

LIDIANE FIGUEIREDO DOS SANTOS

**MICRO-ORGANISMOS EFICIENTES: DIVERSIDADE MICROBIANA E
EFEITO NA GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
DE CAPIM-MARANDU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237m
2016

Santos, Lidiane Figueiredo dos, 1993-

Micro-organismos Eficientes : diversidade microbiana e efeito na germinação, crescimento e composição química de capim-marandu / Lidiane Figueiredo dos Santos. – Viçosa, MG, 2016.

xii, 44f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Rogério de Paula Lana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Capim-marandu - Crescimento. 2. Capim-marandu - Cultivo. 3. Capim-marandu - Semente - Dormência. 4. Esterco bovino. 5. Micro-organismos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Agroecologia. II. Título.

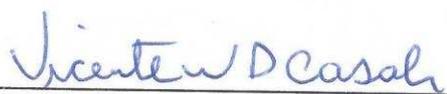
CDD 22 ed. 633.2

LIDIANE FIGUEIREDO DOS SANTOS

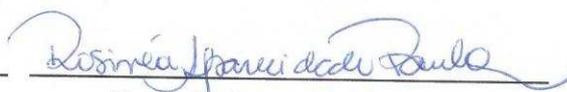
**MICRO-ORGANISMOS EFICIENTES: DIVERSIDADE MICROBIANA E
EFEITO NA GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
DE CAPIM-MARANDU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

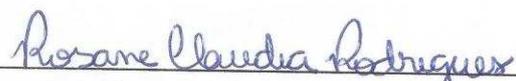
APROVADA: 8 de novembro de 2016.



Vicente Wagner Dias Casali



Rosinéa Aparecida de Paula



Rosane Cláudia Rodrigues



Karina Guimarães Ribeiro
(Coorientadora)



Rogério de Paula Lana
(Orientador)

*Aos meus maiores mestres:
meu pai Antônio e minha mãe
Regina, pelo apoio, amor e
sabedoria.*

Dedico

“Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis.”

(Bertolt Brecht)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre renovar minhas esperanças e minhas forças para prosseguir.

Ao meu pai Antônio e minha mãe Regina por incentivar meus sonhos e me ajudar a realizá-los. Vocês são meu orgulho e a fonte de inspiração para essa pesquisa. Por vocês conheci a Agroecologia e os Micro-organismos Eficientes e juntos vamos seguir nessa caminhada rumo a mais descobertas. Gratidão pelas sábias palavras na hora certa, gigante amor e incondicional apoio. Amo muito vocês!

As minhas irmãs Luciana e Lais pelo apoio e companheirismo em todas as etapas da vida.

Ao meu namorado Michel por estar sempre ao meu lado, acompanhando cada etapa desse projeto, cada experimento, cada resultado, me apoiando nos momentos difíceis e celebrando comigo cada vitória. Gratidão por ter você em minha vida.

A todos os verdadeiros amigos pelo apoio e momentos felizes.

Aos mestres, desde o primário, até a Pós-graduação, em especial aos meus professores da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Santa Marcelina e aos professores do Núcleo de Estudos em Agroecologia e Produção Orgânica do IF Sudeste MG, pelo incentivo.

Ao meu orientador Rogério, que aceitou o desafio de trabalhar com os Micro-organismos Eficientes. Obrigada pela confiança, por cada conselho e cada incentivo.

A professora Catarina e a Pós-Doutoranda Marliane, minhas coorientadoras, que me acolheram com muito carinho no Laboratório de Associações Micorrízicas. Obrigada por embarcarem comigo nessa busca por respostas sobre os Micro-organismos Eficientes e por terem me dado a oportunidade de aprender mais sobre o mundo microbiano.

A professora Karina, minha coorientadora, pelos conhecimentos e sugestões relacionados à forragicultura.

Ao professor Casali por sempre me receber em seu laboratório com tamanha simpatia e pelos excelentes conselhos.

As famílias agrícolas dos municípios de Muriaé, Antônio e Regina, e Viçosa, Adalgisa, senhor Jesus e dona Teresinha, e a empresa AMBIEM LTDA BRASIL, pelo fornecimento dos Micro-organismos Eficientes.

Aos companheiros do Laboratório de Associações Micorrízicas e Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos pelos conselhos e pelo apoio na coleta e no

processamento dos dados. Em especial a Paulo, Bruno, Tomás, Phillippi, Camila, Ana, Juliana, Nayron, Thiago e José Maria.

Aos companheiros do Laboratório de Forragicultura e Laboratório de Isótopos Estáveis, em especial a Vitor, Cássia, Rafael e Fernanda.

Aos companheiros do Mestrado em Agroecologia e das disciplinas cursadas, pelos conselhos, troca de saberes e momentos agradáveis.

A Universidade Federal de Viçosa, aos professores do Programa de Pós-graduação em Agroecologia e Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola por fazer a diferença em meu processo de formação na universidade.

A Rosângela, secretária do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Davi, Pós-doutorando, pela paciência e disposição para ajudar nas dúvidas e problemas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço aos membros da banca Rogério, Karina, Vicente Casali, Rosinéa e Rosane por aceitarem o convite e por toda contribuição para este trabalho.

A todos, que de alguma forma, me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho.

A todos vocês o meu muito obrigada!!!

BIOGRAFIA

Lidiane Figueiredo dos Santos, filha de Antônio José dos Santos e Regina Aparecida de Figueiredo Santos, nasceu no dia 08 de agosto de 1993 em Muriaé, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2011 iniciou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Santa Marcelina (FAFISM), campus Muriaé/MG. Durante a graduação foi estagiária no Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (2013 à 2014); Bolsista de Iniciação ao Extensionismo do CNPq no Núcleo de Estudos em Agroecologia e Produção Orgânica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais (2013 à 2014); monitora de diversas disciplinas do curso de Ciências Biológicas da FAFISM (2012 à 2014) e Monitora do Borboletário da FAFISM (2012).

Em março de 2015 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Professor Rogério de Paula Lana.

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	3
CAPÍTULO I.....	4
RESUMO.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAL E MÉTODOS.....	7
Local do experimento e arranjo experimental.....	7
Experimento em casa de vegetação.....	7
Determinação do perfil microbiano.....	9
Características agronômicas e químicas.....	10
Análises estatísticas.....	11
RESULTADOS.....	11
Caracterização do perfil microbiano dos inoculantes EM pela técnica PCR-DGGE.....	11
Caracterização do perfil microbiano de solo e esterco pela técnica PCR-DGGE.....	12
Efeito do esterco e EM sobre o crescimento do capim-marandu.....	14
Efeito do EM sobre a composição química do capim-marandu.....	16
DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÕES.....	19
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO II.....	22
RESUMO.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
Local do experimento.....	25
Amostragem.....	25
Extração de DNA, amplificação por PCR e por Illumina MiSeq.....	25
Processamento e análise dos dados de sequenciamento.....	26

Análise da diversidade.....	26
Delineamento experimental.....	27
Experimento de germinação.....	27
Análises estatísticas.....	28
RESULTADOS.....	28
Resultados das sequências.....	28
Porcentagem e velocidade de germinação das sementes de capim-marandu.....	32
DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
CONCLUSÕES GERAIS.....	39
ANEXOS.....	40

RESUMO

SANTOS, Lidiane Figueiredo dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Micro-organismos Eficientes: diversidade microbiana e efeito na germinação, crescimento e composição química de capim-marandu.** Orientador: Rogério de Paula Lana. Coorientadoras: Karina Guimarães Ribeiro e Marliane de Cássia Soares Silva.

Os Micro-organismos Eficientes (EM), inoculantes formados por fungos e bactérias isolados de matas, podem influenciar a germinação de sementes e o crescimento de plantas. Não foram encontrados trabalhos identificando a composição microbiana desses inoculantes, assim, foram realizados dois experimentos com os seguintes objetivos: Experimento 1: analisar, pela técnica de PCR-DGGE, o perfil da comunidade microbiana em três inoculantes EMs de três origens, a eficiência no crescimento e na composição química de capim-marandu, cultivado em solo acrescido ou não de esterco bovino, e o perfil microbiano desse inoculante no ambiente de cultivo; Experimento 2: analisar a diversidade por sequenciamento Illumina MiSeq e caracterizar taxonomicamente fungos e bactérias de três inoculantes EM de origens distintas, além de avaliar a respectiva eficiência na germinação de sementes de capim-marandu. No experimento 1, as plantas foram cultivadas em vasos mantidos em casa de vegetação, em esquema fatorial 2 x 4, com cinco repetições, consistindo de solo sem ou com esterco bovino e três tipos de EM (EM1, EM2 e EM3) + controle sem inoculação, totalizando 40 unidades experimentais. O EM1 é de origem comercial e os outros dois de origem caseira, produzidos na região de Muriaé (EM2) e Viçosa (EM3), ambas localizadas na Zona da Mata de Minas Gerais. Nos tratamentos que receberam o esterco foram adicionados 90 g deste na superfície do solo e naqueles que receberam EM foram realizadas três aplicações de 34 mL, a cada 30 dias. Aos 60 e 100 dias de experimento foram avaliadas características de crescimento e químicas do capim-marandu. O perfil de bactérias e fungos dos inoculantes EM e do solo foi obtido conforme a técnica PCR-DGGE. No experimento 2, o DNA dos três inoculantes EM foi extraído, seguido de amplificação por PCR do gene rRNA 16S e da região ITS de fungos e do sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq. Testes de germinação foram conduzidos no delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com esquema fatorial 3 x 3 x 2 + 1 (controle positivo) + 2 (controles negativos) e quatro repetições de 50 sementes. Os tratamentos consistiram em: pré-tratamentos com três tipos de EM (EM•1®, EM 2 e EM3) em três concentrações (1% em água; 2% em água e 100% de EM) e dois tempos de imersão (5 min e 24 h); pré-tratamentos com ácido sulfúrico

18% por 15 min e com água (5 min e 24 h). Houve maior crescimento das plantas nos tratamentos com esterco. Na ausência de esterco o EM2 foi destaque por melhorar algumas características das plantas, incluindo comprimento da parte aérea (CPA) e diâmetro do colmo (DC) no primeiro corte e CPA no segundo corte. Nos tratamentos com o esterco, as características agrônômicas, analisadas aos 60 e 100 dias de experimento, não foram afetadas, entretanto, houve pronunciado aumento no teor de proteína bruta (PB) ao utilizar o EM2. Dependendo da origem, inoculantes EM diferem quanto a estrutura da comunidade de fungos e bactérias. A presença e a ausência de esterco no solo determinaram o perfil bacteriano e fúngico, com efeito pronunciado na comunidade fúngica dos solos com EMs 1 e 2. O grupo de bactérias foi o mais abundante nos EMs, seguido pelos fungos. EMs 2 e 3 não compartilharam unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de fungos, no entanto, algumas UTOs bacterianas foram compartilhadas por todos os EMs. Muitas dessas bactérias são promotoras de crescimento vegetal e produzem fitormônios, o que pode justificar a eficiência destes inoculantes na germinação de sementes. Pré-tratamentos de sementes de capim-marandu com os três EMs resultaram em maior porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG) quando o EM foi utilizado na concentração 1 e 2%. A imersão das sementes por 5 min foi mais eficiente comparada a imersão por 24h. A %G e o IVG das sementes tratadas com ácido sulfúrico não diferiram dos tratamentos com EM, mas ambos foram superiores ao controle.

ABSTRACT

SANTOS, Lidiane Figueiredo dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november, 2016. **Effective microorganisms: microbial diversity and effect on germination, growth and chemical composition of palisade grass.** Adviser: Rogério de Paula Lana. Co-advisers: Karina Guimarães Ribeiro and Marliane de Cássia Soares Silva.

Effective Microorganisms (EM), inoculant formed by fungi and bacteria isolated from forests, can influence seed germination and plant growth. No experiments were found to identify the microbial composition of these inoculants, so two experiments were carried out with the following objectives: Experiment 1: to analyze by the PCR-DGGE technique the profile of the microbial community in three inoculants EMs from three origins, the efficiency in the growth and chemical composition of palisade grass, cultivated in soil with or without bovine manure, and the microbial profile of this inoculant in the growing environment; Experiment 2: to analyze diversity by Illumina MiSeq sequencing and taxonomically characterize fungi and bacteria of three EM inoculants of different origins, in addition to evaluating their efficiency in the germination of palisade grass seeds. In experiment 1, the plants were grown in pots kept in a greenhouse, in a 2 x 4 factorial scheme, with five replicates, consisting of soil without or with bovine manure and three types of EM (EM1, EM2 and EM3) + control without inoculation, totalizing 40 experimental units. EM1 is of commercial origin and the other two of home origin, produced in the region of Muriaé (EM2) and Viçosa (EM3), both located in the Zona da Mata of Minas Gerais. In the treatments that received manure, 90 g of this was added to the soil surface and in those receiving EM, three 34 mL applications were performed every 30 days. At 60 and 100 days of experiment were evaluated growth and chemical characteristics of the palisade grass. The bacteria and fungi profiles of the EM and soil inoculants were obtained according to the PCR-DGGE technique. In experiment 2, DNA from the three EM inoculants was extracted, followed by PCR amplification of the 16S rRNA gene and the ITS region of fungi and sequencing on the Illumina MiSeq platform. Germination tests were conducted in a completely randomized design (CRD), with factorial scheme 3 x 3 x 2 + 1 (positive control) + 2 (negative controls) and four replicates of 50 seeds. The treatments consisted of: pre-treatments with three types of EM (EM•1®, EM2 and EM3) in three concentrations (1% in water, 2% in water and 100% EM) and two immersion times (5 min and 24 h); Pre-treatments with 18% sulfuric acid for 15 min and with water (5 min and 24 h). There was higher plant growth in manure treatments. In

the absence of manure EM2 was highlighted by improving some plant characteristics, including shoot length (SL) and stalk diameter (SD) in the first cut and SL in the second cut. In the treatments with the manure, the agronomic characteristics, analyzed at 60 and 100 days of experiment, were not affected, however, there was a pronounced increase in crude protein (CP) content when using EM2. Depending on the origin, inoculants EM differ in the community structure of fungi and bacteria. The presence and absence of manure in the soil determined the bacterial and fungal profile, with a pronounced effect on the fungal community of soils with EMs 1 and 2. The group of bacteria was the most abundant in the EM, followed by fungi. EMs 2 and 3 did not share fungus operative taxonomic units (OTUs), however, some bacterial UTOs were shared by all EMs. Many of these bacteria are promoters of plant growth and produce phytonutrients, which may justify the efficiency of these inoculants in seed germination. Pre-treatments of palisade grass seed with the three EM resulted in a higher percentage of germination (%G) and germination speed index (GSI) when EM was used in the concentration 1 and 2%. The seed immersion for 5 min was more efficient compared to immersion for 24 hours. The %G and GSI of the seeds treated with sulfuric acid did not differ from the EM treatments, but both were superior to the control.

INTRODUÇÃO GERAL

O setor agrícola tem importante função na economia brasileira, que detém atualmente o dobro da produção dos anos de 1990 e é o segundo maior exportador mundial (OECD-FAO 2015). Com o intuito de aumentar a produção agrícola, novas tecnologias têm sido produzidas, no entanto, muitas delas, como o uso de adubos químicos e agrotóxicos, implicam no maior custo, alta toxicidade e efeitos indesejáveis sobre os organismos e o ambiente. O Brasil abriga grande diversidade microbiana e ainda há micro-organismos a serem estudados por causa da capacidade de produzir metabólitos que podem contribuir na fabricação de produtos naturais úteis na agricultura. Assim, estudos têm buscado aumentar a produtividade das culturas com a utilização de bioinoculantes (Kumar e Gopal 2015).

A maioria dos bioinoculantes produzidos atualmente consiste em estirpes microbianos fermentados ou cultivados separadamente gerando o produto final com inóculos puros (Calvo et al. 2014). A categoria adicional de inoculantes, composta pela combinação microbiana complexa e o conjunto de metabólitos obtidos do processo fermentativo, merece destaque. Esta categoria é denominada EM (Micro-organismos Eficientes), preparação formada por fungos e bactérias isolados de matas e que coexistem sinergicamente em meio líquido fermentativo enriquecido com fonte de açúcar (Bonfim et al. 2011).

Os Micro-organismos Eficientes foram descobertos no Japão e denominados por Teruo Higa “Effective Microorganisms” visando otimizar o uso da matéria orgânica na agricultura natural. Podem ser utilizados como alternativa ao uso de adubos sintéticos e agrotóxicos e atualmente são comercializados em diversos países (Bonfim et al. 2011).

As famílias agrícolas, principalmente focadas no sistema agroecológico, tem visado redesenhar agroecossistemas mais sustentáveis (Altieri 1999). O EM é uma tecnologia social e tem como base a inoculação de culturas mistas de micro-organismos de solo de matas, propiciando ambiente favorável ao desenvolvimento das plantas. O EM produzido pelas famílias agrícolas é denominado “caseiro” e sua interação com o agroecossistema promove a supressão de patógenos por meio da liberação de substâncias antagônicas, fornecimento de nutrientes a partir da decomposição de substratos orgânicos, equilíbrio da microbiota do solo e liberação de substâncias promotoras de germinação de sementes e crescimento vegetal (Bonfim et al. 2011).

Dentre às diversas funções do EM, 1) acelerar a decomposição de resíduos orgânicos, com consequente fornecimento de nutrientes às culturas (Daly e Stewart 1999; Javaid e Bajwa 2011; Sharif et al. 2015); 2) intensificar a germinação de sementes (Khan et al. 2006; Mowa e Maass 2012); 3) o crescimento de plantas (Khaliq et al. 2006; Hu e Qi 2013) são mais evidentes e já foram comprovadas em alguns estudos. No entanto, informações sobre a composição microbiana de EMs, bem como seu efeito na germinação e no crescimento da gramínea forrageira capim-marandu (*Urochloa brizantha*), que ocupa extensas áreas de pastagem no Brasil, são escassas na bibliografia consultada, principalmente referentes ao EM denominado “caseiro”.

Considerando que a escassez de informações é notória no Brasil em relação à composição microbiana do EM e seus efeitos, o presente trabalho teve como objetivo:

1. Analisar, pela técnica de PCR-DGGE, o perfil da comunidade microbiana em três inoculantes EMs de três origens, a eficiência no crescimento e na composição química de capim-marandu, cultivado em solo acrescido ou não de esterco bovino, e o perfil microbiano desse inoculante no ambiente de cultivo.
2. Analisar a diversidade por sequenciamento Illumina MiSeq e caracterizar taxonomicamente fungos e bactérias de três inoculantes EM de origens distintas, além de avaliar a respectiva eficiência na germinação de sementes de capim-marandu.

REFERÊNCIAS

- Altieri M. Bases científicas para uma agricultura sustentável. Montevideo: Nordan Comunidad; 1999.
- Bonfim FPG, Honório ICG, Reis IL, Pereira AJ, Souza DB. Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia; 2011.
- Calvo P, Nelson L, Kloepper JW. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*. 2014;383: 3-41.
- Daly MJ, Stewart DPC (1999) Influence of "effective microorganisms" (EM) on vegetable production and carbon mineralization - a preliminary investigation. *J Sustainable Agric*. 1999;14: 15–25.
- Hu C, QI Y. Long-term effective microorganisms application promote growth and increase yields and nutrition of wheat in China. *Eur J Agron*. 2013;46: 63–67.
- Javid A, Bajwa R. Field evaluation of effective microorganisms (EM) application for growth, nodulation, and nutrition of mung bean. *Turk J Agric For*. 2011;35: 443–452.
- Khaliq A, Abbasi MK, Hussain T. Effects of integrated use of organic and inorganic nutrient sources with effective microorganisms (EM) on seed cotton yield in Pakistan. *Bioresour Technol*. 2006;97: 967–972.
- Khan BM, Hossain MK, Mridha MAU. Effect of microbial inoculants on Albizia saman germination and seedling growth. *J For Res*. 2006;17: 99-102.
- Kumar BL, Gopal DVRS. Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *Biotech*. 2015;5: 867-876.
- Mowa E, Maass E. The effect of sulphuric acid and effective micro-organisms on the seed germination of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw). *S African J Bot*. 2012;83: 193-199.
- OECD-FAO/Food and Agriculture Organization of the United Nations. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024*. Paris: OECD Publishing; 2015.
- Sharif M, Khan M, Khan MA, Wahid F, Marwat KB, Khattak AM, et al. Effect of rock phosphate and farmyard manure applied with effective microorganisms on the yield and nutrient uptake of wheat and sunflower crops. *Pak J Bot*. 2015;47: 219-226.

CAPÍTULO I

MICRO-ORGANISMOS EFICIENTES: DIVERSIDADE MICROBIANA E EFEITO NO CRESCIMENTO DO CAPIM-MARANDU

RESUMO

Os micro-organismos eficientes (EM) são inoculantes utilizados por famílias agrícolas em diversas culturas agronômicas e a real eficiência do EM e a composição têm sido amplamente discutidas. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar, pela técnica de PCR-DGGE, o perfil da comunidade microbiana, em três inoculantes EMs de três origens e também a eficiência no crescimento e na composição química de capim-marandu, cultivado em solo adicionado ou não de esterco bovino, e o perfil microbiano do inoculante no ambiente de cultivo. As plantas foram cultivadas em vasos mantidos em casa de vegetação, em esquema fatorial 2 x 4, com cinco repetições, consistindo de solo sem ou com esterco bovino e com três tipos de EM (EM1, EM2 e EM3) + controle sem inoculação, totalizando 40 unidades experimentais. O EM1 é de origem comercial e os outros dois de origem caseira, produzidos na região de Muriaé (EM2) e Viçosa (EM3), ambas localizadas na Zona da Mata de Minas Gerais. Nos tratamentos que receberam o esterco foram adicionados 90 g deste na superfície do solo e naqueles que receberam EM foram realizadas três aplicações de 34 mL, a cada 30 dias. Aos 60 e 100 dias de experimento foram avaliadas características de crescimento e químicas do capim-marandu. O perfil de bactérias e fungos dos inoculantes EM e do solo foi obtido conforme a técnica PCR-DGGE. Houve maior crescimento das plantas nos tratamentos que receberam esterco, entretanto, na ausência de esterco, o EM2 foi destaque por melhorar algumas características de crescimento. As características agronômicas, analisadas aos 60 e 100 dias de experimento, não foram afetadas pelo esterco, mas houve pronunciado aumento no teor de PB ao utilizar o EM2. Inoculantes EM de várias origens diferem quanto a estrutura da comunidade de fungos e bactérias. A presença e a ausência de esterco no solo determinaram o perfil bacteriano e fúngico, com efeito pronunciado na comunidade fúngica dos solos que receberam EMs 1 e 2.

Palavras-chave: esterco, fibra em detergente neutro, perfil microbiano, proteína bruta.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e o terceiro maior exportador mundial de carne bovina, alcançando 9,4 milhões de toneladas e exportações de 1,6 milhões de toneladas ao ano (USDA 2016). Cerca de 172,3 milhões de hectares do território nacional estão ocupados por pastagens. O pasto é determinante na pecuária, pois praticamente toda a produção de carne bovina é sustentada pela pastagem que é a forma mais prática e econômica de alimentar os animais (Dias 2014). No entanto, o elevado nível de degradação dos pastos é preocupante. A implantação de gramíneas em solos de baixa fertilidade e o manejo inadequado tem acarretado redução na sua produção e no seu valor nutricional.

Tentando de solucionar o problema, técnicas têm sido utilizadas (Santos et al. 2016), das quais se destaca a inoculação de micro-organismos benéficos. Quanto mais intensa a inoculação, maior a qualidade do solo, mais saudias são as plantas que crescem e mais saudáveis são os animais alimentados (Singh et al. 2011). Diversos micro-organismos têm sido testados com essa finalidade, principalmente estirpes microbianas cultivadas separadamente visando obter inóculos puros (Calvo, et al. 2014). Há evidências da interação entre micro-organismos influenciar o crescimento vegetal e a fertilidade do solo (Singh et al. 2011).

Considerando os diversos tipos, merece destaque os inoculantes contendo culturas mistas, capazes de produzir alguma combinação microbiana complexa e metabólitos a partir de processos fermentativos. EM (Micro-organismos Eficientes) é formado pela mistura de micro-organismos, incluindo bactérias e fungos, isolados de solos férteis e vegetais, e que coexistem sinergicamente em meio líquido fermentativo enriquecido com alguma fonte de açúcar (Higa, 2000; Bonfim et al. 2011). Foi descoberto por Teruo Higa com o objetivo de otimizar o uso da matéria orgânica na agricultura natural e atualmente é comercializado em diversos países (Bonfim et al. 2011). Todavia, formas caseiras de EM são manipuladas por famílias agrícolas que trabalham em sistemas agroecológicos, que objetivam redesenhar agroecossistemas mais sustentáveis (Altieri 1999).

O EM pode ser utilizado puro no solo, mas o desempenho é mais eficaz quando inoculado com resíduos orgânicos, de modo que possam acelerar os processos de degradação de substratos e liberar substâncias úteis à nutrição e ao crescimento de plantas e de outros micro-organismos (Daly e Stewart 1999). Dentre os resíduos comumente utilizados com EM, é destaque o esterco bovino, por ser reutilizado no mesmo sistema que é gerado. A reciclagem do esterco pelos micro-organismos eficientes contribui com

o aumento da produtividade das pastagens e com a redução do uso de adubos químicos nessas áreas. Daly e Stewart (1999) afirmam que, além de acelerar a decomposição de substratos orgânicos, o EM pode atuar positivamente no crescimento das plantas, produzir substâncias benéficas, tais como enzimas e hormônios, e controlar patógenos.

No Brasil, não é conhecido o efeito dos EMs em capim-marandu (*Urochloa brizantha*), mas há relatos do efeito desses inoculantes no crescimento e na composição química dos vegetais (Khaliq et al. 2006; Hu e Qi 2013; Sharif et al. 2015). Alguns insucessos obtidos ao aplicar EM no solo e em esterco têm causado preocupações e pesquisadores atribuem esses resultados a diversos fatores, notadamente a constituição genética e fisiológica do inóculo utilizado, a competição dos micro-organismos inoculados com os nativos, ao tipo de planta inoculada e fatores abióticos do solo, tais como pH, temperatura, teor de umidade e disponibilidade e qualidade de substrato (Van Veen et al. 1997).

O modo de avaliar a interação EM x microbiota nativa do solo, e EM x esterco, é pela análise da diversidade, estimada por técnicas moleculares. Algumas dessas técnicas foram utilizadas no estudo dos micro-organismos eficientes, incluindo a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (Van Vliet et al. 2006; Gaggìa et al. 2013), reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) (Ahn et al. 2014), análise de espaçador intergênico ribossomal (RISA) (Mayer et al. 2010) e sequenciamento (Gaggìa et al. 2013). Dentre essas, a PCR aliada ao DGGE são ferramentas eficientes no monitoramento das mudanças na estrutura da comunidade microbiana em resposta às mudanças ambientais e podem contribuir na avaliação do potencial prático dos micro-organismos eficientes.

Apesar da utilização dos EMs em diversas áreas, incluindo agricultura e pecuária, em diversas regiões do Brasil e da Terra, não é claro o respectivo perfil microbiano e também no sistema no qual é inoculado, além de pouco ser conhecido sobre o efeito da aplicação em gramíneas tropicais.

Assim, o objetivo foi analisar, pela técnica de PCR-DGGE, o perfil da comunidade microbiana em três inoculantes EMs de três origens, a eficiência no crescimento e na composição química de capim-marandu, cultivado em solo acrescido ou não de esterco bovino, e o perfil microbiano desse inoculante no ambiente de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento e arranjo experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e nos Laboratórios de Associações Micorrízicas e Genética Molecular de Micro-organismos pertencentes ao Departamento de Microbiologia, localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), e no Laboratório de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV/MG), Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Nesta região o clima é do tipo “Cwa”, segundo a classificação de Köppen (1948), e está a 648 m acima do nível do mar.

O delineamento adotado foi Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 4, o primeiro fator solo, sem e com esterco bovino, no segundo fator três tipos de EM (EM1, EM2 e EM3) e ainda o controle sem inoculação, com cinco repetições, totalizando 40 unidades experimentais.

Experimento em casa de vegetação

O solo utilizado, classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo (Embrapa, 2006), foi coletado na profundidade de 0-20 cm e as análises físico-químicas estão na Tabela 1. Foram acondicionados 8 kg desse solo em cada vaso de polietileno com capacidade de 7,5 litros. Dos 40 vasos com solo, 20 receberam 90 g de esterco, cuja caracterização físico-química também está na Tabela 1.

Cada vaso recebeu 10 sementes de capim-marandu. Antes do plantio, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30 s, seguida de imersão em hipoclorito de sódio por 10 min e lavadas por quatro vezes em água deionizada e esterilizada, o excesso de umidade foi retirado pela absorção em papel de filtro e foram semeadas. Após, os solos foram inoculados com EMs de três origens: 1) EM1 - EM comercial; 2) EM2 - produzido na região de Muriaé/MG; e 3) EM3 - produzido na região de Viçosa/MG, os dois últimos produzidos por famílias agrícolas.

Os EMs caseiros, 2 e 3, foram fabricados a partir de micro-organismos obtidos da Mata Atlântica utilizando como isca arroz cozido (700 g) colocado ao solo. Após a captura, o arroz com micro-organismos em garrafa juntamente com melão (200 mL) e água (1800 mL) foi submetido o processo fermentativo que cessado, o EM estava pronto

para uso (Bonfim et al. 2011). Quanto ao EM comercial, o fabricante informou estar composto por água, melaço de cana pasteurizado e micro-organismos naturais, sem alterações genéticas.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do solo e do esterco bovino utilizado no experimento.

Características	Solo	Características	Esterco bovino
pH	4,3	pH	7,4
P (mg/dm ³)	0,8	N (%)	3,10
K (mg/dm ³)	27	P (%)	1,61
Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³)	0,1	K (%)	3,60
Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³)	0,0	Ca (%)	3,4
Al ³⁺ (cmol _c /dm ³)	0,3	Mg (%)	0,82
H+Al (cmol _c /dm ³)	2,48	CO (%)	19,5
SB (cmol _c /dm ³)	0,17	C/N	6,29
CTC (t) (cmol _c /dm ³)	0,47	Umidade (% ao ar)	58,20
CTC (T) (cmol _c /dm ³)	2,65	Umidade (% estufa)	67,26
V (%)	6		
m (%)	64		
MO (dag/kg)	1,65		

pH (Potencial Hidrogeniônico); P (Fósforo); K (Potássio); Ca²⁺ (Cálcio); Mg²⁺ (Magnésio); Al³⁺ (Alumínio); H + Al (Acidez Trocável); SB (Soma de Bases Trocáveis); CTC (t) (Capacidade de Troca Catiônica Efetiva); CTC (T) (Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0); V (Índice de Saturação de Bases); m (Índice de Saturação de Alumínio); MO (Matéria Orgânica); N (Nitrogênio); CO (Carbono Orgânico); C/N (Relação de Carbono e Nitrogênio).

A dose de 100 mL de EM foi parcelada em três aplicações, o que resultou na inoculação, a cada mês, de 34 mL de EM diluído em 66 mL de água deionizada. O EM foi inoculado no dia da semeadura, um mês após a semeadura e dois meses após a semeadura. Após a germinação das sementes, foi realizado o desbaste, permanecendo três plantas por vaso. A irrigação das plantas foi diária, com doses fixas de água deionizada. As condições abióticas do experimento foram mantidas constantes.

Determinação do perfil microbiano

Com o objetivo de determinar a diversidade dos inoculantes foi extraído o DNA total a partir de 350 µL de solução de EM1, EM2 e EM3 usando o Kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Na avaliação da diversidade microbiana, após a inoculação dos EMs no solo com as plantas, amostras compostas de solo de cada tratamento em casa de vegetação foram coletadas logo após a primeira aplicação dos inoculantes e 30 dias depois. As amostras coletadas foram acondicionadas em papel alumínio, armazenadas em gelo, e no laboratório foram conservadas a -20 °C até a realização das análises. Na extração do DNA microbiano do solo foi utilizado 350 mg de amostras de solo com EM, na presença ou na ausência de esterco, empregando o Kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA extraído dos inoculantes e do solo foi amplificado pela técnica de PCR, utilizando os genes 18S rDNA e 16S rDNA. Os primers NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TCT TTG C-3') (White et al. 1990) e EF3 (5'-TCC TCT AAA TGA CCA AGT TTG-3') (Smit et al. 1999) foram utilizados ao amplificar os fragmentos de 18S rDNA gene, gerando um fragmento de 1700 pb. Com o intuito de ser obtido um fragmento de DNA menor visando a técnica de DGGE, uma segunda PCR, uma nested-PCR, foi realizada com os primers FR1-GC (5'-CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T-3') e FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Vainio e Hantula 2000), gerando um fragmento de 350 pb. Ao amplificar os fragmentos de 16S rDNA gene, os primers F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane 1991) foram utilizados, originando um fragmento de 1500 pb. Uma reação de nested-PCR também foi realizada com os primers U968-GC (CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAG AACCTTAC) (Nubel et al. 1996) e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane 1991).

A reação de PCR consistiu da mistura de 20 ng de DNA total, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mg mL⁻¹ de albumina de soro bovino (BSA), 0,2 µM de cada primer e 1,25 unidades de GoTaq® Flex DNA Polimerase (Promega, Madison, USA), totalizando 50 µL de reação. Os controles receberam água purificada (MilliQ®) em substituição ao DNA a fim de detectar possíveis contaminantes. As amplificações da PCR

foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler ep Gradient) nas seguintes condições: um ciclo inicial de 94 °C a 4 min, 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, 55 °C a 1 min, 72 °C a 2 min e uma extensão final de 72 °C a 10 min. Na realização da nested-PCR, foi utilizado 1 µL do produto da reação do primeiro PCR, a mesma mistura e as mesmas condições de amplificação descritas na primeira reação de PCR. A fim confirmar a presença dos produtos da PCR e da nested-PCR, 5 µL foram verificados por eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v, a 80 V por 80 min), corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV em sistema fotodocumentador (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

Os fragmentos obtidos pela técnica nested-PCR em amostras dos inoculantes EM e do solo foram analisadas pela técnica de DGGE. Uma alíquota de 15 µL da reação de nested-PCR foi aplicada em gel de poliacrilamida a 8% (p/v) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris/ácido acético/EDTA, pH 8,0). O gel foi preparado em gradiente de desnaturação variando de 35 a 55%, sendo a condição de 100% de desnaturação composta de ureia 7 mol L⁻¹ (Sigma, Cat#U5378) e formamida a 40% (v/v) (Sigma, Cat#F9037). O gel foi submetido a eletroforese vertical a 100 V por 12 horas a 60 °C. Após o término da eletroforese, os géis foram corados por 40 min em solução 1X de SYBR GOLD® (Sigma Aldrich), conforme recomendações do fabricante. As imagens dos géis foram observadas sob luz UV, capturadas e digitalizadas por meio do sistema de fotodocumentação Molecular Imaging (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

A análise do perfil microbiano dos inoculantes EM e do solo com e sem esterco foi realizada empregando o coeficiente de Dice e o método UPGMA na construção de dendrogramas com auxílio do programa Bionumerics® versão 6.0.

Características agronômicas e químicas

Foi avaliado o crescimento de capim-marandu durante 100 dias, o primeiro corte foi realizado 60 dias após a instalação do experimento. Nos 40 dias restantes, foi avaliada a rebrotação das plantas.

O comprimento da parte aérea (CPA), distância do ápice da maior folha até a base da planta, e o diâmetro do colmo (DC) de capim-marandu foram determinados aos 60 e 100 dias após a semeadura, com o auxílio de uma trena. O número de folhas (NF) também foi analisado neste período, considerando somente folhas com mais de 50% de áreas verdes.

As amostras colhidas após o primeiro corte da gramínea e após a rebrotação foram submetidas à pré-secagem a 55 °C, até peso constante, em estufa com ventilação forçada de ar. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de 1 mm e determinados os teores de matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN) e proteína bruta (PB) (Detmann et al. 2012). Em seguida, foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSRA), esta somente aos 100 dias

Análises estatísticas

Os dados de características agrônômicas e químicas foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste Tukey a 5% de significância, utilizando o programa Assistat versão 7.7 (Silva e Azevedo 2016).

RESULTADOS

Caracterização do perfil microbiano dos inoculantes EM pela técnica PCR-DGGE

A partir da análise de amplicons 18S e 16S pela técnica de PCR-DGGE foi possível observar a diversidade de fungos e bactérias nos inoculantes EMs de três origens.

A análise do dendrograma evidenciou diferenças no perfil da comunidade de fungos dos EMs 1, 2 e 3. Nos inoculantes EM foram observados dois grandes grupos principais, sendo o primeiro com 60% de similaridade e envolvendo principalmente as amostras do EM2 e EM3 (Figura 1). No segundo grupo, formado pelas amostras do EM1, houve 40% de similaridade.

A análise do perfil de bandas de DGGE das bactérias revelou um grupo principal formado pelas amostras de DNA do EM3 com 85% de similaridade (Figura 2). E novamente o EM1 ficou mais distante dos EMs 2 e 3.



Figura 1 - Análise de agrupamento, Dice-UPGMA, obtida pelo perfil de bandas de DGGE do gene 18S das comunidades microbianas de inoculantes EM de três origens. EM1 = Comercial; EM2 = Produzido na região de Muriaé; EM3 = Produzido na região de Viçosa; R1, R2 e R3 = Reações em triplicata.



Figura 2 - Análise de agrupamento, Dice-UPGMA, obtida pelo perfil de bandas de DGGE do gene 16S das comunidades microbianas de inoculantes EM de três origens. EM1 = Comercial; EM2 = Produzido na região de Muriaé; EM3 = Produzido na região de Viçosa; R1, R2 e R3 = Reações em triplicata.

Caracterização do perfil microbiano de solo e esterco pela técnica PCR-DGGE

A análise do dendrograma evidenciou diferenças no perfil da comunidade fúngica. No primeiro agrupamento, com 60% de similaridade, a análise resultou na formação de três subgrupos (Figura 3). Sendo um subgrupo, com 80% de similaridade, composto por solo analisado 30 dias após a adição de esterco e solo puro inicial, bem como amostras

que receberam a primeira dose de EM1 e as que foram coletadas 30 dias após essa inoculação; outro subgrupo com similaridade de aproximadamente 85% entre o solo que recebeu somente esterco e o que recebeu esterco com a primeira aplicação de EM1, EM2 e EM3. E por fim o terceiro subgrupo foi formado por EM1 e EM2 inoculado em solo com esterco e coletado após 30 dias da aplicação da primeira dose do EM e com aproximadamente 77% de similaridade. O segundo grupo houve aproximadamente 55% de similaridade e reuniu amostras de solo que receberam EM2 e EM3 coletadas após receberem a primeira dose de EM e ao final de 30 dias de experimento.

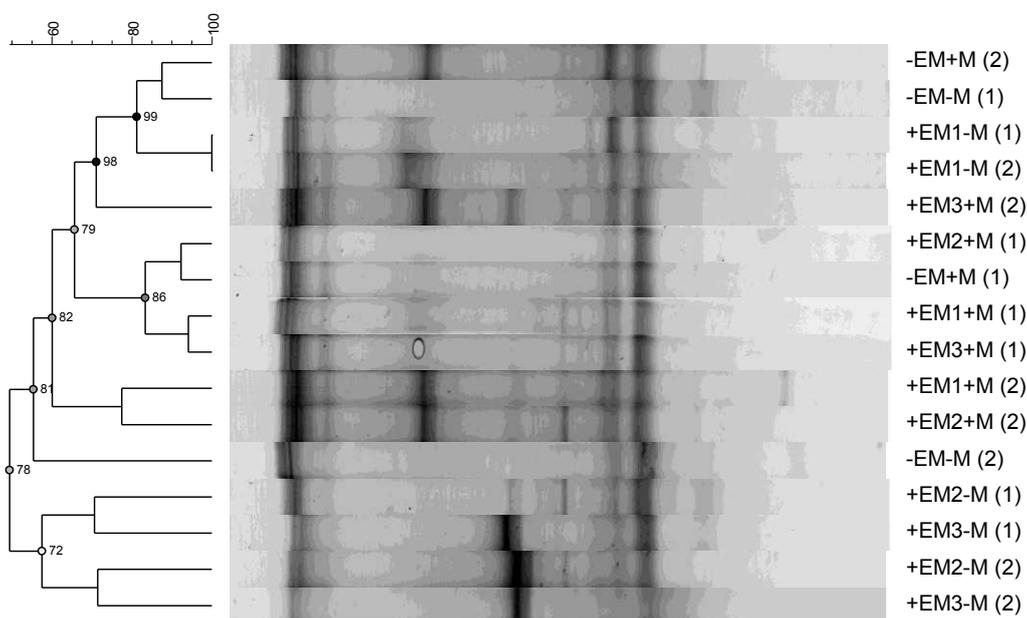


Figura 3 - Análise de agrupamento, Dice-UPGMA, obtida pelo perfil de bandas de DGGE do gene 18S das comunidades microbianas de solo que receberam EMs de três origens (EM1, EM2 ou EM3) e esterco bovino. +EM1, +EM2 e +EM3 = com EM; +M = com esterco; -EM = sem EM; -M = sem esterco; (1) = solo que recebeu a primeira aplicação de EM1, EM2 ou EM3; (2) = solo 30 dias após a primeira aplicação de EM1, EM2 ou EM3.

A análise de agrupamento mostrou a comunidade bacteriana do solo formado por quatro grupos distintos (Figura 4). O primeiro grupo reuniu, com 75% de similaridade, amostras de solo inoculadas com EM2 e EM3 sem adição de esterco nas duas épocas avaliadas. Já o segundo grupo com 78% de similaridade, agrupou EM1, EM2 e EM3 adicionados em esterco e o solo sem adição de EM, sendo todas as amostras analisadas

30 dias após a aplicação dos inoculantes. O terceiro agrupamento combinou, também com 78% de similaridade, as mesmas amostras do primeiro, mas que foram analisadas no início do experimento. O último grupo, com 82% de similaridade, reuniu amostras de solo puro inicial e solo que recebeu a primeira dose de EM1.

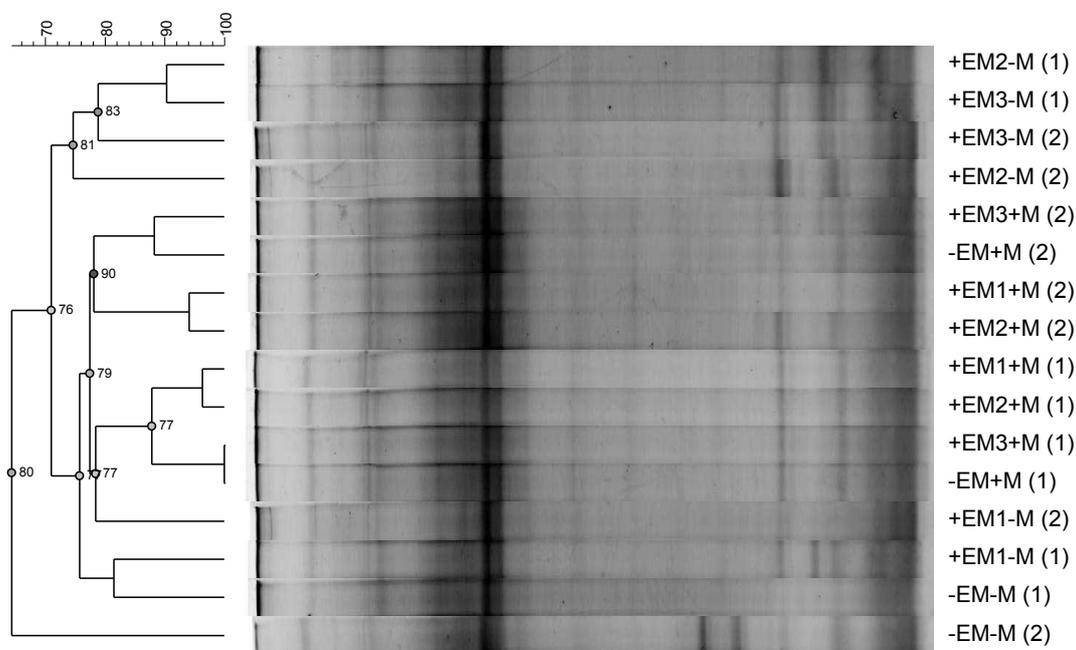


Figura 4 - Análise de agrupamento, Dice-UPGMA, obtida pelo perfil de bandas de DGGE do gene 16S das comunidades microbianas de solo que receberam EMs de três origens (EM1, EM2 ou EM3) e esterco bovino. +EM1, +EM2 e +EM3 = com EM; +M = com esterco; -EM = sem EM; -M = sem esterco; (1) = solo que recebeu a primeira aplicação de EM1, EM2 ou EM3; (2) = solo 30 dias após a primeira aplicação de EM1, EM2 ou EM3.

Efeito do esterco e EM sobre o crescimento do capim-marandu

Não houve interação entre esterco e os inoculantes EM ($P > 0,05$). O esterco apresentou efeito marcante sobre todas as variáveis de crescimento do capim-marandu ($P < 0,05$) (Tabela 2). Quanto ao efeito dos micro-organismos eficientes (EM), na ausência de esterco, o EM2 aumentou o comprimento da parte aérea - CPA (31,94%), o diâmetro do colmo - DC (30%) e a massa seca da parte aérea - MSPA (100%) da forrageira em seu primeiro corte e o CPA (104,12%) no segundo (Tabela 3).

Tabela 2 - Características agronômicas de capim-marandu na ausência e presença de esterco bovino, aos 60 e 100 dias pós semeadura.

Item	Primeiro corte				Segundo corte			
	(60 dias)		EP	P valor	(100 dias)		EP	P valor
	Sem esterco	Com esterco			Sem esterco	Com esterco		
CPA, cm	16,78	83,35	0,998	0,001	7,20	47,00	1,556	0,001
DC, cm	1,98	2,26	0,097	0,048	0,22	2,03	0,047	0,001
NF	2,22	29,50	0,639	0,001	1,48	36,13	0,653	0,001
MSRA, g	-	-	-	-	0,16	18,07	0,517	0,001
MSPA, g	0,16	20,58	0,606	0,001	0,11	10,43	0,288	0,001

EP = erro padrão da média; CPA = comprimento da parte aérea; DC = diâmetro do colmo (perfilhos); NF = número de folhas; MSRA = massa seca da raiz; MSPA = massa seca da parte aérea.

Tabela 3 - Características agronômicas de capim-marandu inoculado com Microorganismos Eficientes (EM) de três origens, crescidas na ausência de esterco bovino, aos 60 e 100 dias pós semeadura.

Item	Tratamentos				EP	P valor
	Controle	EM 1	EM 2	EM 3		
Primeiro corte (60 dias)						
CPA, cm	15,84 ^b	15,25 ^b	20,90 ^a	15,14 ^b	1,45	0,037
DC, cm	2,00 ^b	1,28 ^c	2,60 ^a	2,03 ^b	0,14	0,001
NF	2,20	2,00	2,67	2,00	0,19	0,087
MSPA, g	0,13 ^{ab}	0,11 ^b	0,26 ^a	0,13 ^{ab}	0,03	0,018
Segundo corte (100 dias)						
CPA, cm	6,79 ^{ab}	5,07 ^{ab}	13,86 ^a	3,07 ^b	2,39	0,030
DC, cm	0,13	0,10	0,23	0,40	0,10	0,173
NF	1,27	0,87	2,73	1,07	0,48	0,055
MSRA, g	0,11	0,07	0,39	0,08	0,09	0,054
MSPA, g	0,08	0,03	0,28	0,03	0,08	0,110

Controle = sem adição de esterco bovino e sem EM; EMs 1, 2 e 3 = EM puro, sendo EM comercial (EM1), EM produzido na região de Muriaé/MG por famílias agrícolas (EM2) e EM produzido na região de Viçosa/MG também por famílias agrícolas (EM3); EP = erro padrão da média; CPA = comprimento da parte aérea; DC = diâmetro do colmo (perfilhos); NF = número de folhas; MSPA = massa seca da parte aérea; MSRA = massa seca da raiz. As medidas seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nos tratamentos que receberam esterco, a aplicação do EM1 resultou na redução de 17,14% do DC do capim-marandu, sem afetar as demais características agrônômicas, analisadas aos 60 e 100 dias de experimento ($P>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Características agrônômicas de capim-marandu inoculado com Microorganismos Eficientes (EM) de três origens, crescidas na presença de esterco bovino, aos 60 e 100 dias pós semeadura.

Item	Tratamentos				EP	P valor
	Controle	EM 1	EM 2	EM 3		
Primeiro corte (60 dias)						
CPA, cm	82,11	85,64	81,37	84,31	2,28	0,539
DC, cm	2,51 ^a	2,08 ^b	2,16 ^{ab}	2,28 ^{ab}	0,09	0,019
NF	28,80	30,80	29,87	28,53	1,91	0,827
MSPA, g	18,95	23,20	21,40	18,76	1,62	0,204
Segundo corte (100 dias)						
CPA, cm	50,29	41,83	49,57	46,31	3,22	0,271
DC, cm	2,00	2,11	2,02	1,97	0,09	0,697
NF	35,60	37,73	36,53	34,67	1,83	0,681
MSRA, g	16,86	18,02	18,72	18,67	1,54	0,815
MSPA, g	10,69	9,26	11,50	10,25	0,79	0,276

Controle = com adição de esterco bovino e sem EM; EMs 1, 2 e 3 = EM com esterco, sendo EM comercial (EM1), EM produzido na região de Muriaé/MG por famílias agrícolas (EM2) e EM produzido na região de Viçosa/MG também por famílias agrícolas (EM3); EP = erro padrão da média; CPA = comprimento da parte aérea; DC = diâmetro do colmo (perfilhos); NF = número de folhas; MSPA = massa seca da parte aérea; MSRA = massa seca da raiz. As médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Efeito do EM sobre a composição química do capim-marandu

Quanto à composição química do capim-marandu, o teor de fibra em detergente neutro - FDN, quantificado no primeiro corte das plantas, foi reduzido em 6% com a inoculação de EM2, quando crescido em solo adicionado de esterco, em relação ao controle. O aumento de 86% no teor de proteína bruta - PB em relação ao controle foi obtido quando EM2 foi inoculado em esterco (Tabela 5).

Tabela 5 - Características químicas de capim-marandu inoculado com Micro-organismos Eficientes (EM) de diferentes origens, crescidas na presença de esterco bovino, aos 60 dias pós semeadura.

Item	Tratamentos				EP	P valor
	Controle	EM 1	EM 2	EM 3		
FDN, %	65,62 ^a	63,22 ^{ab}	61,64 ^b	64,36 ^{ab}	0,79	0,018
PB, %	8,29 ^b	10,03 ^{ab}	15,39 ^a	9,76 ^{ab}	1,54	0,025

Controle = com adição de esterco bovino e sem EM; EMs 1, 2 e 3 = EM com esterco, sendo EM comercial (EM1), EM produzido na região de Muriaé/MG por famílias agrícolas (EM2) e EM produzido na região de Viçosa/MG também por famílias agrícolas (EM3); EP = erro padrão da média; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; PB = proteína bruta. As médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

A técnica de PCR-DGGE evidenciou diferenças dos inoculantes EM2 e EM3 com relação ao EM1, quanto à comunidade de fungos e bactérias, o que pode ser em função do modo e do local de produção. A maior similaridade entre EM2 e EM3 pode estar relacionada com o fato desses EMs terem origem caseira e serem produzidos a partir de micro-organismos capturados na Zona da Mata de Minas Gerais. Já o EM 1 é produzido com fins comerciais, assim, o processo de fabricação e, conseqüentemente, a composição, podem ser diferenciados. Diferenças no perfil bacteriano foram também observadas quando EMs de inoculante estoque foram reativados por vários produtores (Van Vliet et al. 2006), mostrando que o modo de preparo do EM e sua multiplicação podem interferir na diversidade dos micro-organismos.

Os padrões de bandas obtidos da comunidade de fungos e bactérias do solo em estudo, revelaram o agrupamento das amostras em função da presença ou ausência de esterco bovino e do período de avaliação do solo (logo após a aplicação dos EMs e 30 dias depois), o que indicou alterações na estrutura da comunidade microbiana.

No entanto, o agrupamento e a similaridade do perfil bacteriano de amostras que foram tratadas com EM1, EM2 e EM3 em solo acrescido de esterco em relação ao controle com esterco puro indica que a captura do EM a partir do solo de matas pode ter contribuído na similaridade com a composição bacteriana do ambiente, principalmente

de esterco. Semelhanças entre o perfil bacteriano de EMs e esterco também foram relatadas em outro trabalho (Van Vliet et al. 2006).

Porém, na comunidade de fungos, amostras de solo acrescidas de esterco e inoculadas com EM1 e EM2 (e avaliadas 30 dias após a inoculação) não foram agrupadas com as amostras tratadas com apenas esterco puro (também avaliadas 30 dias após a inoculação). Neste caso, a aplicação de esterco no solo provocou efeito mais pronunciado na comunidade fúngica dos EMs 1 e 2 quando comparada à comunidade bacteriana dos inoculantes.

No solo com esterco houve maior efeito sobre o crescimento do capim-marandu, quando comparado com o solo sem esterco, acrescido de EM puro, o que pode ser atribuído à acidez e a baixa fertilidade do solo utilizado. Redução de crescimento e produção vegetal foi observada quando algodão foi cultivado com EM puro, sem esterco (Khaliq et al. 2006), mostrando que a oferta de matéria orgânica em quantidade insuficiente às demandas dos micro-organismos e das plantas pode influenciar o seu desenvolvimento. No entanto, mesmo na ausência de esterco, EM2 promoveu o crescimento do capim-marandu, significando diferencial na composição microbiana ou bioquímica desse inoculante. Possivelmente, metabólitos produzidos pelo processo fermentativo do EM, como enzimas, hormônios, vitaminas e substâncias bioativas (Higa, 2000), podem ter estimulado o crescimento do capim-marandu.

O efeito do EM no crescimento do capim-marandu cultivado em solo com esterco não foi evidente, o que pode ser atribuído à presença de grande quantidade de nutrientes no esterco, fazendo com que, nestas condições, atendesse as necessidades nutricionais do capim-marandu. Resultados semelhantes foram encontrados em *Lolium perene*, onde a adição de EM no esterco não afetou a biomassa vegetal (Van Vliet et al. 2006).

O teor de PB em capim-marandu foi influenciado pelo inoculante EM quando associado ao esterco, onde 15,39% de PB foi encontrada no tratamento com EM2. A quantidade de PB evidenciada nesse estudo está acima do esperado no capim-marandu, haja vista que, teores de 8,1 a 12,5% (13 a 20 g kg⁻¹ de nitrogênio) são considerados adequados a essa espécie. Esse aumento no teor de PB do capim-marandu pode estar relacionado à melhor nutrição dessa espécie com nitrogênio a partir da mineralização do esterco pelo inoculante EM2. Elevados teores de nitrogênio em algodão também foram encontrados quando EM e matéria orgânica foram combinados (Khaliq et al. 2006). Da mesma forma, a aplicação de EM aumentou o teor de nitrogênio de trigo (Hu e Qi 2013) e girassol (Sharif et al. 2015) quando esse inoculante foi respectivamente associado a

composto orgânico e esterco com fosfato de rocha. Conclusivamente a inoculação de EM com materiais orgânicos pode interferir na composição proteica das plantas.

A mineralização do esterco pelo inoculante EM2 pode estar associada à baixa relação C:N do esterco (6,29). Essa relação C:N pode ter facilitado a decomposição da matéria orgânica do solo pelos micro-organismos eficientes, com maior liberação de nitrogênio às plantas e, conseqüentemente, maior síntese proteica.

A inoculação de EM em conjunto com esterco promoveu a redução no teor de FDN do capim-marandu. Valores de FDN são determinantes na qualidade das forragens, considerando que o aumento de frações menos digeríveis, como celulose, hemicelulose e lignina, podem limitar a capacidade digestória dos animais. Assim, quanto menor o teor de FDN nas plantas, maior a capacidade digestória dos animais. Conforme Van Soest (1994), valores de FDN acima de 60% correlacionam negativamente com o consumo e, neste estudo, EM2 manteve os teores de FDN próximos de 60%.

CONCLUSÕES

Inoculantes EM de três origens diferem quando a estrutura da comunidade de fungos e bactérias.

A presença e a ausência de esterco no solo determinaram o perfil bacteriano e fúngico, com efeito pronunciado do esterco na comunidade fúngica dos solos que receberam EMs 1 e 2.

A estratégia de utilização do EM pode trazer benefícios às culturas, mas resultados positivos dependem da origem desse inoculante, e conseqüente composição da comunidade microbiana, e a presença ou não do esterco.

Os EMs em conjunto com o esterco bovino têm potencial de aumentar os teores de PB e diminuir os de FDN, quando aplicados em capim-marandu, incrementando a eficiência dessa fonte orgânica de nutriente.

Estudos devem ser conduzidos visando entender melhor esse processo, incluindo outras espécies vegetais, análise da composição química dos EMs e a quantidade e qualidade dos estercos e, ou da matéria orgânica adicionada.

REFERÊNCIAS

- Ahn K, Lee KB, Kim YJ, Koo YM. Quantitative analysis of the three main genera in effective microorganisms using qPCR. *Korean J Chem Eng.* 2014;31: 849-854.
- Altieri M. Bases científicas para uma agricultura sustentável. Montevideo: Nordan Comunidad; 1999.
- Bonfim FPG, Honório ICG, Reis IL, Pereira AJ, Souza DB. Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia; 2011.
- Calvo P, Nelson L, Kloepper JW. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil.* 2014;383: 3-41.
- Daly MJ, Stewart DPC. Influence of "effective microorganisms" (EM) on vegetable production and carbon mineralization - a preliminary investigation. *J Sustainable Agric.* 1999;14: 15–25.
- Detmann E, Souza MA, Valadares Filho SC, Queiroz AC, Berchielli TT, Saliba EOS, et al. Métodos para Análise de Alimentos - INCT - Ciência Animal. Visconde do Rio Branco: Suprema; 2012.
- Dias-Filho MB. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; 2014.
- Embrapa. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro: Embrapa Solos; 2006.
- Gaggia F, Baffoni L, Gioia DD, Accorsi M, Bosi S, Marotti I, et al. Inoculation with microorganisms of *Lolium perenne* L.: evaluation of plant growth parameters and endophytic colonization of roots. *N Biotechnol.* 2013;30: 695-704.
- Higa T. What is EM technology? *EM World Journal.* 2000;1: 1-6.
- Hu C, Qi Y. Long-term effective microorganisms application promote growth and increase yields and nutrition of wheat in China. *Eur J Agron.* 2013;46: 63–67.
- Khaliq A, Abbasi MK, Hussain T. Effects of integrated use of organic and inorganic nutrient sources with effective microorganisms (EM) on seed cotton yield in Pakistan. *Bioresour Technol.* 2006;97: 967–972.
- Koeppen W. Climatologia. Buenos Aires: Gráfica Panamericana; 1948.
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (ed) Stackebrandt E, Goodfellow M. New York: Wiley. 1991; pp. 115–175.
- Mayer J, Scheid S, Widmera SSF, Fließbach A, Oberholzera HR. How effective are 'Effective microorganisms® (EM)'? Results from a field study in temperate climate. *Appl Soil Ecol.* 2010;46: 230-239.
- Nubel U, Engelen B, Felske A, Snaird A, Wieshuber A, Amann RI, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 1996;178: 5636–5643.

- Park SG, Khan AR, Kwak Y, Hong SJ, Jung BK, Ullah I, et al. An improved effective microorganism (EM) soil ball-making method for water quality restoration. *Environ Sci Pollut Res.* 2016;23: 1100-1107.
- Santos MP, Castro YO, Marques RC, Pereira DRM, Godoy MM, Reges NPR. Importância da calagem, adubações tradicionais e alternativas na produção de plantas forrageiras: Revisão. *Pub Med Vete Zoo.* 2016;10: 1-12.
- Sharif M, Khan M, Khan MA, Wahid F, Marwat KB, Khattak AM, et al. Effect of rock phosphate and farmyard manure applied with effective microorganisms on the yield and nutrient uptake of wheat and sunflower crops. *Pak J Bot.* 2015;47: 219-226.
- Silva FAS, Azevedo CAV. The Assisat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr J Agric Res* 2016;11: 3733-3740.
- Singh JS, Pandey VC, Singh DP. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric Ecosyst Environ.* 2011;140: 339–353.
- Smit E, Leeflang P, Glandorf B, Van Elsas JD, Wernars K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65: 2614-2621.
- USDA-United States Department of Agriculture. IOP Publishing PhysicsWeb; 2016. Available from: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/>.
- Vainio EJ, Hantula J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res.* 2000;104: 927–936.
- Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca: Cornell University; 1994.
- Van Veen JA, Van Overbeek LS, Van Elsas JD. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61: 121-135.
- Van Vliet PCJ, Bloem J, Goede RGM. Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition of Effective Micro-organisms1 (EM) to slurry manure. *Appl Soil Ecol.* 2006;32: 188–198.
- Werner JC, Paulino VT, Cantarella H, Quaggio JA, Andrade NO. Forrageiras. In: Raij Van B, Cantarella H, Quaggio JA, Furlani AMC. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.* Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC; 1997.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* Orlando, USA: Academic Press; 1990. pp. 315-322.

CAPÍTULO II

MICRO-ORGANISMOS EFICIENTES: COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA E EFEITO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAPIM-MARANDU

RESUMO

Os Micro-organismos Eficientes (EM) são inoculantes formados por fungos e bactérias isolados de matas e que podem influenciar a germinação de sementes. No entanto, não foram encontrados trabalhos identificando a respectiva composição microbiana. Este estudo objetivou analisar a diversidade por sequenciamento Illumina MiSeq e caracterizar taxonomicamente fungos e bactérias de três inoculantes EM de origens distintas, além de avaliar a respectiva eficiência na germinação de sementes de capim-marandu. O DNA dos três inoculantes EM (EM•1®: comercial; EM2: caseiro; EM3: caseiro) foi extraído, seguido de amplificação por PCR do gene rRNA 16S e da região ITS de fungos e do sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq. Testes de germinação no delineamento estatístico Inteiramente Casualizado (DIC) foram conduzidos com esquema fatorial 3 x 3 x 2 + 1 (controle positivo) + 2 (controles negativos) e quatro repetições de 50 sementes, sendo que os tratamentos consistiram de: pré-tratamentos com três tipos de EM (EM•1®, EM 2 e EM3) em três concentrações (1% em água; 2% em água e 100% de EM) e dois tempos de imersão (5 min e 24 h); pré-tratamentos com ácido sulfúrico 18% por 15 min e com água (5 min e 24 h). O grupo de bactérias foi o mais abundante nos EMs, seguido pelos fungos. EMs 2 e 3 não compartilharam unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de fungos, no entanto, algumas UTOs bacterianas foram compartilhadas por todos os EMs. Muitas dessas bactérias são promotoras de crescimento vegetal e produzem fitormônios, o que pode justificar a eficiência destes inoculantes na germinação de sementes. Pré-tratamentos de capim-marandu com os três EMs resultaram em maior %G e IVG quando EM foi utilizado na concentração 1 e 2% em água. A imersão das sementes por 5 min foi mais eficiente, comparada a imersão por 24h. A %G e o IVG das sementes tratadas com ácido sulfúrico não diferiram dos tratamentos com EM, mas ambos foram superiores ao controle.

Palavras-chave: ácido sulfúrico, diversidade, dormência, sequenciamento.

INTRODUÇÃO

Novas tecnologias têm sido produzidas com o intuito de aumentar a produção agrícola, todavia, algumas, incluindo o uso de adubos químicos e agrotóxicos, tem custo elevado e efeitos adversos sobre o ambiente. A agroecologia está emergindo como ciência com potencial de redesenhar agroecossistemas mais sustentáveis (Altieri 1999) e aumentar a função de agentes biológicos do solo. Assim, diversas pesquisas têm buscado desenvolver estratégias que aumentem a produtividade das culturas agronômicas com a inoculação de micro-organismos.

Entre os micro-organismos com grande potencial de solucionar diversos problemas da agricultura em função da eficácia, compatibilidade ambiental e custo-benefício, estão os Micro-organismos Eficientes (EM), inoculante formado por fungos e bactérias isolados de solos e passíveis de coexistirem em meio líquido fermentativo (Higa 2000; Bonfim et al. 2011). Estes micro-organismos foram isolados primeiramente no Japão pelo Dr. Teruo Higa, que os nomeou “Effective Microorganisms”, mas atualmente diversas famílias agrícolas já produzem seus próprios micro-organismos eficientes.

Pesquisas têm demonstrado que o EM pode ser utilizado em diversas áreas, incluindo agricultura e pecuária. Este uso é via inoculação em culturas agronômicas a fim de gerar ambiente favorável ao desenvolvimento das plantas (Olle e Williams 2015). A interação do EM com o ecossistema solo-planta promove antagonismo a patógenos, fornecimento de nutrientes a partir da decomposição de substratos orgânicos, equilíbrio da microbiota do solo e liberação de substâncias promotoras de germinação de sementes e crescimento vegetal (Bonfim et al. 2011).

Em meio às diversas utilidades do EM, a capacidade de estimular a germinação de sementes merece atenção, por beneficiar na pecuária brasileira, a crescente produção de sementes forrageiras. No Brasil, esse setor demanda grande produção, consumo e exportação, alcançando 115 milhões de hectares em área de pastagem, das quais 67% está ocupada pelo capim-marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) (Cardoso et al. 2014). Todavia, essa gramínea tem baixa porcentagem de germinação devido a dormência das sementes, de origem mecânica ou originada pela impermeabilidade da semente à gases e água, ou fisiológica, relacionada com a presença de substâncias inibidoras da germinação (Bewley e Black 1994). As consequências dessa dormência é a desuniformidade das pastagens, favorecendo a emergência de plantas espontâneas.

Metodologias de pré-tratamento de sementes têm sido testadas a fim de superar a dormência em capim-marandu e incluem tratamentos térmicos; hormonais; escarificação com ácido sulfúrico (H₂SO₄); ácidos húmicos e envelhecimento artificial. No entanto, algumas dessas técnicas são onerosas, inviabilizando o processo, ou são demoradas, afetando a comercialização das sementes.

No Brasil, não está conhecido o efeito dos micro-organismos eficientes na germinação de sementes de capim-marandu, mas em outras espécies vegetais estão disponíveis alguns trabalhos (Faltyn e Miszkiele 2008; Ertekin 2011; Van Tonder et al. 2014) tendo sido observado aumento da germinação das sementes com uso do EM. Khan et al. (2006) revelaram que EM em concentrações de 1% e 2% em água melhorou a germinação de sementes de *Albizia saman*. Em outros dois estudos, os mesmos autores evidenciaram que baixas concentrações de EM (2%) promoveram a máxima germinação em sementes de *Dalbergia sissoo* (Khan et al. 2011) e *Acacia auriculiformis* (Khan et al. 2014). Na espécie de *Harpagophytum procumbens*, Mowa e Maass (2012) observaram 32% de germinação em sementes pré-tratadas com EM, enquanto que os pré-tratamentos com ácido sulfúrico e água germinaram 17% e 5,3%, respectivamente.

Apesar da tecnologia EM ter sido difundida por diversas áreas e países, ainda é desconhecida a real composição desta comunidade microbiana, sendo cada vez maior o interesse pelo seu estudo, por desempenhar funções integrais e únicos no ecossistema. No entanto, a identificação de micro-organismos do EM é complexa devido a diversificada comunidade e ao fato das técnicas tradicionais de crescimento controlado serem limitadas (Streit e Schmitz 2004).

Na tentativa de superar as limitações associadas às técnicas de cultivo, diversas metodologias moleculares têm sido desenvolvidas. Considerando essas técnicas, o sequenciamento na plataforma Illumina é destaque pela análise genômica de comunidades microbianas não cultiváveis (Pessoa Filho 2010).

O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade por sequenciamento Illumina MiSeq e caracterizar taxonomicamente fungos e bactérias de três inoculantes EM de origens distintas, além de avaliar a respectiva eficiência na germinação de sementes de capim-marandu.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Associações Micorrízicas e Genética Molecular de Micro-organismos pertencentes ao Departamento de Microbiologia, localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. No município de Viçosa o clima é do tipo “Cwa”, segundo a classificação de Köppen (1948), e está localizado a 648 m acima do nível do mar.

Amostragem

Três EMs de distintas origens foram utilizados neste estudo, incluindo: 1) EM comercial (EM•1[®]), desenvolvido por Teruo Higa, no Japão, e comercializado, no Brasil, pela empresa AMBIEM LTDA; 2) EM produzido na região de Muriaé/MG por famílias agrícolas (EM2); e 3) EM produzido na região de Viçosa/MG também por famílias agrícolas (EM3).

Os EMs caseiros, 2 e 3, foram fabricados a partir de micro-organismos obtidos da Mata Atlântica utilizando como isca arroz cozido (700 g) colocado ao solo. Após a captura, o arroz com micro-organismos em garrafa juntamente com melão (200 mL) e água (1800 mL) foi submetido o processo fermentativo que cessado, o EM estava pronto para uso (Bonfim et al. 2011). Quanto ao EM comercial, o fabricante informou estar composto por água, melão de cana pasteurizado e micro-organismos naturais, sem alterações genéticas.

Extração de DNA, amplificação por PCR e por Illumina MiSeq

Ao determinar a composição fúngica e bacteriana dos três EMs, o DNA total dos inoculantes foi extraído usando o Kit NucleoSpin[®] Soil (Macherey-Nagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR e sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq.

Na amplificação da região do rRNA 16S foram utilizados os primers 515F e 806R (Caporaso et al. 2012). Já a região ITS1 foi amplificada com os primers ITS1f

(CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Gardes e Bruns 1993) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (White et al. 1990). Na reação de amplificação, foi adicionado 10 µL de 5x Prime HotMasterMix (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), 1 µL de cada primer, 1 µL do DNA total e 12 µL de água MoBio para PCR, totalizando 25 µL de reação. As condições de PCR foram: um ciclo inicial de 94 °C a 3 min, 35 ciclos a 94 °C durante 45 s, 50 °C a 60 s, 72 °C a 90 s e a extensão final de 72 °C a 10 min.

A purificação dos amplicons foi realizada por meio do Kit UltraClean® PCR Clean-Up (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) e a quantificação utilizou o Qubit® (Invitrogen pela Life Technologies). Em seguida, cada fragmento amplificado foi diluído a 2 nM, desnaturado e novamente diluído a concentração final de 6,75 pM visando a sequenciação em Illumina MiSeq.

Processamento e análise dos dados de sequenciamento

Os dados de sequenciamento dos genes 16S rRNA e ITS gerados no Illumina MiSeq foram analisados a partir insights do Microbial Ecology Software (Qiiime v.1.8.0) (Caporaso et al. 2010; Bokulich et al. 2013) e do protocolo Brazilian Microbiome Project (PYLRO et al., 2014a; 2014b). Nas análises do gene 16S rRNA foi utilizado, na etapa de limpeza, 200 pb como comprimento mínimo de sequências e 25 como pontuação mínima de qualidade. Bases ambíguas e leituras truncadas inferiores a 240 pb foram descartadas. As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram separadas com base em sequências com mais de 97% de similaridade a partir do método Uparse em Usearch 7 (Edgar 2013).

Na a análise do gene ITS, apenas alguns parâmetros diferem das descrições do gene 16S rRNA, incluindo o descarte de leituras truncadas inferiores a 140 pb e a atribuição da taxonomia das OTUs a partir do banco de dados UNITE (Koljalg et al. 2014).

Análise da diversidade

Análise de diversidade alfa (dentro da amostra) foi realizada pelo software Qiiime (Lozupone et al. 2007) e pertinentemente foi calculado: Total de OTUs de cada amostra; Índice Chao, que estima a riqueza de espécies; Índice Shannon, que estima a diversidade de espécies; Índice Simpson, que estima a probabilidade de dois indivíduos, selecionados

ao acaso, pertencerem à mesma espécie; Porcentagem de Cobertura, que estima a diversidade total amostrada e a Equitabilidade, que estima o padrão de distribuição de indivíduos entre as espécies. Diagramas de Veen também foram construídos (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Delineamento experimental

O teste de germinação foi conduzido em delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), no esquema fatorial 3 (EM•1®, EM 2 e EM 3) x 3 (1% em água; 2% em água e 100% de EM) x 2 (5 min e 24 h) + 1 controle positivo (H₂SO₄) + 2 controles negativos (água 5 min e 24 h) e quatro repetições com 50 sementes, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos experimentais.

Pré-tratamento	Concentração	Tempo
EM•1®	1%	5 min
EM•1®	1%	24 h
EM•1®	2%	5 min
EM•1®	2%	24 h
EM•1®	100%	5 min
EM•1®	100%	24 h
EM2	1%	5 min
EM2	1%	24 h
EM2	2%	5 min
EM2	2%	24 h
EM2	100%	5 min
EM2	100%	24 h
EM3	1%	5 min
EM3	1%	24 h
EM3	2%	5 min
EM3	2%	24 h
EM3	100%	5 min
EM3	100%	24 h
H ₂ SO ₄	18%	15 min
H ₂ O	100%	5 min
H ₂ O	100%	24 h

Pré-tratamentos: EM•1®: comercial, EM2: produzido na região de Muriaé/MG por famílias agrícolas, EM3: produzido na região de Viçosa/MG por famílias agrícolas, H₂SO₄: ácido sulfúrico, H₂O: água; Concentrações: 1%: EMs diluídos em água; 2%: EMs diluídos em água, 100%: EMs puros, 18%: H₂SO₄ diluído em água; Tempos: 5 min: imersão por 5 min, 24h: imersão por 24h.

Experimento de germinação

Visando a desinfestação superficial, todas as sementes de capim-marandu foram imersas em solução de etanol a 70% (v/v) por 30 segundos. Em seguida, as sementes foram imersas por 5 minutos ou 24 horas em inoculante EM na concentração 1 ou 2 %,

preparadas com a adição de água deionizada, ou em solução com 100% de EM. No tratamento com ácido sulfúrico as sementes foram imersas no ácido a 18% por 15 minutos e, em seguida, lavadas em água deionizada (Mowa e Maass 2012).

Após a imersão nos tratamentos, as sementes foram acondicionadas em placas de Petri com papel filtro umedecido com volume de água deionizada equivalente a 3 vezes o respectivo peso e armazenadas a 25 °C (Brasil 1992). Contagens diárias do número de plântulas foram realizadas ao longo de 30 dias, após a instalação do teste. Sementes com protrusões da raiz primária de pelo menos 5 mm foram consideradas germinadas.

O Percentual de Germinação (%G) foi calculado a partir da contagem diária das sementes germinadas (Brasil 1992) e utilizando a fórmula $G\% = NG \times 100/NT$, onde “NG” é o número de sementes germinadas e “NT” é o número total de sementes colocadas a germinar. O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Maguire 1962) foi calculado pela fórmula $IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + (G3/N3) + \dots + (GN/NN)$, onde “G” é o número de sementes germinadas e “N” é o número de dias decorrentes da primeira, segunda e última avaliação.

Análises estatísticas

Os dados de %G e IVG obtidos foram submetidos a análise de variância no programa Minitab versão 17 (McKenzie e Goldman 1999) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

RESULTADOS

Resultados das sequências

O sequenciamento Illumina MiSeq do inoculante EM2 gerou 1.471 sequências da região ITS de fungos. Em EM3 foram obtidas 301 sequências, também na região ITS. Na região 16S rRNA foram obtidas 21.037 sequências do EM•1®, 23.356 sequências do EM2 e 35.368 sequências do EM3 (Tabela 2).

Tabela 2 - Total de OTUs, riqueza de espécies, estimativa de diversidade e equitabilidade.

Fungi	OTUs¹	Chao²	Shannon³	Simpson⁴	%Cobertura⁵	Equitabilidade⁶
EM•1®	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
EM2	3	6	1,37	0,50	100	0,53
EM3	4	6	1,51	0,58	100	0,58
Bacteria	OTUs¹	Chao²	Shannon³	Simpson⁴	%Cobertura⁵	Equitabilidade⁶
EM•1®	63	63,50	3,48	0,77	99,99	0,58
EM2	84	85,50	1,65	0,40	99,98	0,26
EM3	58	59,25	2,47	0,78	99,99	0,42

¹ Conjunto de leituras com 97% de similaridade.

² Estima a riqueza de espécies pelo total de OTUs.

³ Estima a riqueza de espécies pela abundância individual.

⁴ Estima a probabilidade de dois indivíduos pertencerem à mesma espécie.

⁵ Estima a diversidade total amostrada.

⁶ Estima o padrão de distribuição de indivíduos entre as espécies.

O grupo de bactérias foi o mais abundante nos EMs, seguido pelo grupo de fungos (Tabela 2). O maior número total de OTUs de fungos foi observado em EM3 e o menor número em EM2. Já a quantidade de OTUs de bactérias foi maior em EM2, seguido de EM•1® e EM3 (Tabela 2).

O índice de Chao, que estima a riqueza de espécies pelo número total de OTUs, evidenciou que nos EMs com valores de OTUs próximos ocorreu o mesmo índice, a exemplo dos EM2 e EM3, com idênticos Índices Chao de fungos. Quanto a bactérias, nos EMs com contagem elevada de OTUs houve altos Índices Chao (Tabela 2).

O Índice Shannon de fungos, que estima a riqueza de espécies pela abundância individual, foi maior em EM3. Quanto a bactéria, EM•1® teve o maior número de espécies retratadas, seguido de EM3 e EM2 (Tabela 2).

O Índice Simpson, que estima a probabilidade de dois indivíduos pertencerem à mesma espécie, quanto mais próximo de zero for o valor, maior é a diversidade em cada amostra. Neste estudo, EM2 revela os menores Índices Simpson de fungos e bactérias (Tabela 2).

Nos valores de cobertura alcançados pela maioria dos filotipos a porcentagem foi entre 99,98 e 100% (Tabela 2).

A equitabilidade, ou seja, a regularidade com que os indivíduos estão dispersos entre as espécies, foi superior em EM3, na região ITS, e em EM•1® na região 16S rRNA (Tabela 2).

Os EMs 2 e 3 não compartilharam OTUs de fungos (Figura 1).

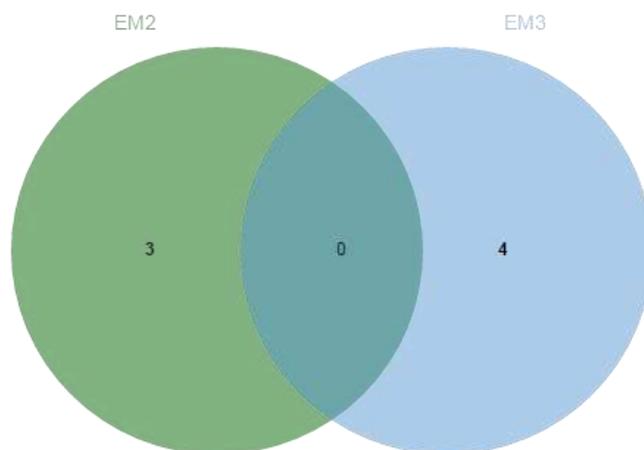


Figura 1. Diagrama de Veen de OTUs de fungos. EM2 = Produzido na região de Muriaé; EM3 = Produzido na região de Viçosa. Dentro do diagrama o número representa o número de OTUs.

No grupo bactérias, 17 OTUs foram compartilhadas entre os três inoculantes EM; 6 entre EM•1® e EM2; 13 entre EM2 e EM3 e 4 entre EM3 e EM•1® (Figura 2).

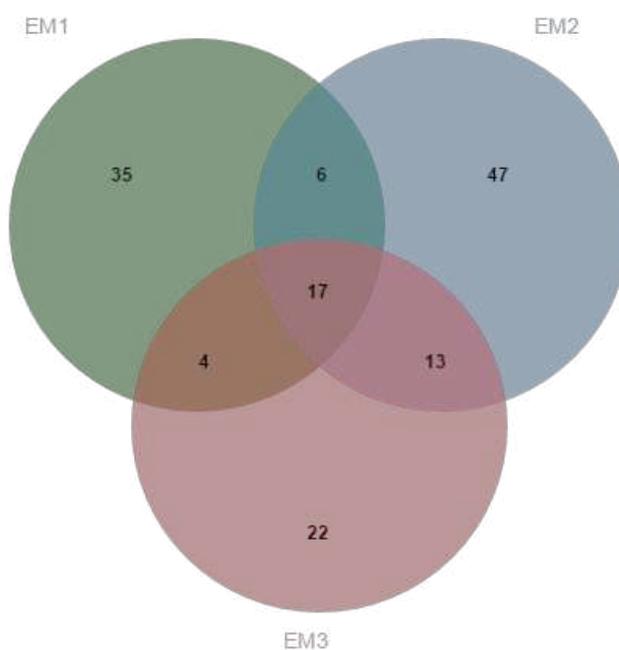


Figura 2. Diagrama de Veen de OTUs de bactérias. EM2 = Produzido na região de Muriaé; EM3 = Produzido na região de Viçosa. Dentro do diagrama o número representa o número de OTUs.

Na Tabela 3 consta a taxonomia das OTUs de bactérias comuns aos três EMs de diversas origens.

Tabela 3 - OTUs de bactérias comuns aos três inoculantes EM.

Bacteria
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Nocardiodaceae
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Nocardiodaceae
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Lysinibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; Campylobacteraceae; Arcobacter
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae;
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae;
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Pseudoalteromonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae
Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Thermovirgaceae; Thermovirga

Na composição taxonômica da comunidade microbiana dos EMs foi observado que OTUs de fungos do EM2 foram classificadas em dois gêneros e no grupo nomeado “*Não identificado 1*”. Os gêneros dominantes foram *Candida* (98%), *Peniophora* (1%) e o agrupamento “*Não identificado 1*” (1%), respectivamente (Figura 3).

No inoculante EM3 55% das OTUs de fungos foram agrupadas e nomeadas como “*Outros*”, grupo que inclui OTUs cuja taxonomia não foi atribuída. As demais OTUs foram classificadas em quatro gêneros, incluindo grupo “*Não identificado 2*” (40%), *Penicillium* (2%), *Uwebraunia* (2%) e *Fusarium* (1%) (Figura 3).

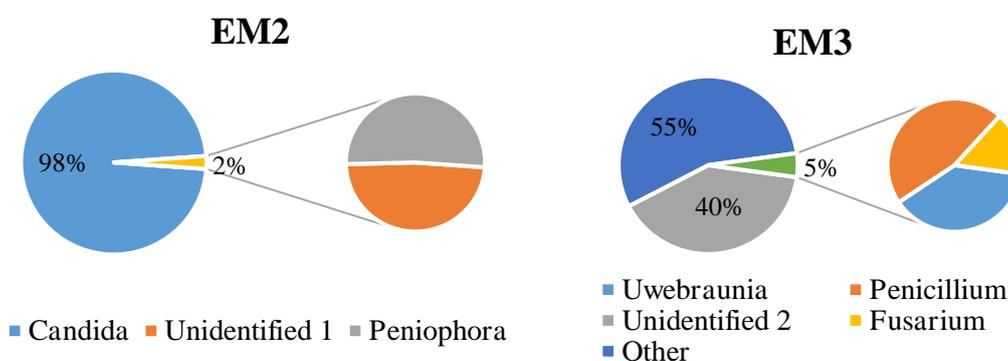


Figura 3 - Distribuição taxonômica de OTUs de gêneros de fungos em inoculantes EM.

OTUs bacterianas de EM•1® correspondentes a menos de 1% do total foram agrupadas e os filos dominantes incluíram Firmicutes (72%), Proteobacteria (12%), Actinobacteria (10%) e Synergistetes (3%) (Figura 4).

EM2 e EM3 revelaram o perfil mais homogêneo de OTUs bacterianas, evidenciado pela maior abundância do filo Firmicutes (93% e 99%, respectivamente) em relação aos demais (Figura 4).

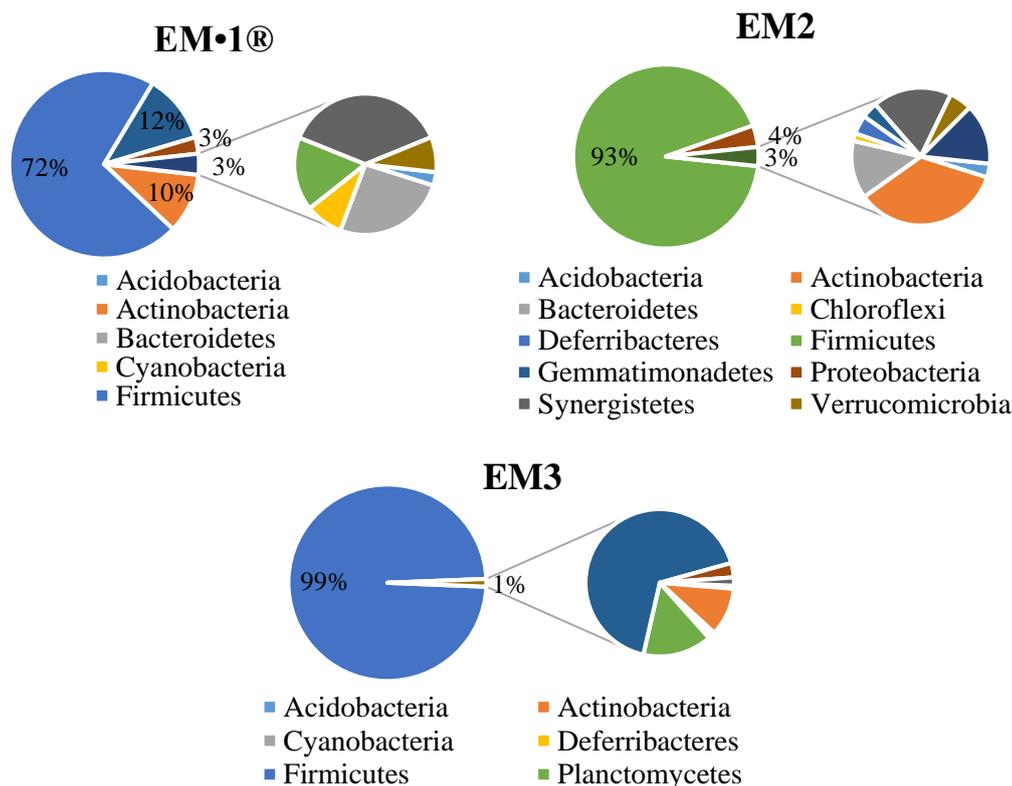


Figura 4 - Distribuição taxonômica de OTUs de filos de bactérias em inoculantes EM.

Porcentagem e velocidade de germinação das sementes de capim-marandu

De acordo com os valores obtidos no teste de germinação, nas sementes imersas por 5 min a %G e o IVG foram superiores, comparados à imersão por 24 h. Em relação às concentrações de EM utilizadas, as sementes embebidas em soluções a 1 e 2% em água proporcionaram valores de %G e IVG significativamente superiores àqueles obtidos na imersão de sementes em EM puro. Diferenças de %G e IVG entre os três EMs analisados não foram encontradas ($p > 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de capim-marandu tratadas com EM (EM•1®, EM2 e EM3), em dois tempos de imersão (5 min e 24 h) e três concentrações (1 e 2% em água e 100% de EM por 5 min de imersão).

Item	Tempo ¹		Concentração de EM ²			EP	P valor		
	5 min	24 h	1%	2%	100%		Tempo	Conc	EM
%G	52,8 ^a	26,3 ^b	51,3 ^a	51,2 ^a	16,2 ^b	4,33	0,038	0,001	0,226
IVG	3,65 ^a	1,99 ^b	3,89 ^a	3,74 ^a	0,83 ^b	0,40	0,013	0,001	0,263

EP = erro padrão da média; Conc = concentração; letras iguais na mesma linha, para concentração de EM e para tempo de tratamento, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹Cada valor é proveniente da média de 9 dados (3 concentrações x 3 EMs).

²Cada valor é proveniente da média de 6 dados (2 tempos x 3 EMs).

A aplicação do Teste de Tukey na análise da variância revelou que inoculantes nas concentrações 1 e 2% em água e imersão por 5 min proporcionaram %G e IVG semelhantes ao controle com ácido sulfúrico, mas ambos foram superiores ao controle com água no tempo de 5 minutos (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de capim-marandu tratadas com ácido sulfúrico a 18% em água e EM em relação ao controle (água durante 5 min de imersão).

Item	Tratamento			EP	P valor
	Controle	H ₂ SO ₄ a 18%	EM ¹		
%G	39,0 ^b	60,0 ^a	64,8 ^a	3,65	0,002
IVG	1,85 ^b	5,12 ^a	4,71 ^a	0,42	0,001

EP = erro padrão da média; letras iguais na mesma linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹Cada valor é proveniente da média de 6 dados (3 EMs x 2 concentrações: 1 e 2% em água, durante 5 min de imersão).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi utilizado o sequenciamento em Illumina MiSeq objetivando avaliar a diversidade e caracterizar taxonomicamente a microbiota. Os resultados indicaram diferenças na comunidade microbiana entre os três inoculantes, mas com o compartilhamento de algumas OTUs bacterianas. Este é o primeiro trabalho sobre o uso de sequenciamento Illumina MiSeq em EMs de diversas origens.

Comparando as OTUs presentes nos EMs, foram detectados compartilhamentos de OTUs bacterianas entre os EM•1®, EM2 e EM3. Os filos comuns aos três EMs incluíram Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Synergistetes. Dentro do filo Firmicutes, foi encontrado o gênero *Lactobacillus*, condizendo com os resultados obtidos em sequenciamento de EM•1®, em linhagens de *Lactobacillus* (Gaggìa et al. 2013), e confirma a composição descrita na bibliografia consultada sobre o inoculante (Higa 2000; Bonfim et al. 2011). Essas bactérias ácido láticas são comumente encontradas em ambientes fermentativos e, principalmente, por produzirem fitormônios, como o ácido indol acético (AIA) (Mohite 2013), estão relacionadas com o crescimento vegetal. O gênero *Bacillus*, também presente no filo Firmicutes, é muito estudado pelo efeito benéfico no crescimento de plantas e antagonismo a seres fitopatogênicos, além de produzirem ácidos orgânicos e hormônios vegetais (Kumar et al. 2012).

As Actinobactérias são conhecidas pela capacidade de produzir grande variedade de enzimas extracelulares, proteínas e fitormônios (Barka et al. 2015). Dentro do filo Actinobactéria, os membros da ordem Actinomycetales são importantes produtores de antibióticos (Barka et al. 2015).

O filo Proteobacteria, composto pela ordem Burkholderiales, é formado por bactérias promissoras ao setor agrícola pela capacidade de produzir reguladores de crescimento, sideróforos e exo-heteropolissacarídeo (Ring et al. 2016). Neste estudo, ainda no filo Proteobacteria, foram encontradas bactérias da família Pseudomonadaceae, importante no controle biológico e na produção de AIA (Dharn et al. 2014).

Os resultados do experimento de germinação demonstraram que pré-tratamentos de sementes com EM•1®, EM2 e EM3 não diferiram, indicando que qualquer um dos EMs pode melhorar a %G e o IVG. No entanto, a eficiência desse inoculante varia de acordo com sua concentração. Houve maior %G e IVG em sementes de capim-marandu tratadas com inoculantes EM nas concentrações 1% e 2% em água, o que é consonante com a bibliografia consultada, todavia, em outras espécies vegetais (Ertekin 2011; Khan et al. 2011, 2014; Mowa e Maass 2012). A eficiência do EM na germinação de sementes pode estar relacionada com a capacidade de degradação do respectivo revestimento pelos micro-organismos, por meio de enzimas produzidas, permitindo a recepção de água, oxigênio e germinação (Mowa e Maass 2012).

Além disso, alguns micro-organismos são capazes de produzir fitormônios necessários às plantas, tais como auxinas, citocininas, giberelinas e ácido-abicísico (ABA), que atuam na germinação de sementes e em outras etapas do desenvolvimento

vegetal, sendo encontrados nos três EMs por meio do sequenciamento em Illumina MiSeq.

É possível a hipótese que 80% das bactérias da rizosfera possam produzir AIA (Loper e Schroth 1986), além de outros fitormônios, o que pode explicar o aumento da %G e do IVG de sementes de capim-marandu quando inoculadas com qualquer um dos três EMs, pois todos são produzidos a partir de micro-organismos capturados do ambiente.

Por outro lado, altas concentrações de EM e longos períodos de imersão suprimiram a germinação de capim-marandu, o que foi relatado por Faltyn e Miszkiele (2008) ao dobrar a concentração de EM na qual foram imersas sementes de trigo primavera. Essa supressão da germinação pode ter ocorrido devido a exposição das sementes a elevadas quantidades de micro-organismos e por longo tempo, promovendo a competição por nutrientes entre o EM e o embrião. A produção de substâncias fitotóxicas por micro-organismos também pode ter acarretado a redução da %G e do IVG. Embora, a princípio, hormônios produzidos por micro-organismos sejam benéficos à germinação de sementes, muitos, em concentrações inibidoras, podem ser tóxicos às sementes, suprimindo a germinação. Assim, os efeitos dessas substâncias nas plantas são dependentes da dose (Carvalho et al. 2011).

A germinação de capim-marandu foi influenciada por escarificação com ácido sulfúrico 18%, assim como por micro-organismos eficientes, o que corrobora com os resultados encontrados por Mowa e Maass (2012) na espécie de *Harpagophytum procumbens*. Essa influência do ácido sulfúrico sobre o capim-marandu está relacionada com o rompimento provocado no tegumento das sementes, quebrando a dormência e promovendo a germinação. No entanto, o método de escarificação com ácido sulfúrico dificilmente é aplicado em larga escala devido aos cuidados a serem tomados na respectiva utilização, ao seu custo elevado e a dificuldade na aquisição (Martins et al. 2008). Sendo assim, o EM é ótima alternativa de aumentar a germinação de sementes.

CONCLUSÕES

O sequenciamento em Illumina MiSeq revelou que a composição taxonômica dos EMs é diversificada, mas com filos bacterianos comuns aos três inoculantes.

Os três EMs testados são eficaz alternativa de quebrar a dormência das sementes de capim-marandu, intensificando e acelerando a germinação, quando utilizadas nas

concentrações de 1 e 2% em água por 5 min, equivalendo ao tratamento com ácido sulfúrico. Assim, é recomendada a utilização de EM por ser método mais econômico, de fácil aquisição e seguro, além de conferir aos produtores de sementes forrageiras a gestão sustentável dessa espécie.

Diante dos resultados de germinação é admissível a conclusão que as bactérias compartilhadas entre os três EMs atuaram na germinação de sementes de capim-marandu.

Todavia, são necessários estudos que identifiquem os metabólitos, principalmente fitormônios e enzimas, produzidos pelos inoculantes EM e que podem influenciar a germinação das sementes.

REFERÊNCIAS

Altieri M. Bases científicas para uma agricultura sustentável. Montevideo: Nordan Comunidad; 1999.

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klent H, et al. Taxonomy, physiology and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015;80: 1-43.

Bewley JD, Black M. *Seeds: physiology of development and Germination*, 2st ed. New York: Plenum; 1994.

Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods.* 2013;10: 57–9.

Bonfim FPG, Honório ICG, Reis IL, Pereira AJ, Souza DB. *Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM.* Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia; 2011.

Brasil. *Regras para Análises de Sementes.* Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília: CLAV/DNDV; SNAD/MA; 1992.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7: 335–336.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the HiSeq and MiSeq platforms. *ISME.* 2012;6: 1621-1624.

Cardoso ED, Sá ME, Haga KI, Binotti FFS, Nogueira DC, Valério Filho WV. Desempenho fisiológico e superação de dormência em sementes de *Brachiaria brizantha* submetidas a tratamento químico e envelhecimento artificial. *Semin Ciênc Agrár.* 2014;35: 21-38.

Carvalho DDC, Oliveira DF, Campos VP, Pasqual, M. Selection of phytotoxin producing rhizobacteria. *An Acad Bras Cienc.* 2011;83: 1678-2690.

- Dharni S, Srivastava AK, Samad A, Patra DD. Impact of plant growth promoting *Pseudomonas monteilii* PsF84 and *Pseudomonas plecoglossicida* PsF610 on metal uptake and production of secondary metabolite (monoterpenes) by rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* cv. bourbon) grown on tannery sludge amended soil. *Chemosphere*. 2014;9: 117-433.
- Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*. 2013;10: 996–8.
- Ertekin M. Effects of microorganisms, hormone treatment and stratification on seed germination of the golden rain tree (*Koelreuteria paniculata*). *Int J Agric Biol*. 2011;13: 38-42.
- Faltyn U, Miszkieio T. The influence of effective microorganism on germinability of dressed spring wheat seeds. *Zesz Nauk UP Wroc*. 2008;92: 31-35.
- Gaggia F, Baffoni L, Gioia DD, Accorsi M, Bosi S, Marotti I, et al. Inoculation with microorganisms of *Lolium perenne* L.: evaluation of plant growth parameters and endophytic colonization of roots. *N Biotechnol*. 2013;30: 695-704.
- Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Mol Ecol*. 1993;2: 113–118.
- Higa T. What is EM technology? *EM World Journal*. 2000;1: 1-6.
- Khan BM, Hossain MK, Mridha MAU. Effect of microbial inoculants on *Albizia saman* germination and seedling growth. *J For Res*. 2006;17: 99-102.
- Khan BM, Hossain MK, Mridha MAU. Nursery practice on seed germination and seedling growth of *Dalbergia sissoo* using beneficial microbial inoculants. *J For Res*. 2011;22: 189-192.
- Khan BM, Hossain MK, Mridha MAU. Improving *Acacia auriculiformis* seedlings using microbial inoculant (Beneficial Microorganisms). *J For Res*. 2014;25: 359-364.
- Koljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol*. 2014;22: 5271–5277.
- Köppen W. *Climatologia: com um estudo de los climas de la tierra*. New Gersey: Laboratory of Climatology; 1948.
- Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol Res*. 2012;167: 493–499.
- Loper JE, Schroth MN. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*. 1986;76: 386-389.
- Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative β -diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73: 1576-1585.
- Maguire JD. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci*. 1962;2: 176-177.

- Martins CC, Camara ATR, Machado CG, Nakagawa, J. Métodos de superação de dormência de sementes de barbatimão. *Acta Sci Agron.* 2008;30: 381-385.
- Mckenzie J, Goldman RN. The student edition of Minitab for windows manual: release 12. Belmont: Addison-Wesley Longman; 1999.
- Mohite B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J Soil Sci Plant Nutr.* 2013;13: 638-649.
- Mowa E, Maass E. The effect of sulphuric acid and effective micro-organisms on the seed germination of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw). *S African J Bot.* 2012;83: 193-199.
- Olle M, Williams I. The Influence of Effective Microorganisms on the Growth and Nitrate Content of Vegetable Transplants. *J Adv Agric.* 2015;2: 25-28.
- Pessoa Filho MACP. Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; 2010.
- Pylro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods.* 2014a;107: 30-37.
- Pylro VS, Roesch LFW, Ortega JM, Amaral AM, Tótola MR, Hirsch PR, et al. Brazilian Microbiom Project: revealing the unexplored microbial diversity - challenges and prospects. *Microb Ecol.* 2014b;67: 237-241.
- Ring HJB, Zentella, LMC, Sierra LGT. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. 2016;19: 102-108.
- Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7: 492-498.
- Van Tonder NCP, Van Der Westhuizen C, Van Der Westhuizen RJ. Interaction effects of Effective Microorganisms and prolonged storage on germination and seedling vigour of maize, sorghum and sunflower. *J N Gen Sci.* 2014;12: 147-161.
- White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc: A Guid Methods Appl.* 1990;38: 315-322.

CONCLUSÕES GERAIS

Inoculantes EM de três origens diferem quando a estrutura da comunidade de fungos e bactérias.

A presença e a ausência de esterco no solo determinaram o perfil bacteriano e fúngico, com efeito pronunciado do esterco na comunidade fúngica dos solos que receberam EMs 1 e 2.

A estratégia de utilização do EM pode trazer benefícios às culturas, mas resultados positivos dependem da origem desse inoculante, e consequente composição da comunidade microbiana, e a presença ou não do esterco.

Os EMs em conjunto com o esterco bovino têm potencial de aumentar os teores de PB e diminuir os de FDN, quando aplicados em capim-marandu, incrementando a eficiência dessa fonte orgânica de nutriente.

Estudos devem ser conduzidos visando entender melhor esse processo, incluindo outras espécies vegetais, análise da composição química dos EMs e a quantidade e qualidade dos estercos e, ou da matéria orgânica adicionada.

O sequenciamento em Illumina MiSeq revelou que a composição taxonômica dos inoculantes EM é diversificada.

Os três EMs testados são eficaz alternativa de quebrar a dormência das sementes de capim-marandu, intensificando e acelerando a germinação, quando utilizadas nas concentrações de 1 e 2% em água por 5 min, equivalendo ao tratamento com ácido sulfúrico. Assim, é recomendada a utilização de EM por ser método mais econômico, de fácil aquisição e seguro, além de conferir aos produtores de sementes forrageiras a gestão sustentável dessa espécie.

Diante dos resultados de germinação é admissível a conclusão que as bactérias compartilhadas entre os três EMs atuaram na germinação de sementes de capim-marandu.

Todavia, são necessários estudos que identifiquem os metabólitos, principalmente fitormônios e enzimas, produzidos pelos inoculantes EM e que podem influenciar a germinação das sementes.

ANEXOS

Anexo 1. Taxonomia das OTUs de fungos de EM•1®, EM2 e EM3.

Tabela 1 - OTUs de fungos presentes em cada inoculante EM.

Fungi	EM2
	Ascomycota; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Incertae sedis; Candida
	Ascomycota; unidentified; unidentified; unidentified; unidentified
	Basidiomycota; Agaricomycetes; Russulales; Peniophoraceae; Peniophora
	EM3
	Ascomycota; Dothideomycetes; Capnodiales; Mycosphaerellaceae; Uwebraunia
	Ascomycota; Eurotiomycetes; Eurotiales; Trichocomaceae; Penicillium
	Ascomycota; Eurotiomycetes; Eurotiales; unidentified; unidentified
	Ascomycota; Sordariomycetes; Hypocreales; Nectriaceae; Fusarium

Anexo 2. Taxonomia das OTUs de bactérias de EM•1®, EM2 e EM3.

Tabela 2 - OTUs de bactérias presentes em cada inoculante EM.

Bacteria	EM•1®
	Acidobacteria; Solibacteres; Solibacterales; Solibacteraceae
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae; Actinomyces
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Corynebacteriaceae; Corynebacterium
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Gordoniaceae; Gordonia
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Intrasporangiaceae
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Mycobacteriaceae; Mycobacterium
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Mycobacteriaceae; Mycobacterium
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Nocardioideaceae
	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Nocardioideaceae
	Actinobacteria; Rubrobacteria; Rubrobacterales; Rubrobacteraceae; Rubrobacter
	Actinobacteria; Thermoleophilia; Solirubrobacterales; Conexibacteraceae
	Actinobacteria; Thermoleophilia; Solirubrobacterales; Conexibacteraceae
	Bacteroidetes; [Saprospirae]; [Saprospirales]; Saprospiraceae
	Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Flammeovirgaceae
	Cyanobacteria; Chloroplast; Streptophyta
	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus

Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Lysinibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Lactococcus
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; fClostridiaceae; Clostridium
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; Ruminococcus
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Veillonellaceae; Sporomusa
Firmicutes; Clostridia; Halanaerobiales; Halobacteroidaceae
Gemmatimonadetes; Gemmatimonadetes; Gemmatimonadales
Gemmatimonadetes; Gemmatimonadetes; N1423WL
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylobacteriaceae; Methylobacterium
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; mitochondria; Vermamoeba
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; mitochondria; Acanthamoeba; castellanii
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Kaistobacter
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae
Proteobacteria; Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; Campylobacteraceae; Arcobacter
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Halomonadaceae; Halomonas
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae; Actinobacillus
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Pseudoalteromonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Sinobacteraceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae
Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Thermovirgaceae; Thermovirga
Thermotogae; Thermotogae; Thermotogales; Thermotogaceae; Petrotoga
Unassigned*

EM2

Acidobacteria; Acidobacteria-6; iii1-15
Acidobacteria; Acidobacteria-6; iii1-15
Acidobacteria; Acidobacteriia; Acidobacteriales; Koribacteraceae
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales

Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinosynnemataceae
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Corynebacteriaceae; Corynebacterium
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Micromonosporaceae; Pilimelia
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Nocardioidaceae
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Nocardioidaceae
Actinobacteria; MB-A2-108; 0319-7L14
Actinobacteria; Rubrobacteria; Rubrobacterales; Rubrobacteraceae; Rubrobacter
Actinobacteria; Thermoleophilia; Solirubrobacterales; Conexibacteraceae
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; S24-7
Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; [Weeksellaceae]; Cloacibacterium
Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae; Sphingobacterium;
Chloroflexi; S085
Deferribacteres; Deferribacteres; Deferribacterales; Deferribacteraceae; Deferribacter
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; [Exiguobacteraceae]; Exiguobacterium
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Lysinibacillus; boronitolerans
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae; Leuconostoc
Firmicutes; Bacilli; Turicibacterales; Turicibacteraceae; Turicibacter
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium
Firmicutes; Erysipelotrichi; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae; Allobaculum
Gemmatimonadetes; Gemm-3
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; Rhodoplanes
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylobacteriaceae; Methylobacterium
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Gluconobacter
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Erythrobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingopyxis
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Kaistobacter
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas
Proteobacteria; Betaproteobacteria
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; Ralstonia
Proteobacteria; Deltaproteobacteria
Proteobacteria; Deltaproteobacteria; GMD14H09
Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacterales; Syntrophobacteraceae
Proteobacteria; Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; Campylobacteraceae; Arcobacter
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Idiomarinaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Enhydrobacter
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Pseudoalteromonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Sinobacteraceae; Steroidobacter
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Gemmatimonadetes
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Stenotrophomonas
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae
Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Thermovirgaceae; Thermovirga
Unassigned*
Unassigned*
Unassigned*
Unassigned*
Verrucomicrobia; [Pedosphaerae]; [Pedosphaerales]
Verrucomicrobia; [Spartobacteria]; [Chthoniobacteriales]; [Chthoniobacteraceae]; DA101

EM3

Acidobacteria; Acidobacteria-6; iii1-15
Acidobacteria; Solibacteres; Solibacterales; Solibacteraceae; Candidatus Solibacter
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Corynebacteriaceae; Corynebacterium
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Nocardioideae
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Nocardioideae
Cyanobacteria; Synechococcophycidae; Pseudanabaenales; Pseudanabaenaceae; Halomicronema
Deferribacteres; Deferribacteres; Deferribacterales; Deferribacteraceae; Deferribacter
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Brevibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Lysinibacillus; boronitolerans
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus

Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae; Leuconostoc
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium; intestinale
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae
Planctomycetes; Planctomycetia; Gemmatales; Gemmataceae; Gemmata
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; Rhodoplanes
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Agrobacterium
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Roseomonas
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; mitochondria; Acanthamoeba
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingopyxis
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Novosphingobium
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Achromobacter
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Ellin329
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Rhizobium
Proteobacteria; Deltaproteobacteria; NB1-j; NB1-i
Proteobacteria; Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; Campylobacteraceae; Arcobacter
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Pseudoalteromonadaceae
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Sinobacteraceae; Nevskia; ramosa
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae
Synergistetes; Synergistia; Synergistales; Thermovirgaceae; Thermovirga
Thermotogae; Thermotogae; Thermotogales; Thermotogaceae; Petrotoga

*Unassigned: inclui sequências com micro-organismos não identificáveis.