da transformação de resíduos orgânicos em matéria orgânica estabilizada pela ação conjunta de minhocas e microrganismos (Edwards e Burrows, 1988). Por apresentarem boa porosidade, boa capacidade de retenção de água, elevada atividade microbiana, quantidades satisfatórias de nutrientes essenciais para plantas, tem havido interesse nestes na utilização para a produção de mudas e na fertilização orgânica na agricultura (Edwards e Burrows, 1988; Arancon et al., 2008; Olivares et al., 2015; Canellas et al., 2015).

Os VCs podem apresentar altas concentrações de fitormônios produzidos pela atividade microbiana e apresentam concentrações relativamente altas de ácidos do tipo húmicos com elevada atividade biológica (Canellas et al., 2002). Essas características fazem com que as mudas apresentem maiores volumes de raízes, colmos mais grossos, maiores números de folhas, ou seja, mudas vigorosas mais resistentes às condições de estresse ao serem transplantadas para o campo (Lazcano et al., 2009). Além disso, os VCs podem induzir resistência às plantas contra fitopatógenos (Singh et al., 2003, Zaller, 2006, Serfoji et al., 2010).

Microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV), como bactérias e fungos, vêm sendo isolados de diversos ambientes e sua característica quanto à promoção do crescimento está amplamente divulgada (Harma et al., 2004; Vivanco-Calixto et al., 2016). Entretanto, são raros os inóculos mistos e os microrganismos vêm sendo utilizados de forma isolada.

Seneviratne et al. (2008) revisaram trabalhos com a aplicação biotecnológica da coinoculação de fungos-bactérias na promoção do crescimento vegetal. A aplicação de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) em VCs e/ou seus produtos foi revisada por Olivares et al. (2017). No entanto, a combinação entre bactérias e fungos inoculados em substratos orgânicos a base de VCs para a produção de mudas na viveiricultura não foi explorada. O objetivo deste trabalho foi formular e avaliar diferentes substratos à base de vermicomposto de esterco bovino enriquecidos com a MPCV para produção de mudas do tomateiro e mamoeiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos e avaliação dos substratos na produção de mudas do tomateiro (*Solanum lycopersicum*)

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Instituto Federal Fluminense (IFF) *Campus* Avançado de Cambuci, no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (Nudiba) e no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Foram utilizadas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 % de vermicomposto diluído em porcentagens por volume com substrato comercial Basaplant® (SCB) e/ou areia lavada de rio para confecção dos substratos em análise da produção de mudas do tomateiro (Santa Cruz, kada gigante). O vermicomposto utilizado foi oriundo do processamento de esterco bovino (VB), recolhidos do curral do setor de zootecnia do campus do IFF, por minhocas (*Eisenia fetida*). A Tabela 1 apresenta as características químicas do VB e do SCB.

Tabela 1. Características químicas do substrato comercial Basaplant® (SCB) e do vermicomposto de esterco bovino (VB).

Substratos	pH	g/Kg					C %	mg/Kg			
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg		Fe	Cu	Zn	Mn
SCB	4,4	8,47	4,34	1,22	7,64	2,13	12,8	7216	40	80	130
VB	6,3	17,5	8,14	13,82	10,87	8,42	29,2	9775	26	130	660

O desenho experimental utilizado foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos e oito repetições. Os tratamentos foram os seguintes: T1= 75 % SCB + 25 % VB; T2= 50 % SCB + 50 % VB; T3= 25 % SCB + 75 % VB; T4= 100% VB; T5= 75 % areia + 25 % VB; T6= 50 % areia + 50 % VB; T7= 25 % areia + 75 % VB e um controle com 100 % SCB. Foram semeadas sementes de tomate em vasos plásticos com capacidade de 0,5 L. Para obtenção do percentual de germinação foram semeadas cinco sementes por repetição/vaso. A avaliação da germinação foi realizada no décimo dia após a semeadura. Após, foi realizado o desbaste deixando apenas uma plântula por vaso. Aos 30 dias após a semeadura as mudas foram colhidas para avaliação da altura da parte aérea e massa seca da parte aérea e das raízes. Na determinação da altura das mudas, foi usada uma régua graduada em centímetro, tomando como referência a distância do colo ao ápice da muda. A parte aérea e o sistema radicular foram secos em estufa com circulação de ar forçada à temperatura de 65°C por 72 h e em seguida determinou o peso em mg/planta.

2.2 Microrganismos utilizados e seus cultivos

Foram selecionadas duas bactérias (estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* e estirpe UENF-22GI de *Serratia marcescens*) e um fungo (isolado F476 de *Trichoderma longibrachiatum*) provenientes da coleção do LBCT da UENF. Para crescimento e manutenção das bactérias foram utilizados meios de cultura líquido (8 g de caldo nutritivo, NB) e sólido (8 g de NB e 15 g de ágar). Em meio líquido, o crescimento foi sob agitação constante por 48 h a 30 °C. Em meio sólido foram feitas estrias das culturas em placas de petri e incubadas por 24 h a 30 °C. Já o fungo foi cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias em B.O.D. a 28 °C.

2.3 Quantificação da produção de compostos indólicos pelos microrganismos isolados e suas combinações (*H. seroedicae* + *T. longibrachiatum* e *S. marcences* + *T. longibrachiatum*)

As estirpes bacterianas HRC54 e UENF-22GI e o isolado F476 foram cultivados previamente em tubos de ensaio com 5 mL de meio líquido DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986) por 24 h a 30 °C sob agitação constante. Suspensões de 25 µL dos isolados foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS com e sem a adição de triptofano (100 µL da solução estoque de 100 mg.L⁻¹ em água destilada e filtrada em membrana millipore 0,2 µm, armazenada no escuro em geladeira). Os tubos de ensaio foram incubados no escuro por 72 h a 30 °C sob agitação constante. Para a avaliação da produção de compostos indólicos (Sarwar e Kremer, 1995), 150 µL dos isolados foram transferidos para uma microplaca de poliestireno de 96 poços, sendo adicionados 100 µL do reagente de Salkowsky (1 mL FeCl₃.6H₂O (0,5 mol L⁻¹) em 50 mL de ácido perclórico HClO₄ (35 % em água), com um período de incubação de 30 minutos no escuro. Foi realizada a leitura no espectrofotômetro Hidex Chameleon Multilabel Detection Platform com absorvância de 492 nm pelo programa MikroWin 2000. Para a construção da curva de calibração, foi utilizada uma solução de 2000 µM de ácido indol acético (AIA) (0,0350 g de AIA sintético em 100mL de água destilada, sendo o AIA dissolvido previamente em gotas de álcool 70°). Concentrações crescentes de 0 µM a 200 µM de AIA (Reis-Junior et al., 2004) diluídas em meio DYGS foram utilizadas para a construção da curva de calibração. A concentração foi dosada através da curva de calibração, relacionando absorvância e concentração de AIA. Foi quantificada a produção de compostos indólicos para os microrganismos isolados e em combinações fungo-bactérias. Os tratamentos seguiram a seguinte ordem: T1 = *T. longibrachiatum*; T2 = *S. marcescens*; T3= *S. marcescens* + *T. longibrachiatum*; T4= *H. seropedicae*; T5= *H. seropedicae* + *T. longibrachiatum*. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

2.4 Análise *in vitro* da capacidade de solubilização de fosfato pelos microrganismos isolados e suas combinações (*H. seropedicae* + *T. longibrachiatum* e *S. marcescens* + *T. longibrachiatum*)

Foi testada a capacidade de solubilizar P de diferentes fontes pelos microrganismos conforme os tratamentos da seção anterior. Para tanto, suspensões de 100 µL de cada um dos microrganismos individuais e suas

combinações foram transferidas para tubos de ensaio de 50 mL contendo meio líquido Pikovskaya, suplementado com 1 g L^{-1} de fosfato de cálcio tribásico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (FC) ou com 1 g L^{-1} fosfato de rocha Araxá (FA). Os tubos permaneceram sob agitação constante no agitador orbital a 150 rpm durante dez dias a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, foram centrifugados a 3200 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi usado para a quantificação dos níveis de fósforo solúvel pelo método colorimétrico do molibdato de amônio, com leitura da absorbância a $\lambda = 600 \text{ nm}$.

2.5 Promoção do crescimento de mudas do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e mamoeiro (*Carica papaya*)

Diante dos resultados das análises da seção 2.1, foi selecionado o substrato T6 (50 % de areia + 50 % de VB) para os ensaios subsequentes. Foi avaliada a promoção do crescimento das mudas pelos microrganismos isolados e suas combinações. O desenho experimental utilizado foi o DIC com seis tratamentos e sete repetições. Os tratamentos foram os seguintes: T1= controle não inoculado; T2 = *T. longibrachiatum*; T3= *S. marcescens*; T4= *S. marcescens* + *T. longibrachiatum*; T5= *H. seropedicae*; T6= *H. seropedicae* + *T. longibrachiatum*. Nas análises com o mamoeiro foi utilizado um segundo controle (T0 = Substrato comercial Basaplant®), visto que não ocorreram análises prévias para a espécie confrontada com o substrato T6 selecionado no ensaio com o tomateiro. Os microrganismos foram aplicados utilizando o arroz integral como veículo de inóculo, previamente esterilizado por 15 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ três vezes no intervalo de 24 h para cada autoclavagem. Placa de BDA crescida previamente com o *T. longibrachiatum* isolado F476 foi lavada com 500 mL de água destilada esterilizada, obtendo assim esporos e micélios do fungo em suspensões, sendo inoculadas em 500 g do arroz em sacos de polietileno. Incubou-se o arroz por 15 dias a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Em intervalos de 24 h foram feitas agitações do saco de arroz para o crescimento homogêneo do isolado F476. Em 1 g do arroz com aproximadamente 1×10^6 conídios/g adicionou-se 1 mL das suspensões bacterianas (10^8 células. mL^{-1}), obtendo assim os inóculos mistos. Foram semeadas as sementes conjuntamente com os inoculantes no substrato em tubetes de volume 280 cm^3 . Os controles receberam a mesma porção de arroz esterilizado não inoculado. As sementes do tomateiro foram as mesmas da seção 2.1 e a do mamoeiro foi a

Caliman-01. As mudas foram coletadas em 20 e 25 dias para o tomateiro e mamoeiro, respectivamente, após a semeadura para determinação do peso da massa fresca e seca da parte aérea e da raiz em mg/planta. Utilizou-se estufa com circulação de ar forçada à temperatura de 65 °C por 72 h para obtenção do material seco.

2.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Fisher's LSD em 95 % de confiança para análises dos substratos e Tukey em 95 % de confiança para as demais análises, utilizando o programa computacional GraphPad Prisma® versão 7.

RESULTADOS

Avaliação dos substratos na produção de mudas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Foi observada diferença na porcentagem de germinação entre os tratamentos. O T3 (25 % SBC + 75 % VB) diminuiu significativamente a porcentagem de germinação (Fig. 1 A).

Os substratos com 100 e 50 % de VB diluído em areia proporcionaram, em relação aos demais tratamentos, aumento na altura das plantas e na massa seca da parte aérea e raiz de mudas de tomate (Fig 1 B, C e D). O T6 (50 % VB + 50 % areia) aumentou significativamente ($p < 0,0001$) os parâmetros analisados em 50, 35 e 147 % para altura, massa seca da parte aérea e da raiz, respectivamente, em relação ao SCB. O T6 manteve-se entre as maiores médias em todas as análises, sendo assim selecionado para os ensaios subsequentes.

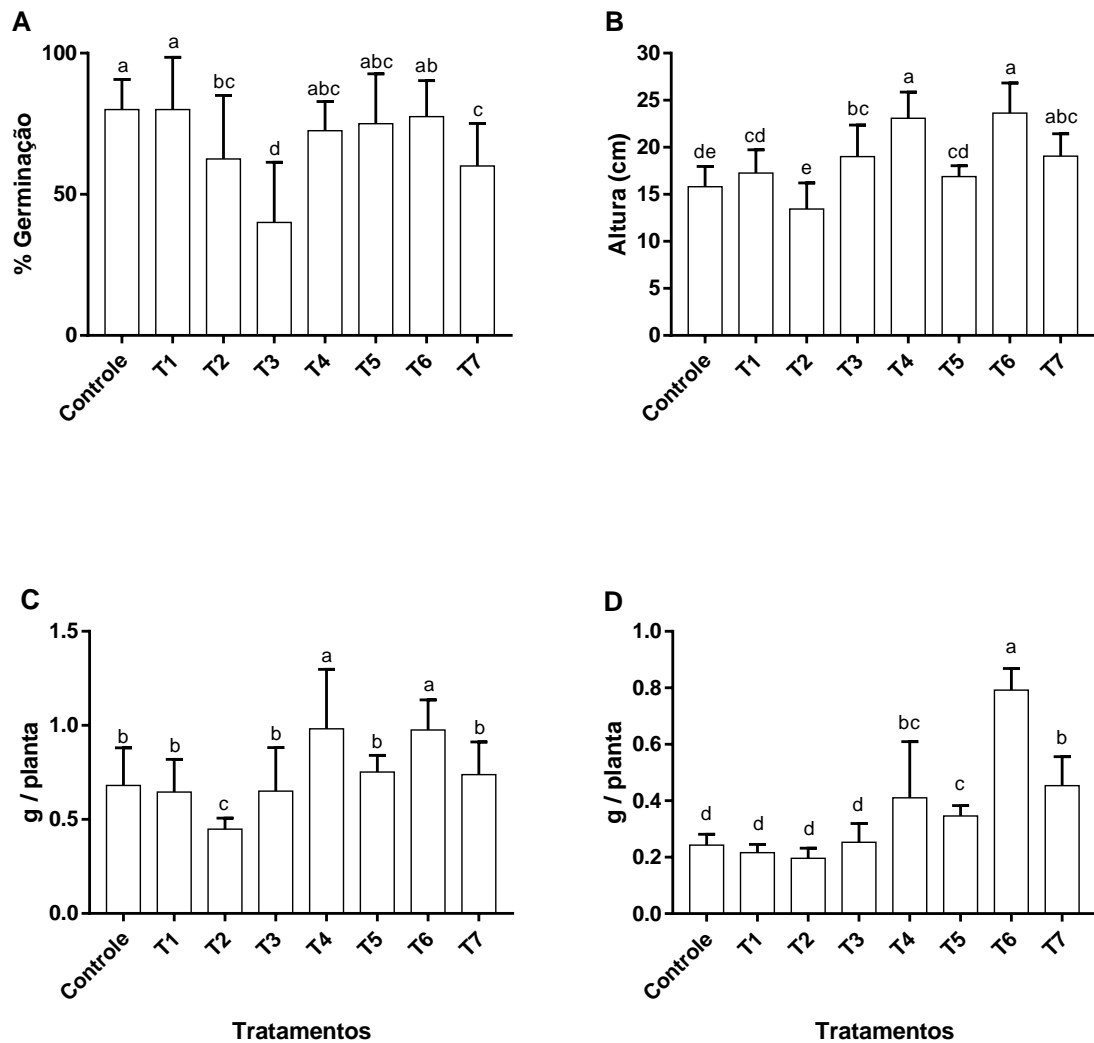


Figura 1. Características associadas ao crescimento das mudas de tomateiro em diferentes substratos a base de Substrato comercial Basaplant® (SCB), Vermicomposto de esterco bovino (VB) e areia. Controle = 100 % Substrato comercial Basaplant®; T1= 75 % SCB + 25 % VB; T2= 50 % SCB + 50 % VB; T3= 25 % SCB + 75 % VB; T4= 100% VB; T5= 75 % areia + 25 % VB; T6= 50 % areia + 50 % VB; T7= 25 % areia + 75 % VB. A = Percentual de germinação. B = Altura das plantas. C = Massa seca da parte aérea. D = Massa seca da raiz. As colunas seguidas pela (s) mesma (s) letra (s) não diferem entre si ($p < 0,05$).



Figura 2. Imagem ilustrativa das mudas de tomateiro tratadas com o T6 (50 % areia + 50 % vermicomposto de esterco bovino) em contraste com o controle (Substrato comercial Basaplant®).

Produção de compostos indólicos e solubilização de P

Foi observado que os microrganismos isolados ou em pares apresentaram capacidade de produzir compostos indólicos na presença ou não de triptofano (Fig. 3 A). As combinações entre o fungo e as bactérias (F476 + UENF-22GI e F476 + HRC54) aumentaram as concentrações de compostos indólicos com destaque para a combinação F476 + UENF-22GI (T3), que produziu, significativamente, maiores concentrações desses compostos em comparação com os demais (Fig 3 A).

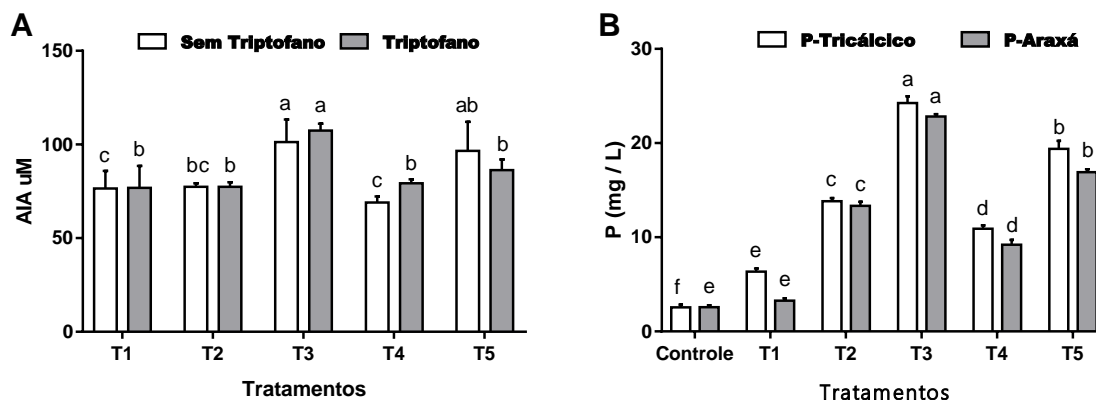


Figura 3. Características funcionais na promoção do crescimento vegetal. A= produção de compostos indólicos. B= Concentração de P solúvel. Controle = não inoculado. T1 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476. T2 = *Serratia marcescens* estirpe UENF-22Gl. T3 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476 + *Serratia marcescens* estirpe UENF-22Gl. T4= *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54. T5 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476 + *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54.

O fungo isolado F476 em cultivo isolado (T1) não apresentou capacidade de solubilização de P. As combinações entre fungo e bactérias (T3 e T5) apresentaram maiores médias de solubilização de ambas as fontes de fosfato em relação aos seus cultivos isolados, com aumentos significativos na concentração de P solúvel para o T3 em comparação aos demais tratamentos (Fig 3. B).

Promoção do crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e mamoeiro (*Carica papaya*)

O substrato selecionado no ensaio anterior, T6 (50 % areia + 50 % VB), foi inoculado com os microrganismos para avaliar a promoção do crescimento de plantas de tomateiro e mamoeiro. A coinoculação das combinações entre o fungo e as bactérias apresentou aumentos em todas as características vinculadas ao crescimento de mudas de tomateiro e na massa fresca e seca das raízes de mamoeiro (Fig. 4 e 5). A coinoculação, F476 e HRC54 (T6), apresentou médias significativamente maiores para todas as variáveis analisadas neste estudo (Fig. 4 e 5). Para as mudas de tomateiro a coinoculação F476 e HRC54 (T6) aumentou os rendimentos em 247, 298, 176 e 230 % (Fig. 4) e para mudas de mamoeiro 81, 86, 64 e 71 % em relação ao T1, sem inóculo, para massa fresca da parte aérea e raiz e massa seca da parte aérea e raiz, respectivamente (Fig. 5). Para as mudas de mamoeiro tratadas com 50 % de VB + 50 % de areia (T1) foi possível observar

aumentos significativos de 137, 135, 65 e 132 % para massa fresca e seca da parte aérea e raiz, respectivamente, em comparação com o controle SCB (T0), ambos sem inóculo (Fig. 5).

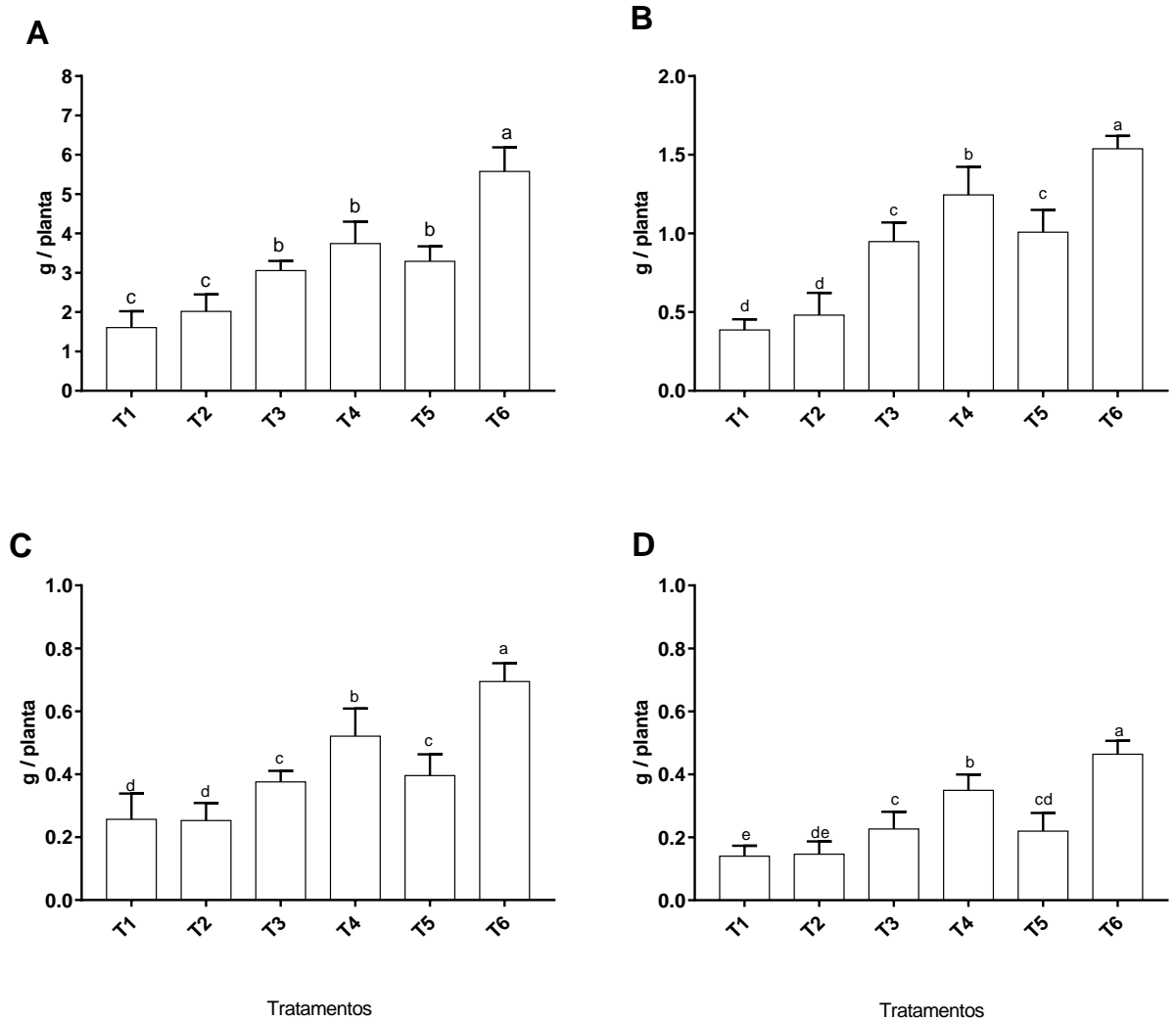


Figura 4. Características associadas ao crescimento das mudas de tomateiro em substrato enriquecido com microrganismos. T1 = não inoculado. T2 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476. T3 = *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI. T4 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476 + *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI. T5 = *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54. T6 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476 + *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54. Massa fresca da parte aérea (A) e da raiz (B). Massa seca da parte aérea (C) e da raiz (D). As colunas seguidas pela (s) mesma (s) letra (s) não diferem entre si significativamente ($p < 0,05$).

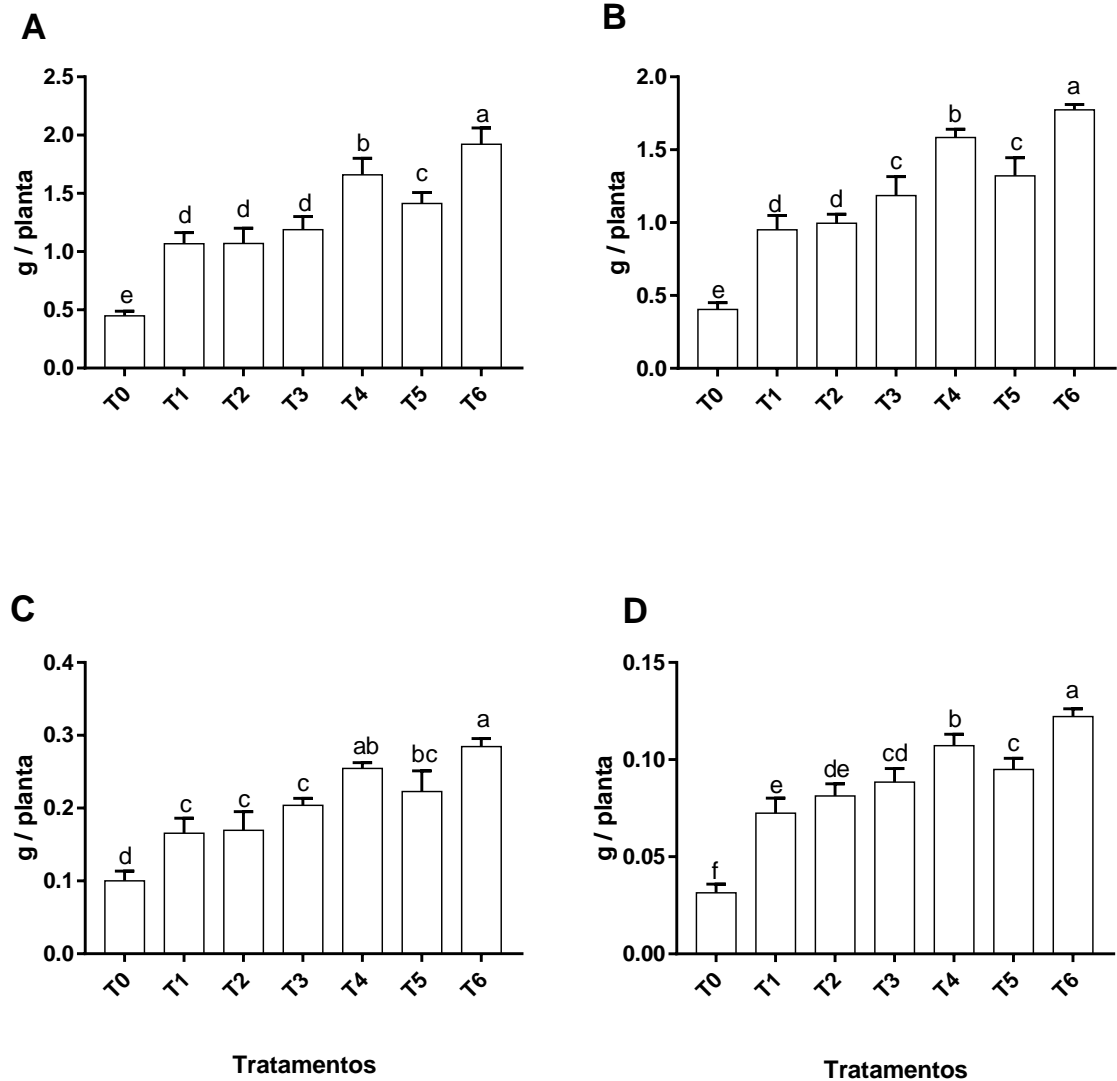


Figura 5. Características associadas ao crescimento das mudas de mamoeiro em substrato enriquecido com microrganismos. T0 = Substrato comercial Basaplant®. T1 = não inoculado. T2 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476. T3 = *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI. T4 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476 + *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI. T5 = *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54. T6 = *Trichoderma longibrachiatum* cepa F476 + *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54. Massa fresca da parte aérea (A) e da raiz (B). Massa seca da parte aérea (C) e da raiz (D). As colunas seguidas pela (s) mesma (s) letra (s) não diferem entre si significativamente ($p < 0,05$).

A Figura 6 mostra o contraste de vigor entre as mudas de tomateiro não inoculadas (T1) e coinoculadas com *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 (T6). Já a Figura 7 ilustra o contraste entre o substrato selecionado não inoculado (T1) e o coinoculado com *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 (T6) em relação ao controle do substrato comercial Basaplant não inoculado (T0).

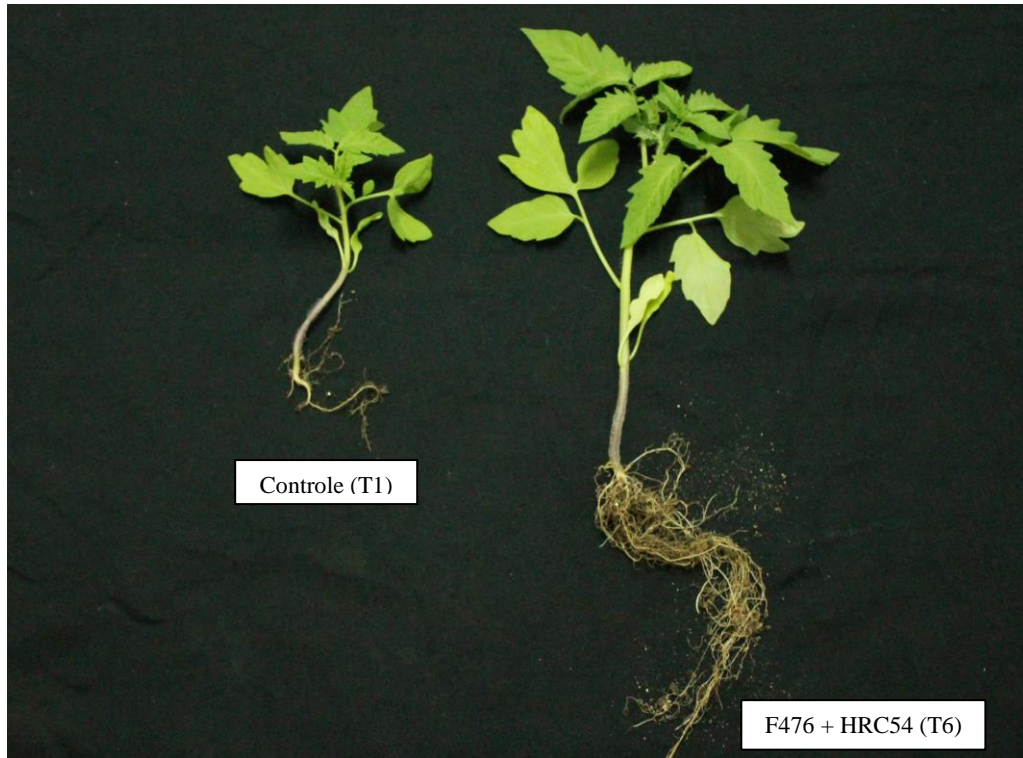


Figura 6. Imagem ilustrativa do contraste de crescimento das mudas de tomateiro entre os tratamentos T1 (não inoculado) e o T6 (*Trichoderma longibrachiatum* cepa F476 + *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54).



Figura 7. Imagem ilustrativa do contraste de crescimento das mudas de mamoeiro entre os tratamentos T0 (Substrato comercial Basaplant®) T1 (não inoculado) e T6 (*Trichoderma longibrachiatum* cepa F476 + *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54).

DISCUSSÃO

Nossos resultados evidenciaram que a diluição de 50 % de VC de esterco bovino em areia aumentou significativamente a altura, massa seca da parte aérea e das raízes de mudas de tomateiro em relação ao substrato comercial Basaplant®. Este substrato também foi testado para mudas de mamoeiro onde foram observados aumentos significativos para todos os parâmetros de crescimento analisados em relação ao controle com o SCB. Corroborando, o estudo realizado por Lazcano et al., (2009), observou que as diluições de 50, 75, 100 % de VC em substratos comerciais à base de turfas aumentaram significativamente a biomassa da parte aérea e da raiz das mudas de tomateiro. Resultados demonstram que a adição de VC promove o crescimento de

diferentes plantas como observado em estudos (Arancon et al., 2004; Arancon et al., 2008; Joshi e Vig, 2010).

As Figuras 2 e 7 apresentam a diferença visual das mudas tratadas com VC e areia para com as tratadas com o SCB, demonstrando um condicionamento físico aparente de melhor estado nutricional para as mudas tratadas com VC e areia. Já foram diagnosticadas melhorias no estado nutricional de plantas quando VC ou derivados, como as substâncias do tipo húmicas, são aplicados. Vaidyanathan e Vijaylakshmi (2017) observaram que o VC aumenta a disponibilidade de nutrientes, resultando em rápida absorção e conseqüentemente aumentando os parâmetros de crescimento e rendimento das plantas de tomateiro. As substâncias do tipo húmicas presentes nos VCs aumentam a capacidade de absorção de nutrientes e melhoram o metabolismo das plantas, ainda, estimulam o crescimento de raízes laterais (Canellas et al., 2015).

A germinação das sementes de tomateiro diminuiu significativamente com o aumento da concentração de VC diluído no substrato comercial. Levinsh (2011) relatou que diluições de VCs em substrato comercial também retardaram ou inibiram a germinação de algumas culturas de acordo com a concentração utilizada. Para rabanete, repolho, nabo sueco, beterraba, feijão e ervilha a diluição de 30 a 50 % de VC resultou na inibição de até 50 % da germinação. Contudo, quando foi utilizado 100 % de VC ou suas diluições em areia não houve efeito negativo sobre a germinação, corroborando com os resultados obtidos em nosso estudo. Na literatura não foi possível encontrar estudos que conseguissem explicar com clareza a inibição da germinação.

Nossos resultados mostraram que a inoculação de microrganismos em substrato formulado com VC e areia na proporção de 1:1 promove o crescimento das mudas de tomateiro e mamoeiro. Esse crescimento pode ter sido proporcionado pela produção de compostos indólicos, como observado em nosso estudo "*in vitro*", e disponibilização de nutrientes para as mudas. No estudo de Zavahir e Seneviratne (2007) foi observado que a inoculação de *Penicillium* sp. e *Bradyrhizobium elkanii* aumentou significativamente a concentração de compostos bioativos. Já na disponibilização de nutrientes, estudos de Busato et al. (2012 e 2016) observaram que a inoculação da estirpe HRC54 com BPCV em compostos orgânicos aumentou significativamente a concentração de N e P

disponíveis para as plantas. Também foi observado aumento significativo da concentração de N e P em solo quando foram inoculados *Bradyrhizobium elkanii* e fungos do solo de jardim (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2005). Ainda, estes autores Jayasinghearachchi e Seneviratne (2006), estudaram a influência da inoculação desses microrganismos na presença de fontes insolúveis de P e verificaram aumento na fração de P-lábil em solução. Esses estudos corroboram com a justificativa de que a inoculação de microrganismos melhora o estado nutricional das plantas, conseqüentemente promove o seu crescimento.

A inoculação da combinação *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 com a *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 promoveu significativamente o crescimento das mudas de tomateiro e mamoeiro, demonstrando benefícios na coinoculação fungo-bactérias. Ainda são escassos os estudos da inoculação de combinações entre fungos e bactérias em plantas, entretanto alguns já foram relatados com sucesso. Jayasinghearachchi e Seneviratne (2004) observaram que a coinoculação da estirpe de rizóbio comercial recomendado para a soja e fungos encontrados comumente no solo afetou positivamente a eficiência da simbiose com a planta e as taxas de fixação de N₂. Estes autores concluíram que em cocultivo, o desempenho da associação simbiótica foi superior, aumentando significativamente a disponibilidade de N para a planta hospedeira. Hameeda et al., (2007) observaram que a coinoculação de BPCV, incluindo a *Serratia marcescens*, com fungos micorrízicos incrementou em 17 a 20 % a produtividade do sorgo. Assim, propõem-se mais estudos com a inoculação de combinações fungo-bactérias em substratos para a produção de mudas.

CONCLUSÕES

Substratos formulados com 50 % de vermicomposto de esterco bovino e 50 % de areia coinoculados com *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 promoveram o crescimento vegetal das mudas de tomateiro e mamoeiro em casa de vegetação. O tratamento de alguns resíduos por meio da vermicompostagem pode favorecer economicamente e ambientalmente os viveiricultores, reduzindo o gasto com substrato comercial à base de recursos não renováveis. O substrato a base de vermicomposto para o crescimento de mudas também pode ser utilizado como veículo de inoculantes e

as mudas podem ir para o campo já colonizadas com estirpes selecionadas de microrganismos promotores do crescimento vegetal. Além disso, pode produzir mudas vigorosas para os agricultores presumindo-se uma redução dos estresses do transplântio para o campo.

REFERÊNCIAS

Arancon N, Edwards C, Bierman P, Welch C, Metzger J. Influences of vermicomposts on field strawberries: 1. Effects on growth and yields. *Bioresource technology*. 2004;93(2):145-53.

Arancon NQ, Edwards CA, Babenko A, Cannon J, Galvis P, Metzger JD. Influences of vermicomposts, produced by earthworms and microorganisms from cattle manure, food waste and paper waste, on the germination, growth and flowering of petunias in the greenhouse. *Applied soil ecology*. 2008;39(1):91-9.

Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu S, Hernandez J-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*. 2014;378(1-2):1-33.

Busato JG, Lima LS, Aguiar NO, Canellas LP, Olivares FL. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. *Bioresource technology*. 2012;110:390-5.

Busato JG, Zandonadi DB, Mól AR, Souza RS, Aguiar KP, Júnior FBR, et al. Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. *Journal of the science of food and agriculture*. 2017;97(3):949-55.

Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Jones DL, Nebbioso A, Mazzei P, et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:15-27.

Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant physiology*. 2002;130(4):1951-7.

Edwards CA, Burrows I. Potential of earthworm composts as plant growth media. *Earthworms in waste and environmental management*/edited by Clive A Edwards and Edward F Neuhauser. 1988.

Hameeda B, Srijana M, Rupela O, Reddy G. Effect of bacteria isolated from composts and macrofauna on sorghum growth and mycorrhizal colonization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007;23(6):883-7.

Hameeda B, Harini G, Rupela O, Wani S, Reddy G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological research*. 2008;163(2):234-42.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*. 2004;2(1):43.

Levinsh G. Vermicompost treatment differentially affects seed germination, seedling growth and physiological status of vegetable crop species. *Plant growth regulation*. 2011;65(1):169-81.

Jayasinghearachchi HS, Seneviratne G. A bradyrhizobial-Penicillium spp. biofilm with nitrogenase activity improves N₂ fixing symbiosis of soybean. *Biol Fert Soils*. 2004;40(6):432-4.

Jayasinghearachchi HS, Seneviratne G. Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobial biofilms. *Soil Biol Biochem*. 2006;38(2):405-8.

Joshi R, Vig AP. Effect of vermicompost on growth, yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L). *Afr J Basic Appl Sci*. 2010;2(3-4):117-23.

Jung BK, Khan AR, Hong S-J, Park G-S, Park Y-J, Kim H-J, et al. Quorum sensing activity of the plant growth-promoting rhizobacterium *Serratia glossinae* GS2 isolated from the sesame (*Sesamum indicum* L.) rhizosphere. *Annals of Microbiology*. 2017;67(9):623-32.

Kalra A, Chandra M, Awasthi A, Singh AK, Khanuja SPS. Natural compounds enhancing growth and survival of rhizobial inoculants in vermicompost-based formulations. *Biology and fertility of soils*. 2010;46(5):521-4.

Lazcano C, Arnold J, Tato A, Zaller J, Domínguez J. Compost and vermicompost as nursery pot components: effects on tomato plant growth and morphology. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2009;7(4):944-51.

Martinez-Balmori D, Olivares FL, Spaccini R, Aguiar KP, Araújo MF, Aguiar NO, et al. Molecular characteristics of vermicompost and their relationship to preservation of inoculated nitrogen-fixing bacteria. *Journal of analytical and applied pyrolysis*. 2013;104:540-50.

Olivares FL, Aguiar NO, Rosa RCC, Canellas LP. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*. 2015;183:100-8.

Olivares FL, Busato JG, Paula AM, Lima LS, Aguiar NO, Canellas LP. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2017;4(1):30.

Reis RJA. Dinâmica populacional de bactérias culturáveis durante a vermicompostagem e avaliação do potencial bioinoculante dos isolados

bacterianos. [Tese]. Campos dos Goytacazes- RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro; 2014.

Rodrigues Neto J. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathol.* 1986;12:16.

Rodríguez-Romero AS, Guerra MSP, Jaizme-Vega MDC. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria on banana growth and nutrition. *Agronomy for sustainable development.* 2005;25(3):395-9.

Roesti D, Gaur R, Johri B, Imfeld G, Sharma S, Kawaljeet K, et al. Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biology and Biochemistry.* 2006;38(5):1111-20.

Sarwar M, Kremer RJ. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil.* 1995;172(2):261-9.

Seneviratne G, Jayasinghearachchi H. A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. *Soil Biology and Biochemistry.* 2005;37(10):1975-8.

Seneviratne G, Zavahir J, Bandara W, Weerasekara M. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2008;24(6):739.

Serfoji P, Rajeshkumar S, Selvaraj T. Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato cv Pusa Ruby. by using vermicompost, AM fungus, *Glomus aggregatum* and mycorrhiza helper bacterium, *Bacillus coagulans*. *Journal of Agricultural Technology.* 2010;6(1):37-45.

Singh U, Maurya S, Singh D. Antifungal activity and induced resistance in pea by aqueous extract of vermicompost and for control of powdery mildew of pea and balsam/Antifungaie Aktivität und induzierte Resistenz in Erbsen durch wässrigen Extrakt aus Wurmkompost und Bekämpfung des Echten Mehltaus an Erbsen und Gartenbalsamine. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection. 2003;544-53.

Vaidyanathan G, Vijayalakshmi A. Effect of vermicompost on growth and yield of tomato. European Journal of Pharmaceutical and Medical Research. 2017; 9: 653-656.

Vassilev N, Vassileva M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. Applied Microbiology and Biotechnology. 2003;61(5-6):435-40.

Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Munive-Hernández A, Baez-Rogelio A, et al. Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. Alianzas y Tendencias. 2016;1(1):9-19.

Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y, Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and soil. 2001;235(2):235-42.

Zaller JG. Foliar spraying of vermicompost extracts: effects on fruit quality and indications of late-blight suppression of field-grown tomatoes. Biological agriculture & horticulture. 2006;24(2):165-80.

Zaller JG. Vermicompost in seedling potting media can affect germination, biomass allocation, yields and fruit quality of three tomato varieties. European Journal of Soil Biology. 2007;43:S332-S6.

Zavahir J, Seneviratne G. Potential of developed microbial biofilms in generating bioactive compounds. Res J Microbiol. 2007;2(4):397-401.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A transformação de resíduos sólidos de origem animal e/ou vegetal, por meio da vermicompostagem, em adubos e substratos promove a destinação adequada desses potenciais contaminantes, evitando a poluição ambiental. O enriquecimento de substratos à base de vermicompostos com microrganismos promotores do crescimento vegetal apresenta potencial em função da facilidade de manejo da inoculação. A interação entre bactérias e fungos com a formação de biofilmes é uma estratégia pouco utilizada para formulação de inoculantes mistos mais eficientes. O objetivo deste trabalho foi formular e avaliar diferentes substratos à base de vermicomposto de esterco bovino enriquecidos com MPCV para produção de mudas.

No primeiro experimento, avaliou-se a interação mutualística entre *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e *Serratia marcescens* UENF-22GI e fungos do gênero *Trichoderma* sp. (isolados F476 a SC 1306). Foi testada a compatibilidade entre os microrganismos *in vitro* e o efeito positivo de metabólitos produzidos pelo fungo sobre o crescimento das bactérias. Foi observada a influência do fungo na sobrevivência das bactérias promotoras do crescimento vegetal quando coinoculados em composto orgânico. Verificou-se a compatibilidade entre o F476 e as duas estirpes bacterianas. As bactérias aderiram às hifas fúngicas, formaram biofilmes e se dispersaram no espaço associadas às hifas em crescimento. Os metabólitos não voláteis produzidos pelo F476 promoveram o crescimento de ambas as estirpes bacterianas. A presença

do F476 inoculado em conjunto com as bactérias influenciou significativamente a sobrevivência das estirpes bacterianas, mantendo um maior número de células bacterianas por grama de composto orgânico durante o tempo de incubação.

No segundo experimento, avaliaram-se distintos substratos formulados com vermicomposto e enriquecidos com microrganismos promotores de crescimento na produção de mudas de tomate e mamão. Foi utilizado vermicomposto de esterco bovino em proporções de 100, 75, 50 e 25 % diluídos em substrato comercial Basaplant® e areia para a seleção do substrato com maiores rendimentos para mudas de tomate. O substrato de melhor desempenho selecionado foi confrontado com o substrato comercial Basaplant® para as mudas de mamão. Após, suspensões contendo 10^8 cel/mL das bactérias *Serratia marcescens* estirpe UENF 22 GI e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54, 10^6 conídios/g de arroz do fungo *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 foram inoculadas na taxa de 1 mL e 1 g de arroz por kg^{-1} de substrato. Os microrganismos foram testados em cultivo isolados e suas interações fungo-bactéria (F476 + UENF-22GI e F476 + HRC 54). Verificaram-se aumentos significativos na produção das mudas quando utilizado o substrato formado por 50 % de areia e 50 % de vermicomposto de esterco bovino. A coinoculação fungo-bactérias aumentou significativamente o crescimento das mudas, com destaque para interação F476 + HRC 54 com aumentos para mudas de tomate até 176 e 230 % e mamão 72 e 69 % para massa seca da parte aérea e raízes, respectivamente.

Com base nos resultados acima, conclui-se que:

- O fungo *Trichoderma longibrachiatum* isolado F476 foi compatível com as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 e *Serratia marcescens* estirpe UENF-22GI;
- As bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Serratia marcescens* são capazes de aderir às hifas do *Trichoderma longibrachiatum* e dispersar junto ao crescimento micelial;
- O líquido metabólico produzido pelo isolado F476 promove o crescimento de ambas as bactérias em meio de cultivo;
- A coinoculação das estirpes HRC54 e UENF-22GI com o isolado F476 em vermicomposto aumenta a sobrevivência bacteriana no curso do tempo;

- O uso de vermicomposto de esterco bovino e areia nas proporções de 1:1 se apresenta como alternativa para a produção de mudas de tomate e mamão;
- A coinoculação fungo-bactéria em substrato formulado com areia e vermicomposto promove o crescimento das mudas do tomateiro e mamoeiro em casa de vegetação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., and Kloepper, J. W. (2009). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial Ecology* 58, 921-929.

Andreote, F. D., Azevedo, J. L., and Araujo, W. L. (2009). Assessing the Diversity of Bacterial Communities Associated with Plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 417-432.

Araujo, F. F., Hungria, M. (1999). Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/B. *elkanii*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. DF, 34:1633-1643.

Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., and Tweddell, R. J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 1733-1740.

Baldotto, L. E. B., & Olivares, F. L. (2008). Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology* 54, 918-931.

Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* 16, 729-770.

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., and Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil* 378, 1-33.

Busato, J. G., Lima, L. S., Aguiar, N. O., Canellas, L. P., and Olivares, F. L. (2012). Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. *Bioresource Technology* 110, 390-395.

Canellas, L. P., Balmori, D. M., Medici, L. O., Aguiar, N. O., Campostrini, E., Rosa, R. C. C., Facanha, A. R., and Olivares, F. L. (2013). A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* 366, 119-132.

Chanway, C. P. (1997). Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. *Forest Science* 43, 99-112.

Colozzi Filho, A., Cardoso, E. J. B. N. (2000). Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalária cultivada na entrelinha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 2033-2042.

Conceição, P.M., Vieira, H.D., Canellas, L.P., Júnior, R.B.M., Olivares, F.L. (2008) Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Notas Científicas. Pesquisa Agropecuária Brasileira.*, 43.

Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M., and Chauhan, S. M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 159, 371-94.

Elmerich, C., Newton, W. E. (2007) Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations, ed: Springer, 336p.

Elvers, K. T., Leeming, K., and Lappin-Scott, H. M. (2002). Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29, 331-8.

Embrapa Soja., 2018. Tecnologia de inoculação incrementa a proteína do capim-braquiária em 25%. Disponível em : [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31646381/tecnologia-de-inoculacao-incrementa-a-proteina-do-capim--braquiaria-em-25 %](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31646381/tecnologia-de-inoculacao-incrementa-a-proteina-do-capim--braquiaria-em-25-%). Acesso em 15/02/2018.

Flemming, H. C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633.

Fontenelle, A. D. B., Guzzo, S. D., Lucon, C. M. M., and Harakava, R. (2011). Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 30, 1492-1500.

Gonzalez-Bashan, L. E., Lebsky, V. K., Hernandez, J. P., Bustillos, J. J., and Bashan, Y. (2000). Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 653-659.

Gutierrez-Manero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., and Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* 111, 206-211.

Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Reddy G., (2006). Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol Res.* 2, 234-242.

Hameeda, B., Srijama, M., Rupela, O.P., Reddy, G., (2007). Effect of bacteria isolated from composts and macrofauna on sorghum growth and mycorrhizal colonization. *World J Microbiol Biotechnol* 23, 883-887.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., (2004). *Trichoderma* species – Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol* 2, 43-56.

Holguin, G., Bashan, Y., (1996). Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biology & Biochemistry* 28, 1651–1660.

Houwer, T., Maya, T., Ron, S., Sandovsky, H., Shadkchan, Y., Kijner, N., Mitiagin, Y., Fichtman, B., Harel, A., Shanks, R.M.Q., Bruna, R.E., Garcia-Vescovi, E., Osharov, N. (2016) Mechanisms of bacterial (*Serratia marcescens*) attachment to, migration along, and killing of fungal hyphae. *Applied and Environmental Microbiology*. 82: 2585-2594.

Huang, W. E., Ferguson, A., Singer, A. C., Lawson, K., Thompson, I. P., Kalin, R. M., Larkin, M. J., Bailey, M. J., and Whiteley, A. S. (2009). Resolving Genetic Functions within Microbial Populations: In Situ Analyses Using rRNA and mRNA Stable Isotope Probing Coupled with Single-Cell Raman-Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 234-241.

Hungria, M. Embrapa e UFPR desenvolvem primeiro inoculante para milho e trigo:<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/agosto/1asemana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiro-inoculante-para-milho-e-trigo> em 09/03/2012.

Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O. (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413–425

Jayasinghearachchi, H. S., and 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.

Jayasinghearachchi, H. S., and Seneviratne, G. (2006). Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobial biofilms. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 405-408.

Ji, L. Y., Zhang, W. W., Yu, D., Cao, Y. R., and Xu, H. (2012). Effect of heavy metal-solubilizing microorganisms on zinc and cadmium extractions from heavy metal contaminated soil with *Tricholoma lobynsis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28, 293-301.

John, R. P., Tyagi, R. D., Prevost, D., Brar, S. K., Pouleur, S., and Surampalli, R. Y. (2010). Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* 29, 1452-1459.

Jung, B.K., Khan, A.R., Hong, S.J., Park, G.S., Park, Y.J., Kim, H.J., Jeon, H.J., Khan, M.A., Waqas, M., Lee, I.J., Lee, S.E., Shin, J.H., (2017). Quorum sensing activity of the plant growth-promoting rhizobacterium *Serratia glossinae* GS2 isolated from the sesame (*Sesamum indicum* L.) rhizosphere. *Ann. Microbiol.* 67, 623–632.

Kloepper, J.W., Quadt-Hallmann., Mahaffee, W.F., Hallmann, J. (1997) Recent studies on the microbial ecology of bacterial endophytes in plants. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 26, Rio de Janeiro, 1997. Resumos. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

Kyaw, C.M. (2011) Biofilmes Microbianos. Disponível em: <<http://cenormagill.com.br/artigos/Biofilmes%20Microbianos.pdf>>. Acesso em 12/04/2015.

Lee, S., Flores-Encarnacion, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J. E., and Kennedy, C. (2004). Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriology* 186, 5384-5391.

Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M., and Pollmann, S. (2010). Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Eur J Cell Biol* 89, 895-905.

Li, H. Q., Li, X. J., Wang, Y. L., Zhang, Q., Zhang, A. L., Gao, J. M., and Zhang, X. C. (2011). Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*. *Biochemical Systematics and Ecology* 39, 876-879.

Lynch, J. P. (2007). Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* 55, 493-512.

Marques-Júnior, R.B., Canellas, L.P., Silva, L.G., Olivares, F.L. (2008). Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 1121-1128.

Marra, L., Fonsêca Sousa Soares, C. R., de Oliveira, S. M., Avelar Ferreira, P. A., Lima Soares, B., de Fráguas Carvalho, R., de Lima, J. M., and de Souza Moreira, F. M. (2012). Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil* 357, 289-307.

Martinez-Romero, E., and Rosenblueth, M. (1990). Increased Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Nodulation Competitiveness of Genetically Modified *Rhizobium* Strains. *Appl Environ Microbiol* 56, 2384-2388.

Meneses, C. H. S. G.; Rouws, L. F. M.; Simões-Araújo, J. L. Vidal, M. S.; Baldani, J.I. (2011) Exopolysaccharide Production is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*,v.24,p.1448-1458.

Mercado-Blanco J, Lugtenberg B (2014) Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Curr Biotechnol* 3:60–75. doi: 10.2174/22115501113026660038

McCaig, A. E., Glover, L. A., and Prosser, J. I. (2001). Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4554-4559.

Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. (2ed.) (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: UFLA. 729p.

Moreira, F.S., Huising, E.J., Bignell, D.E. (2010) *Manual de biologia dos solos tropicais: Amostragem caracterização da biodiversidade*. Lavras: UFLA, 368p.

Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C., and Canellas, L. P. (2015). Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae* 183, 100-108.

Olivares, F.L., Busato, J.G., Paula, A.M., Lima, L.S., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., (2017) Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 30.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54, 49-79.

Piccolo, A. (2012) The nature of soil organic matter and innovative soil management to fight global changes and maintain agricultural productivity. p.1-20. In: *Carbon sequestration in Agricultural soils. A multidisciplinary approach to innovative methods*. A. Piccolo (ed) Springer.

Pratt, L. A., and Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* 30, 285-293.

Rinaudi, L., Fujishige, N. A., Hirsch, A. M., Banchio, E., Zorreguieta, A., and Giordano, W. (2006). Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Res Microbiol* 157, 867-75.

Roesti, D., Gaur, R., Johri, B., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K., and Aragno, M. (2006). Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1111-1120.

Rodrigues Neto, J.; Malavolta-JR, V.A.; Victor, O., (1986). Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri Tipo B. *Summa Phytopathologica, Piracicaba* 2, 16 -16.

Rosenblueth, M., and Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 827-837.

Russo, A., Vettori, L., Felici, C., Fiaschi, G., Morini, S., and Toffanin, A. (2008). Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. *Journal of Biotechnology* 134, 312-319.

Sanchez, P. A. (2002). Ecology - Soil fertility and hunger in Africa. *Science* 295, 2019-2020.

Seneviratne, G., and Jayasinghearachchi, H. S. (2003). Mycelial colonization by bradyrhizobia and azorhizobia. *Journal of Biosciences* 28, 243-247.

Seneviratne, G., and Jayasinghearachchi, H. S. (2005). A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 1975-1978.

Seneviratne, G., Zavahir, J. S., Bandara, W. M. M. S., and Weerasekara, M. L. M. A. W. (2008). Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24, 739-743.

Siqueira, J. O ; Moreira, F. M. S. ; Lopes, A. S. (1999). Inter-relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição Mineral de plantas:base para um novo paradigma na agrotecnologia do século XXI. In: Siqueira, J. O; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.; Faquin, V.; Furtini Neto, A. E.; Carvalho, J.G. Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas. Lavras: UFLA, p. 1-10.

Singh, H., and Reddy, M. S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology* 47, 30-34.

Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W. H., Simberloff, D., and Swackhamer, D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292, 281-284.

Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., and Netrusov, A. I. (2005). Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology* 74, 46-53.

Tuleski, T.R. (2013) Envolvimento dos genes de biossíntese de celulose na formação de biofilme pela bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1.100. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Vassilev, N., and Vassileva, M. (2003). Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 435-440.

Vivanco-Calixto, R., Molina-Romero, D., Morales-Garcia, Y.E., Quintero-Hernández, V., Munive-Hernández, A., Baez-Rogelio, A., Muños-Rojas, J., (2016). Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias* 1, 9 -19.

Wahid, O. A. A., and Mehana, T. A. (2000). Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus-uptake by wheat and faba bean plants. *Microbiological Research* 155, 221-227.

Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., and Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils* 40, 36-43.

Watnick, P. I., and Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* 34, 586-595.

Weber, B.O., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (2000) Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.35, n.11, p.2277-2285.

Zavahir, J.S., Seneviratne G., (2007). Potential of Developed Microbial Biofilms in Generating Bioactive Compounds. *Research Journal of Microbiology* 2, 397- 401.