



MAYSA MATHIAS ALVES PEREIRA

**TECNOLOGIAS SOCIAIS PARA AUTONOMIA PRODUTIVA:
VERMICOMPOSTAGEM E MICRORGANISMOS EFICIENTES
NO CULTIVO DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.)**

**LAVRAS – MG
2021**

MAYSA MATHIAS ALVES PEREIRA

**TECNOLOGIAS SOCIAIS PARA AUTONOMIA PRODUTIVA:
VERMICOMPOSTAGEM E MICRORGANISMOS EFICIENTES NO CULTIVO DE
ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo Sustentável de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Joyce Dória
Orientadora

**LAVRAS – MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Maysa Mathias Alves.

Tecnologias sociais para autonomia produtiva: :
Vermicompostagem e microrganismos eficientes no cultivo de
orégano (*Origanum vulgare* L.) / Maysa Mathias Alves Pereira. -
2021.

188 p.

Orientador(a): Joyce Dória.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.
Bibliografia.

1. Caracterização física química, fitohormonal, aminoácidos e
microbiana de vermicompostagem. 2. Agroecologia - Plantas
Medicinais - Óleo Essencial - Atividade Antimicrobiana. 3.
Métodos de Inoculação de Microrganismos Eficientes -

MAYSA MATHIAS ALVES PEREIRA

TECNOLOGIAS SOCIAIS PARA AUTONOMIA PRODUTIVA:
VERMICOMPOSTAGEM E MICRORGANISMOS EFICIENTES NO CULTIVO DE
ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.)

SOCIAL TECHNOLOGIES FOR PRODUCTION AUTONOMY:
VERMICOMPOSTAGE AND EFFICIENT NON-CULTIVATING MICRORGANISMS OF
ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo Sustentável de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 24 de maio de 2021

Dra. Luciane Vilela Resende UFLA

Dra. Ligiane Aparecida Florentino UNIFENAS

Dr. Alexandre Alves de Carvalho UFLA

Dr. José Magno Queiroz Luz UFU

Profa. Dra. Joyce Dória

Orientadora

LAVRAS - MG
2021

Tentaram nos matar, mas somos sementes em dispersão!

E aqui, Afrikana da diáspora, dedico este sopro lavrado no Tempo, a minha família carnal e ancestral, a força Ancestral de meu Povo, que pela travessia da grande Kalunga nos aTerrou em solo fértil de memória e trajetória quanto aos saberes e fazeres da lida com a Terra, as Matas, as Folhas, as Águas, o Ar, a forja do Ferro e do Fogo. E assim, pudemos ser, não por que nos disseram, mas porque sempre fomos seres indissociáveis da Terra. Que possamos seguir nos Akilombando e semeando Jinsaba em Nós, para colher autonomia do Povo!

Ao ontem - hoje e o porvir!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ngazakidila! Kiguá Tateto Lembarenganga, pelo sopro de vida em meu mutuê, por permitir neste Tempo vida ser movimento de transformação através de tua sabedoria aTemporal. Onde o novo, nasce Velho, e no contratempo do Tempo, que é Tempo e caminhAR, posso ser e existir em tua calmaria de passoss firmes e certo. Ngazakidila pelo AR que me sustenta, por me fazer respirar.

Ngazakidila! Kiguá Mameto Kisimbe pela água que me banha e me embala. Por tua presença ancestral que ensina sobre a força das águas a me conduzir pelas encruzadas de Njila. Por tua sabedoria quanto a paciência no percurso, cujas as águas que levam, são as mesmas que nos trazem a fartura de novos caminhos a desaguar vida movimento em Nós. Ngazakidila pela Água que me nutre, por me ser enseada e rebentação.

Aos ventos que me trouxeram a Lavras, e me presentearam com a família Abassá Cajámungunssu Maza Kabila Dya Gongobila. Porto de chegada, de recomeço, acolhida, a qual me possibilita renascer e ser potência ancestral, do encontro ao que fui, antes mesmo de vir a Ser, em especial a meu Tateto Dya Nkisse Guianjoriô e Tateto Dya Nkisse Gongolecy.

A força e ensinamento de minhas mais velhas, de minhas Matriarcas, que me embalaram e me conduziram ao que sou e acredito: em nome da Vó Magaly, Tia Isa, Tia Elba, Tia Dani, Tia Flávia, Tia Fátima, aos meus primos e primas. A qual crescemos juntas e juntos, em comunidade, cada qual a sua forma, mas todas e todos, sempre pensando em Nós.

Dentre as mais velhas das matriarcas desta família Mathias, me faltam palavras para agradecer minha Mãe Lismara, dona Preta, Lis para os mais próximos. A qual agradeço por ter me trazido a este mundo, por ter sido parida de teu ventre e de tua força. A senhora é a mulher mais forte e esperançosa na mudança que conheço. De costas largas, olhar altivo, braços e abraços fortes, me fez Mulher, me fez gente... Agrônoma e hoje Doutora. A senhora sempre disse que *“filha maior de idade, é filha com faculdade”*, e agora estou chegando bem perto de minha maior, ou melhor, idade. Te amo, minha mãe. Obrigada por tudo, por cada esforço durante as épocas de Prouni e muita pedalada para a faculdade, por cada apoio quando me mudei para mais de 3.500km de distância para fazer o mestrado, por me apoiar e confiar em cada tomada de decisão. Por ser minha melhor Amiga, minha referência de pessoa no mundo!

Ao Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra - MST, em especial ao Coletivo de Mulheres Raízes da Terra, que contribuíram na forja do pensamento crítico que vai de encontro aos interesses do Povo Brasileiro, pelo direito a Terra e tudo que nela há. Por me ser escola e

me permitir ser professora, onde nas várias trocas destes anos, construímos e lavramos o sonho da autonomia produtiva no cultivo de plantas medicinais, e por Reforma Agrária Popular.

A minha orientadora Dra. Joyce Dória, por aceitar me orientar sem mesmo me conhecer e acreditar na minha potencialidade em conduzir um projeto de minha autoria. E que mesmo nas adversidades de pensamentos, me repetiu, para que esta tese cumprisse com sua função social, que é o fortalecimento de Tecnologias Sociais para o cultivo tradicional e agroecológico.

A minha “dupla” de doutorado em todas as etapas da Tese, Ludmila Caproni. Ela, a calmaria para meus turbilhões, e eu, o turbilhão em sua calmaria. E assim, cada qual a sua forma, nos potencializamos na realização de muitas pesquisas e extensão durante esses quatro anos. Te agradeço a paciência, amizade, a parceria, escuta e confiança.

Ao Abrãao e Vytória, por sempre dar aquele suporte em momentos de dúvidas, desabafos e boas risadas. As compenheiras de ingresso de doutorado pelas trocas durante os apertos e boas novas. Aos bolsistas e equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos.

Agradeço a todos os funcionários e professores da UFLA que em alguma medida estiveram presentes e foram fundamentais para que esta pesquisa se concretizasse. Em especial aos funcionários e aos diversos setores como a zootecnia; a Procafé; a G-Óleo; a Universidade Federal de Viçosa; a Universidade Federal de Alfenas; por fim a pessoa do Dr. Moacir Pasqual.

Ao Programa de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, em especial funcionários do Horto Medicinal, Laboratório e Professores, pelos ensinamentos, troca de conhecimentos e por acreditarem na importância de avançarmos quanto as pesquisas na área de plantas medicinais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fomento a pesquisa.

Ao meu irmão, Kitalesi, que Lavras me presenteou neste trajeto do Tempo, compenheiro de casa, de vida, sonhos e esperança no amanhã. Pela sua potência, os desabafos, as trocas, partilha e acolhimento. Que Mukongo sempre lhe fortaleça com novas caças.

A minha companheira, Cláudia Regina, que Kisimbe cuidou para que nosso desague se cruzasse, e juntas pudéssemos transbordar em trocas, cuidado, acolhida, escuta atenta aos sonhos e medos do porvir. Agradeço toda a paciência e por me fortalecer neste caminhar.

Por fim, agradeço a todas e todos, por esta encruzilhada do Tempo!

RESUMO

A vermicompostagem aplicada a produção agrícola não é abstrata ao processo sócio histórico. Pelo contrário, possui lastro e leito histórico no saber tradicional e popular que não são meramente culturais e ideológicos, a práxis ligada aos valores do como fazer e produzir, é base científica e tecnológica a ser valorizada e reconhecida como ferramenta social e tradicional para a resolução dos diversos problemas ambientais gerados pelo atual modelo tecnológico do agronegócio na produção de alimentos, bens e serviços. Potencializar tecnologias sociais como a vermicompostagem e o uso de microrganismos eficientes na gestão de resíduos agroalimentares para obtenção de fertilizantes orgânicos destinados ao cultivo de plantas medicinais, como o *Origanum vulgare* L., é construir e formentar autonomia produtiva para agricultores familiares e tradicionais. Ademais contribui para a gestão de resíduos sólidos, o meio ambiente e com a sociedade. Neste sentido objetivou-se analisar e quantificar as características químicas, o teor de macro e micronutrientes, fitohormônios, aminoácidos e comunidade microbiana de três formulações de vermicompostagem a partir de resíduos alimentares e agropecuários, com e sem inoculação de microrganismos eficientes, rizobactérias promotoras de crescimento (*Bacillus subtilis*) e inoculante comercial. Bem como avaliar a influência da vermicompostagem nas características agrônômicas, teor e rendimento de óleo essencial, perfil fitoquímico e atividade antimicrobiana de *Origanum vulgare* L., em duas épocas de corte, comparados ao cultivo convencional. Além disso, para as três formulações de vermicomposto, foram realizadas análises para a caracterização e quantificação química, fitohormonal, teor de aminoácidos e de microrganismos. Por conseguinte, conclui-se que as três formulações de vermicompostagem podem ser registradas como fertilizantes orgânico composto classe A de acordo com a legislação brasileira, além de apresentarem elevada atividade microbiana e teor de fitohormônios que promovem o crescimento de plantas, supressão de patógenos, atuam na ciclagem de nutrientes, restauração e reestruturação do solo, bem como, se reafirma como uma tecnologia social de grande importância e qualidade na gestão de resíduos sólidos, e, para autonomia produtiva de agricultores familiares e tradicionais. Quanto a sua aplicação no cultivo de Orégano, o vermicomposto é um potencial veículo inoculante para o *Bacillus subtilis*, sendo que o método de inoculação dos microrganismos, apresentam diferenças na responsividade da cultura. O A aplicação de *Bacillus* e microrganismo eficientes influenciaram a produção de biomassa e óleo essencial de Orégano. Verifica-se que quanto ao método de inoculação do *Bacillus subtilis*, quando a rizobactéria é imobilizada em cápsulas de alginato desempenha maior eficácia, promovendo a maior produção de óleo essencial (OE) de orégano, bem como a época de corte, é um fator relevante para a produção desta espécie. E que os OE obtidos do cultivo com aplicação de fertilizante orgânicos, apresentaram atividade antimicrobiana moderada e forte, enquanto que o OE obtido do cultivo convencional, com NPK, não apresentou atividade antimicrobiana. Por fim, o vermicomposto com inoculação de microrganismos eficientes da mata nativa ou com inoculação de *Bacillus* encapsulado, podem ser aplicados em substituição ao fertilizante químico sintético NPK na produção de *O. vulgare* sem comprometer qualquer um dos parâmetros avaliados para a cultura.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*. Métodos de inoculação. Plantas medicinais. Rizobactérias. Óleo essencial. Agroecologia. Agricultura tradicional.

ABSTRACT

Vermicomposting applied to agricultural production is not abstract from the socio-historical process. On the contrary, it has a historical basis and foundation in traditional and popular knowledge that is not merely cultural and ideological, the praxis linked to the values of how to do and produce, is a scientific and technological basis to be valued and recognized. as a social and traditional tool for solving the various environmental problems generated by the current technological model of agribusiness in the production of food, goods and services. Taking advantage of social technologies such as vermicomposting and the use of efficient microorganisms in the management of agrifood residues to obtain organic fertilizers for the cultivation of medicinal plants, such as *Origanum vulgare* L., is to build and promote productive autonomy for family and traditional farmers. It also contributes to the management of solid waste, the environment and society. In this sense, the objective was to analyze and quantify the chemical characteristics, the content of macro and micronutrients, phytohormones, amino acids and microbial community of three formulations of vermicompost from food and agricultural residues, with and without inoculation of efficient microorganisms, rhizobacteria, growth promoters (*Bacillus subtilis*) and commercial inoculant. In addition to evaluating the influence of vermicomposting on agronomic characteristics, essential oil content and yield, phytochemical profile and antimicrobial activity of *Origanum vulgare* L., in two crops, compared to conventional cultivation. In addition, for the three formulations of vermicompost, analyzes were performed for chemical, phytohormonal, amino acid and microorganism characterization and quantification. Therefore, it is concluded that the three formulations of vermicompost can be registered as class A organic compound fertilizers according to Brazilian legislation, in addition to having high microbial activity and phytohormones contents that promote plant growth, suppression of pathogens, act on nutrient cycling, soil restoration and restructuring, as well as, is reaffirmed as a social technology of great importance and quality in solid waste management and for the productive autonomy of family and traditional farmers. As for its application in the cultivation of Oregano, vermicompost is a potential inoculating vehicle for *Bacillus subtilis*, and the method of inoculation of microorganisms presents differences in the responsiveness of the culture. The application of *Bacillus* and efficient microorganisms influenced the production of biomass and essential oil of Oregano. As for the *Bacillus subtilis* inoculation method, when the rhizobacteria is immobilized in alginate capsules, it acts more effectively, promoting greater production of essential oil (EO) of oregano, as well as cutting time, it is a relevant factor for the production of this species. And that the EO obtained in the cultivation with application of organic fertilizers presented moderate and strong antimicrobial activity, while the EO obtained in the conventional cultivation, with NPK, did not present antimicrobial activity. Finally, the vermicompost with inoculation of efficient microorganisms from the native forest or with inoculation of encapsulated *Bacillus* can be applied to replace the synthetic chemical fertilizer NPK in the production of *O. vulgare* without compromising any of the parameters evaluated for the culture.

Keywords: *Bacillus subtilis*. Inoculation method. Medicinal plants. PRPG. Essential oil. Agroecology. Traditional agriculture.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|------------|
| | PRIMEIRA PARTE | 15 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1 | Tecnologias Sociais: Vermicompostagem e Microrganismos eficientes ... | 16 |
| 3 | CONCLUSÃO..... | 23 |
| | REFERÊNCIAS | 24 |
| | SEGUNDA PARTE | 26 |
| | ARTIGO 1 - CHALLENGES OF ORGANIC AGRICULTURE FOR THE PRODUCTION OF COMPOSTS AND VERMICOMPOST FOR THE PRODUCTION OF MEDICINAL PLANTS – A SOCIOECONOMIC DEMAND..... | 26 |
| | ARTIGO 2 - HUMICSUBSTANCES AND EFFICIENT MICROORGANISMS: ELICITATION OF MEDICINAL PLANTS - A REVIEW | 48 |
| | ARTIGO 3 - QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, FITOHORMONAL E MICROBIOLÓGICA DE VERMICOMPOSTAGEM | 77 |
| | ARTIGO 4 - MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (PGPR) INFLUENCIAM O CRESCIMENTO DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> L. E A PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL..... | 123 |
| | ARTIGO 5 - CONTENT, YIELD AND PHYTOCHEMICAL PROFILE OF <i>ORIGANUM VULGARE</i> L. CULTIVATED IN AGROECOLOGICAL AND CONVENTIONAL PRODUCTION SYSTEM..... | 150 |
| | ARTIGO 6 - MANEJO ORGÂNICO X MANEJO CONVENCIONAL INFLUENCIAM NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> L. | 172 |

PRIMEIRA PARTE

1 Introdução

Historicamente, sobretudo pelos povos tradicionais (Quilombolas, Povos Originários, Ciganos, Ribeirinhos...) o cultivo e uso das plantas medicinais pela medicina tradicional e popular no Brasil é expressiva, e tem sido explorada pelos pesquisadores brasileiros e indústria farmacêutica (Pereira et al., 2019). O interesse por medicamentos derivados de plantas, principalmente espécies com finalidades medicinais está em expansão por todo mundo, sendo que 30% dos medicamentos disponíveis na terapêutica, são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais (KOEHN e CARTER, 2005; HASENCLEVER et al., 2017).

As plantas medicinais representam fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde, considerado o tratamento mais acessível para 80% da população (SOUZA-Moreira, 2010) sendo que as farmácias vivas e a fitoterapia são partes cruciais para atender tamanha demanda (Torres, 2015). A receita do Brasil neste setor é de aproximadamente U\$\$ 160 milhões anuais, constituindo um mercado promissor, cuja a fonte de matéria-prima são as plantas medicinais (Rodrigues, 2016).

Porém com o advento da agricultura convencional em função da revolução verde o modo de produção foi influenciado pelo uso excessivo de fertilizantes, agrotóxicos, mecanização da terra e concentração de latifúndio (Pereira e Sousa, 2016; Sampaio e Neto, 2018). E mesmo que no Brasil seja determinado que os cultivos de espécies medicinais sejam totalmente livres de agrotóxico, resíduos de substâncias indesejáveis e não declaradas, como pesticidas, radioativos, patógenos, micotoxinas e metais pesados permanecem presentes nas plantas medicinais in natura, drogas vegetais e fitoterápicos.

Em contrapartida a este modelo de produção, a agricultura tradicional, seguida das práticas agroecológicas, está em crescente expansão, no entanto o setor ainda enfrenta grandes dificuldades referentes as políticas públicas, linhas de crédito, comercialização, investimentos em tecnologia especializada no fornecimento de insumos e sementes, infraestrutura e agroindústrias, fatores que afetam a produção e avanço do setor (MENDONÇA et al., 2015).

Estas dificuldades também são observadas no setor produtivo de plantas medicinais, cuja demanda por tecnologia, insumos agrícolas, estabelecimento de cultivo e manejo de espécies medicinais, linhas de crédito específico, são fundamentais e necessário para fortalecer a consolidação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2006), que contemplam etapas que vão da produção de insumos (cultivo/manejo)

aos fitoterápicos industrializados, demonstrando o potencial inovador, econômico, tecnológico e social (TORRES, 2015).

De acordo com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, em suas diretrizes é destacado a importância do estabelecimento de arranjos produtivos locais para o cultivo de espécies medicinais, tendo como base a agricultura familiar, a valorização dos saberes tradicionais e populares, o cultivo isento de contaminantes ambientais, pela preservação e manutenção da biodiversidade.

Em relação a produção de insumos orgânicos, o Brasil em função da agropecuária intensiva, gera grandes quantidades de resíduos orgânicos, com variabilidade de material que podem ser destinados a produção de vermicompostos, compostos orgânicos e iofertilizantes (PEREIRA et al., 2021). Bem como existe uma preocupação mundial quanto a grande quantidade de resíduos alimentares sólidos gerados nos centros urbanos, que depositados inadequadamente, são responsáveis pelo desenvolvimento de vetores de doenças e pragas urbanas (Wu et al., 2014).

A reciclagem dos resíduos sólidos gerados no campo e na cidade, é fundamental para redução do consumo de recursos naturais na agricultura, pois a partir do residual das atividades industriais e agropecuárias, é possível gerar um novo produto, que além de permitir a reciclagem de nutrientes, atua como condicionante de solo aumentando os níveis de matéria orgânica, resultando nas melhorias das características físicas, químicas e biológicas do solo (LIM et al., 2016).

De acordo com o Panorama dos resíduos sólidos no Brasil (Abrelpe, 2020), no território nacional são produzidas de 67 a 79 milhões de toneladas por ano, sendo que 45,5% é composto por resíduos orgânicos. No entanto, os resíduos orgânicos, se reaproveitados corretamente, são potenciais matérias primas para a formulação de composto, vermicomposto e biofertilizantes a serem aplicados no cultivo de espécies vegetais (Pereira et al., 2021). Dessa forma, segundo Dagnino (2014), a tecnologia pode e deve assumir um caráter social considerando as condições locais a qual é produzida, o que converge com os interesses das políticas públicas na intervenção social, fomento e valorização local.

Sendo assim, esta pesquisa tem como tese que a formulação de vermicompostagem a partir de resíduos alimentares e agropecuários inoculados com microrganismos eficientes, é uma ferramenta social e tecnológica a ser aplicada no cultivo de plantas medicinais, contribuindo para a autonomia produtiva, soberania e segurança alimentar de agricultores familiares e tradicionais. E, portanto, pode ser aplicada em substituição a tecnologia convencional, base do agronegócio, que é responsável não só pelo modelo hegemônico na

produção de alimentos, bem como, da concentração da terra e do epstemicídio dos Povos quanto aos saberes e farezes tradicionais e sociais.

Para além disso, o setor agrônômico tem se mostrado ineficiente na produção de insumos orgânicos voltados para a produção de plantas medicinais, neste sentido, existe uma demanda socioeconômica por fertilizantes orgânicos (composto e vermicomposto) para estas espécies, o que requer especificidade e validação técnico-científica. Por fim, todos estes fatores confluem para o avanço da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, ao passo que em suas diretrizes, estabelece como base para o desenvolvimento dos arranjos produtivos no fornecimento de matéria-prima, os agricultores familiares, portanto, os mesmos precisam estar munidos de tecnologias sociais para sua autonomia produtiva.

Nesse contexto, objetivou-se analisar e quantificar as características químicas, o teor de macro e micronutrientes, fitohormônios, aminoácidos e comunidade microbiana de três formulações de vermicompostagem a partir de resíduos alimentares e agropecuários, com e sem inoculação de microrganismos eficientes, rizobactérias promotoras de crescimento (*Bacillus subtilis*) e inoculante comercial. Bem como avaliar a influencia da vermicompostagem nas características agrônômicas, teor e rendimento de óleo essencial, perfil fitoquímico e atividade antimicrobiana de *Origanum vulgare* L., em duas épocas de corte, comparados ao cultivo convencional.

2 Referencial Teórico

2.1 Tecnologias Sociais: Vermicompostagem e Microrganismos eficientes

As minhocas são animais extremamente antigos e povoam a Terra há aproximadamente 600 milhões de anos. Nas civilizações antigas como as do Egito (3.300 a.C e 30 d. C.) a minhoca era considerada sagrada pelos Egípcios, sendo associada a melhoria das terras às margens do rio Nilo, conhecida como as planícies férteis para a agricultura. Em diversas regiões do continente africano as minhocas eram conhecidas por acelerar o processo de “humificação”, gerando húmus, fertilidade natural do solo, formando galerias e túneis no solo que favoreciam os cultivos. Ademais, os povos da antiga Mesopotâmia na Ásia (3.000 a.C.), os Incas no antigo Peru nas áreas férteis do Vale Sagrado (3.000 a 1450 d.C), a China com uso milenar, seguido pela Espanha em 1556, e o naturalista inglês 1789 também relatam a importância das minhocas para a qualidade do solo e no desenvolvimento vegetal (Dionísio, 2021).

Para os Povos Quilombolas, descendentes dos diversos Povos Africanos trazidos para o Brasil pela rota transatlântica ancestral de saberes e conhecimentos quanto a agricultura (Pereira et al., 2019), relatam que a minhoca sempre foi considerada um indicador de qualidade do solo, bem como ressaltam a relação cíclica de alimentar as minhocas com os restos culturais vegetais e retornar com o húmus, produto da bio-oxidação pelas minhocas e microrganismos, para o cultivo do milho e do feijão (Flor, 2018).

Este saber quanto ao manejo dos resíduos vegetais através das minhocas e aplicação na agricultura, saber tradicional dos Povos antigos, foi tomando novas proporções e notoriedade na década de 40, pela massificação da produção de minhocas no estado da Califórnia (Dionísio, 2021), a qual anos depois foi conceituada pela ciência moderna como “vermicompostagem”.

A vermicompostagem é caracterizada pelo processo de oxidação biológica não termofílica em que o material orgânico digerido pelas minhocas, é convertido em vermicomposto, que é um material semelhante a turfa, exibindo alta porosidade, aeração, drenagem, capacidade de retenção de água e ricas atividades microbianas (Atiyeh et al. 2000; Arancon et al. 2008), por meio das interações entre minhocas e microrganismos associados ao trato digestivo e na massa a ser decomposta.

Os estudos atuais quanto à aplicação da vermicompostagem no cultivo vegetal corroboram e elucidam com mais especificidades, o saber tradicional dos Povos e Agricultores, que não se restringem ao empírico ou a superfície do solo, mas a todos os componentes do ecossistema, inseridos dentro dos valores da cultura e tradição local sobre as formas do fazer e produzir, sendo considerado patrimônio sociocultural importante, transmitido de geração a geração pela tradição da oralidade (Audeh et al., 2011). Segundo a FAO, em Eidt e Udry, (2019) os sistemas agrícolas tradicionais deveriam estar no centro da atenção dos pesquisadores e tomadores de decisões na inovação e na elaboração e implementação de políticas públicas para a agricultura.

Em grosso modo, suscita-se que a técnica sistematizada quanto à utilização de minhocas (vermicompostagem) na produção agrícola, não é abstrata ao processo sócio histórico, bem como pertencente ou descoberta pós década de 40. Pelo contrário, possui lastro e leito histórico no saber tradicional e popular, que não são meramente culturais e ideológicos, a práxis ligada aos valores do como fazer e produzir, é base científica e tecnológica a ser valorizada e reconhecida, como ferramenta social e tradicional para a resolução dos diversos problemas ambientais gerados pelo atual modelo tecnológico convencional na produção de alimentos, bens e serviços.

Segundo Martín e Schiedeck (2016) o processo de vermicompostagem é considerado uma “ecotecnologia” limpa, sem impacto ambiental, e com custos de investimento, energético e de manutenção relativamente baixos e sua utilização oferece diversos benefícios a sociedade e ao meio ambiente. Em função destas características, a vermicompostagem pode ser conceituada como uma tecnologia social, pois além do baixo orçamento, pode ser replicada a nível de território nacional (Dal et al., 2014).

Neste sentido, incentivos financeiros, fomentos e políticas públicas que viabilizem a produção da vermicompostagem com perspectiva de autonomia produtiva, autogestão e geração de renda, aplicada a produção de alimentos por agricultores tradicionais e familiares, conciliado a prática de captura e aplicação de microrganismos eficientes ambientais, é de extrema importância para avançar na produção dos sistemas agroalimentares sustentáveis.

Segundo Dagnino (2014), a tecnologia convencional é intensiva em insumos sintéticos produzidos por grandes empresas, o que, além de ambientalmente problemático, leva a uma dependência muito grande do pequeno produtor. Sendo que somente a empresa detém o controle sobre a totalidade dos processos de produção, de manutenção e de concepção, orientado pelo mercado externo, monopolizado pelas grandes empresas.

A potencialização da produção de tecnologias sociais voltadas para os agricultores familiares e tradicionais é de grande importância, social, ambiental e econômica. Pois historicamente, estas tecnologias e práticas são associadas ao rudimentar, pouco desenvolvido, e com o baixo investimento em aprimoramento e pesquisas, vão sendo consideradas “práticas alternativas”.

No entanto, a desvalorização e sucateamento dos saberes populares e tradicionais dito “práticas alternativas”, bem como o não investimento em tecnologias sociais para autonomia produtiva, é reflexo da estrutura capitalista vigente, na transformação de bens da natureza em mercadorias para atenderem novamente os interesses dos monopólios empresariais. Neste sentido, verifica-se um interesse da indústria nos subprodutos derivados do vermicomposto, como o chá de húmus, as substâncias húmicas, ácido húmico, isolamento de bactérias promotoras de crescimento em plantas dentre outros, ou seja, para que investir em tecnologia social para autonomia produtiva se é possível lucrar sobre a desvalorização desta tecnologia social?

Enfim, esta é a dualidade que acompanha a produção de alimentos e plantas medicinais, de um lado o agronegócio e a indústria farmacêutica com altos investimentos em tecnologias convencionais, pesquisas e fomentos em prol das empresas multinacionais, que historicamente apropriam e expropriam saberes tradicionais e populares, com base no lucro e no interesse

privado. E do outro, agricultores tradicionais e familiares, cujo os investimentos, pesquisas e fomentos na valorização e desenvolvimento das tecnologias sociais, tradicionais e autogestionável para autonomia produtiva são escassas e insuficientes.

Ou seja, o desenvolvimento tecnológico no Brasil, no investimento as tecnologias sociais, para a produção de vermicompostagem e plantas medicinais, apresenta dois pesos e duas medidas, sendo possível indagar:

- Se os recursos em tecnologias sociais e convencionais fossem equitativos, a vermicompostagem (fertilizante orgânico), seria aplicada de forma massiva assim como os fertilizantes químicos sintéticos na agricultura?
- Se os microrganismos eficientes coletados nos locais de produção são tão eficientes quanto aqueles isolados e comercializados como inoculantes, bioestimulantes, porque esta tecnologia social não é aplicada massivamente na produção de alimentos e plantas medicinais?
- Se as práticas de reaproveitamento de resíduos agroalimentares a partir da vermicompostagem e compostagem, são tão eficientes, porque sua produção ainda é incipiente no cenário nacional em comparação a produção de insumos químicos sintéticos que esgotam cotidianamente os recursos naturais não renováveis?
- Se historicamente as plantas medicinais são utilizadas pelos Povos, e a boticária é a base da institucionalização do curso de farmácia, e suas moléculas químicas são amplamente exploradas pelas empresas multinacionais e pesquisas a nível mundial, porque a produção de fitoterápicos em relação aos remédios químicos sintéticos é praticamente inexistente? Bem como, o número de farmácias vivas, fomentada pela política nacional de plantas medicinais, é desassistida em nível nacional?
- Sendo a agricultura considerada a base socioeconômica e cultural do Brasil, com diversos avanços tecnológicos e produtivos nos sistemas agroalimentares de grandes culturas e hortifruticulturas, mediante tal lastro histórico, porque o cultivo de plantas medicinais, fomento as farmácias vivas, política pública de plantas medicinais é praticamente inexistente e desconhecido pela sociedade e pesquisadores?
- O Brasil possui a maior biodiversidade da flora mundial, com diversas espécies medicinais, bem como, território para fomentar a produção e o cultivo com base familiar e tradicional, no entanto é o maior importador de matéria prima vegetal para a produção

de fitoterápicos. Neste sentido, porque a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos não é fomentada, divulgada e aplicada massivamente?

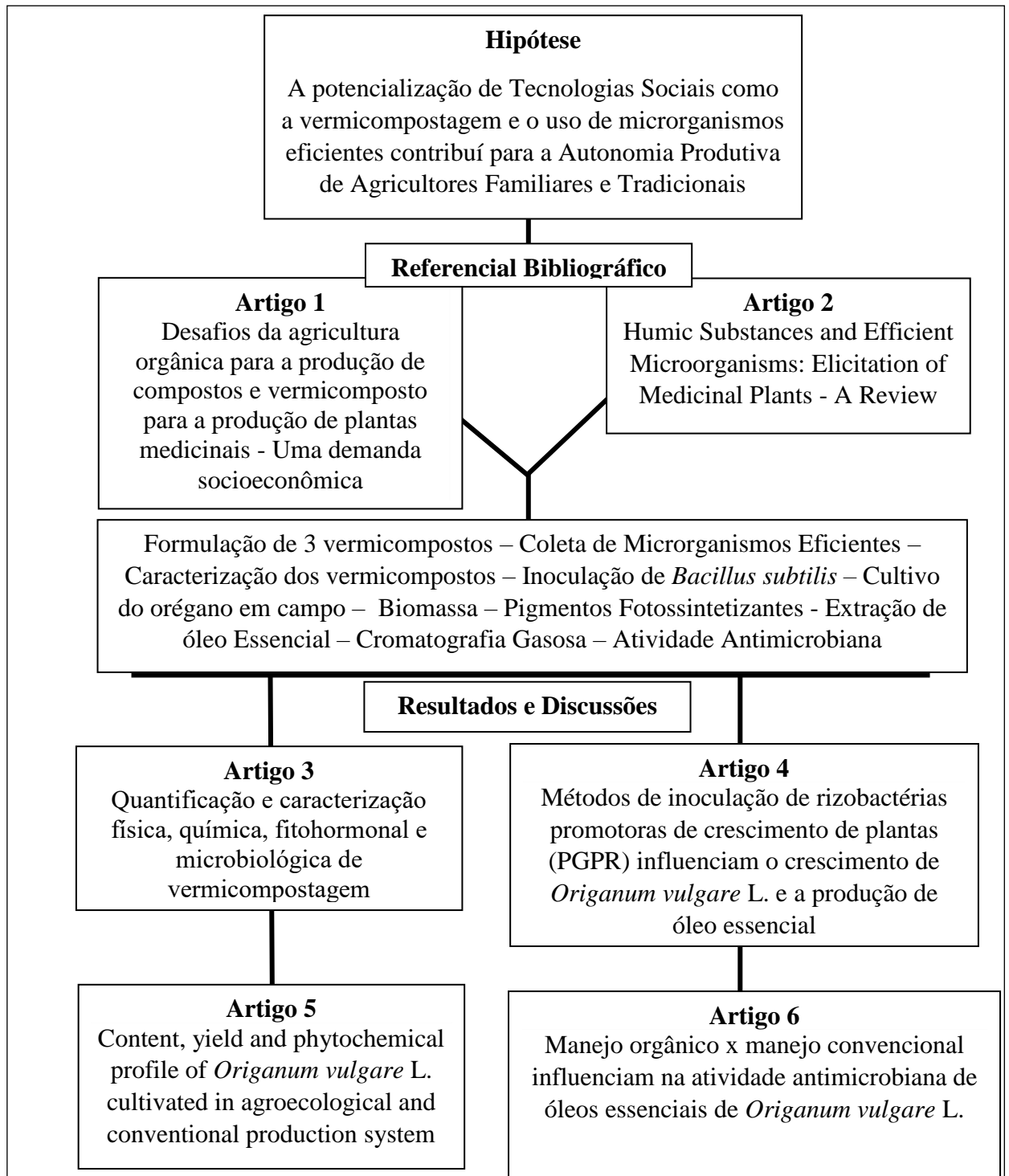
Mediante tantas indagações e questionamentos, é necessário que a pesquisa científica esteja alinhada ao desenvolvimento das tecnologias tradicionais e sociais para o fortalecimento e produção de bens e serviços de interesse da sociedade, dos Povos e agricultores familiares, e não, exclusivamente, em favorecimento as empresas multinacionais. Sendo assim, é necessário avanço no fomento e nas pesquisas quanto à produção de ciência e tecnologia para a autonomia produtiva, soberania e segurança alimentar, do território e do meio ambiente, quanto a forma de cultivar a terra na produção de plantas medicinais e alimentos.

Nesse sentido, os questionamentos supracitados anteriormente contribuíram para a realização de pesquisas teóricas de forma a contextualizar o processo sócio-histórico e delinear a importância das tecnologias tradicionais imbricada a demanda socioeconômica latente no setor de plantas medicinais. Sendo assim, a contextualização teórica será disposta nos dois primeiros artigos de revisão para compreensão da tese em estudo no que tange a potencialização de tecnologias sociais no cultivo de plantas medicinais como ferramenta estratégica para autonomia de agricultores familiares e tradicionais:

Artigo 1. Desafios da agricultura orgânica na produção de composto e vermicomposto na produção de plantas medicinais: Uma demanda socioeconômica

Artigo 2. Substâncias Húmicas e Microrganismos Eficientes: Elicitação de Plantas Medicinais in vivo- Uma revisão

Por fim os resultados e discussão também foram apresentados no formato de artigos (publicados e submetidos), perfazendo assim os artigos (3, 4, 5 e 6). Dessa forma, segue abaixo o fluxograma do trajeto percorrido na execução desta pesquisa e os respectivos artigos citados:



3 Conclusão

As três formulações de vermicompostagem podem ser registradas como fertilizantes orgânicos composto classe A de acordo com a legislação brasileira, além de apresentarem elevada atividade microbiana e teor de fitohormônios que promovem o crescimento de plantas, supressão de patógenos, atuam na ciclagem de nutrientes, restauração e reestruturação do solo, bem como, se reafirma como uma tecnologia social de grande importância e qualidade na gestão de resíduos sólidos orgânicos, e, para autonomia produtiva de agricultores familiares e tradicionais.

Quanto a sua aplicação no cultivo de Orégano, o vermicomposto é um potencial veículo inoculante para o *Bacillus subtilis*, sendo que o método de inoculação dos microrganismos, apresentam diferenças na responsividade da cultura, bem como a aplicação de *Bacillus subtilis* e microrganismo eficientes influenciaram na produção de biomassa e óleo essencial de *O. vulgare*.

Verifica-se que quanto ao método de inoculação do *Bacillus subtilis*, quando a rizobactéria é imobilizada em cápsulas de alginato desempenha maior eficácia, promovendo a maior produção de óleo essencial (OE) de orégano, e que a época de corte, é um fator relevante para a produção desta espécie.

Ademais os óleos essenciais provenientes do cultivo com aplicação de fertilizantes orgânicos, apresentaram atividade antimicrobiana moderada e forte, enquanto que o óleo essencial obtido do cultivo convencional, com NPK, não apresentou atividade antimicrobiana. Por fim, o vermicomposto com inoculação de microrganismos eficientes da mata nativa ou com inoculação de *Bacillus subtilis* encapsulado podem ser aplicados em substituição ao fertilizante químico sintético NPK na produção de *O. vulgare* sem comprometer qualquer um dos parâmetros avaliados para a cultura.

Referências

- ABRELPE – Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil**, 2020.
- ARANCON, N. Q.; EDWARDS. C. A.; BAKENKO, A., CANNON, J. GALVIS, P. METZGER, J. D. Influences of vermicomposts, produced by earthworms and microorganisms from cattle manure, food waste and paper waste, on the germination, growth and flowering of petunias in the greenhouse. **Applied soil Ecology**, v. 39, p. 91 -99, 2008.
- AUDEH, S. J. S.;LIMA, A. C. R.; CARDOSO, I. M.; CASALINHO, H. D.; JUCKSCH, I. J. Qualidade do solo: uma visão etnopedológica em propriedades agrícolas familiares produtoras de fumo orgânico. **Rev. Bras. De Agroecologia**, v. 6 n. 3, p. 34- 3, 2011.
- ROLA M. ATIYEH, CLIVE A. EDWARDS, SCOTT SUBLER & JAMES D. METZGER Earthworm-Processed Organic Wastes as Components Of Horticultural Potting Media for Growing Marigold and Vegetable Seedlings, **Compost Science & Utilization**, v. 8, n. 3, p. 215-223, 2000.
- DAGNINO, R. Tecnologia Social: contribuições conceituais e metodológicas [online]. Campina Grande: **EDUEPB**, 318 p, 2014.
- DAL BOSCO, T. C.; GONÇALVES, F. ANDRADE, F. C.; JUNIOR, I. T.; SILVA, J. S. SBIZZARO, M. Contextualização teórica: compostagem e vermicompostagem, 20 -42. In: Compostagem e vermicompostagem de resíduos sólidos: resultados de pesquisas acadêmicas. **Editora Edgard Blücher**, 2017.
- DIONÍSIO, A. J. Vermicompostagem: Produtos derivados e aplicações. **Agbook**, 2021.
- KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 3, p. 2006 – 220, 2005.
- EIDT, S. J. E UDRY, C. Sistemas Agrícolas Tradicionais no Brasil. **Embrapa, Brasília-DF**, 2019
- FLOR, L. R. **Qualidade do solo em Agroecossistemas: a percepção do agricultor quilombola**. (Dissertação). Universidade Federal de Pelotas, 62p, 2018.
- HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C. R.; CUNHA, G. VIEIRA, D. The Brazilian phytotherapics industry: challenges and opportunities. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559, 2017.
- LIM, S. L.; LEE, L. H.; WU, T. Y. Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: Recent overview, greenhouse gases emissions and economic analysis, **Journal of Cleaner Production**, v. 111, p. 262 - 278, 2016.

- MARTÍN, J.D.; SHCIEDECK, G. Nível de desenvolvimento e potencial da minhocultura e da vermicompostagem. In: ANJOS, J.L; AQUINO, A.M.; SCHIEDECK, G. Minhocultura e vermicompostagem: interface com sistemas de produção, meio ambiente e agricultura de base familiar. **Brasília, DF: Embrapa**, 2015. Cap. 1. P. 10-39.
- MENDONÇA, M. L. The role of agriculture in international relations and the construction of the concept of agribusiness. **International Context**, v. 37, n. 2, p. 375-402, 2015.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. Brazil in the context of plants and derivatives quality control. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 435 – 4040, 2010.
- PEREIRA, M. M. A., et al., Challenges of organic agriculture for the production of composts and vermicompost for the production of medicinal plants- A socioeconomic demand. **Biosci. J.**, v. 36, 1, p. 71-82, 2020.
- PEREIRA, M. M. A. ET AL. Humic Substances and Efficient Microorganisms: Elicitation of Medicinal Plants—A Review. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 7, p. 268, 2019.
- PEREIRA, L. A.; SOUSA, R. A. D. Intensive use of pesticides – the new face of the agrarian issue. **OKARA: Geography under discussion**, v. 10, n. 1, p. 185-19, 2016.
- RODRIGUES, W. Competitiveness and institutional change in the productive chain of medicinal plants in Brazil. **Interações (Campo Grande) [online]**, v. 17, n. 2, p. 267 -277, 2016.
- SAMPAIO, R. M. O.; NETO, J. C. G. The paradigm of the intense use of agrochemicals in Brazil under the context of the globalization of agriculture. **Journal of Agrarian and Agri-Environmental Law**, v. 4, n. 1, p. 111–129, 2018
- TORRES, K. R. The local productive arrangements (APLs) in the context of the implementation of the Policy and the National Program of Medicinal and Phytotherapeutic Plants. 2015 In: BRAZIL. **Ministry of National Integration. Celso Furtado Regional Development Award 2014 Tribute to Armando Dias Mendes**. Brasília: Ministério da Integração Nacional. CDD 22.ed. – 615.321
- WU, T.Y.; LIM, S.L.; LIM, P.N.; SHAK, K.P.Y. Biotransformation of biodegradable solid wastes into organic fertilizers using composting or/and vermicomposting. **Chemical Engineering Transactions**, n. 39, p. 1579-1584, 2014.

SEGUNDA PARTE

Artigo 1

Challenges of organic agriculture for the production of composts and vermicompost for the production of medicinal plants – *A socioeconomic demand*

Artigo publicado na Bioscience Journal: <http://dx.doi.org/BJ-v36n0a2020-53565>

Abstract

Although the demand for organic fertilizers in agriculture is growing, it remains incipient in some production sectors, such as medicinal plant production, which does not possess specific technology for its development. Solid residues are highly contaminant to water sources, soil, populations and biodiversity but can potentially be used to produce organic composts and vermicompost, such production not only enables nutrient recycling but also acts on soil conditioning, increasing soil organic matter and improving its physical, chemical and biological characteristics, as well as strengthening organic production with an emphasis on medicinal plant production. In this context, recommendations for and applications of organic fertilizers available in the market were reviewed; in addition, the imminent socioeconomic demand for organic compost and vermicompost production was contextualized based on residues from coffee and sugarcane production and cattle farming for application to the medicinal plant production chain. It is concluded that although these sectors produce a considerable amount of residues, they are not being reused in formulation of organic composts and vermicompost, and commercial organic fertilizers recommended for medicinal plant production were not found.

Key-words: Solid residues; Secondary metabolism; Agroecology; Sustainability; Organic agriculture

1 Introduction

Medicinal plants play an important role in health maintenance and comprise the most accessible treatment for 80% of the population ¹. The medicinal plant sector is a promising market, with revenue of approximately U\$\$ 160 million/year in Brazil, and medicinal plants are its raw material ².

The cultivation of medicinal plants demands care, since they are used for therapeutic purposes, and organic practices are therefore of interest. Accordingly, the use of organic composts and vermicompost in agriculture is of great relevance, since it is associated with care for the environment ^{3, 4, 5} being beneficial for biodiversity, environment, fauna and consumers, which have a high demand for products that are free from chemicals and/or genetic modification ^{6, 7, 8}.

Agricultural and animal farming residues, when disposed of inadequately and in a disorderly manner, have environmental impacts because of the generation of large quantities of contaminants, such as feces, toxic metals, inorganic salts, pathogens, lixiviation and toxic gas emission, especially in containment systems ^{9, 10, 11}, nutrient immobilization by microorganisms, and contamination of water reserves ¹². However, these residues can potentially be used in the formulation of vermicompost and organic composts that can be applied to medicinal plant production ^{4, 13, 14}.

Recommendations for organic composts and vermicompost for medicinal plant cultivation that may result in both biomass gain and increased concentrations of bioactive compounds with pharmacological and biological interest remain incipient. Therefore, the aim of this review was to contextualize the importance of reusing agricultural and animal farming residues to produce organic composts and vermicompost aimed at the production of medicinal plants and active compounds of pharmacological and biological interest.

1.1 Factors determining the stagnation of medicinal plant production

The establishment of agricultural production chains is not an isolated factor within the economic development of countries; there are socioeconomic and historical processes intrinsic to the production of food, goods and services ¹⁵. In this context, changes in agriculture began with the Green Revolution and culminated in the economic globalization that began in the 1990s; this globalization was organized around large companies, agricultural industries and multinationals that control the world market ^{16, 17}

Ever since the colonial period, an essentially organic based-agriculture has been replaced by techniques that depend on chemical inputs, whereas the Brazilian agricultural

policy prioritizes incentives to commodity export^{18, 19, 20} with agribusiness justifying production chains that have the goal of gathering agrochemical, industrial and commercial activities and land monopolies and directing them toward the external market^{21, 22}.

To establish agriculture and animal farming, it has been necessary to standardize cultivation and to industrialize and optimize production chains, which are essential factors in the expansion of agribusiness at an international level, consolidating the standard food production model in Brazil²³.

In parallel with the green revolution, the industrial revolution promoted the industrialization of the countryside, which had strong environmental impacts caused by the intensive use of fossil fuels^{19, 23}. In this context, the pharmaceutical industries developed side by side, comprising the hegemonic production model of “disease and cure” and contributing to the irrational use of agrotoxics and drugs as a way of maintaining profit and hegemony^{24, 25, 26}.

Therefore, although populations have historically used medicinal plants, after the industrial revolution, natural products were replaced by synthetic drugs on a massive scale. The New Chemical Entities of pharmaceutical products recorded that at least 27% of synthetic drugs originate from plant biodiversity and are formulated from natural products via chemical synthesis²⁷. Therefore, there is a deficit in the development of services, technologies and research related to medicinal plant production in Brazil²⁸.

The stagnation observed in medicinal plant production is caused by the fact that food, natural products and drug production are not foreign to societal factors but instead depend on political and economic interests²⁹. In this scenario, medicinal plant production was not historically recognized as an agricultural production chain or as having political and economic interest; it only reemerged as potent and innovative in the 2000s³⁰. Accordingly, there is an imminent demand for technologies and research in medicinal plant production^{31, 32, 33}.

1.2 The brazilian scenario of medicinal plant and herbal drug production: expanding demand

The use of medicinal plants in popular medicine in Brazil, especially by traditional peoples (Quilombolas, Native Peoples, Riparian Communities), is historically expressive and has been exploited by Brazilian researchers and the pharmaceutical industry^{34, 35}. The

interest in plant-derived drugs, especially from medicinal species, is growing worldwide given that 30% of the available therapeutic drugs are either directly or indirectly derived from natural products^{36, 10, 25}.

Brazil is the country with highest biodiversity in the world, with an estimated over 50,000 species of higher plants (20-22% of the total worldwide), along with mammals, birds, insects and microorganisms². The use of medicinal plants by the population through living pharmacies and phytotherapy²⁸ are essential to meet this demand³⁷. Brazilian revenue from this sector is approximately US\$ 160 million per year, constituting a promising market whose raw materials are medicinal plants².

The high profitability of herbal drug production contradicts the myth by the synthetic pharmaceutical industry that this market is of little economic importance³⁸. In addition, the implementation of RDC 26/2014, regulating “Traditional Phytotherapy Products”, contributed to the sector’s development, demanding advances to establish the production chain².

Medicinal plants (native and exotic) and their derivatives are used by the Brazilian population and are among the main therapeutic resources for the traditional and complementary/alternative medicine (TM/CAM) used in primary health care, according to a diagnostic by the Ministry of Health³⁹. This enables the appearance of new opportunities for the creation of production cooperatives both in traditional communities and in companies.

According to Marques⁴⁰, establishing policies for medicinal plants and herbal drugs depends on multiple investments in their production chain, namely, by universities and companies³⁹ from the plant to the final product. In this sense, technologies need to be developed that support medicinal plant production from farms to processing units and/or industry. Therefore, there is a socioeconomic demand for investment in medicinal plant production chains from cultivation to processing to advance the national pharmaceutical industry, which depends on the supply of raw material at an industrial scale to develop herbal and natural drugs with safety, efficacy and quality certification; such drugs demand fewer resources and have lower risks than synthetic drug production^{41, 42, 10, 43}.

Drug production is therefore an essential factor of national sovereignty and safety⁴⁴. However, because of socioeconomic and political factors, despite its biodiversity, Brazil still depends on raw material produced by multinationals from developed countries such as USA, China, Israel, Korea and India^{34, 36}. Given this scenario, for the last 15

years, the Ministry of Health has invested in public policies to promote and consolidate medicinal plant production and strengthen the national pharmaceutical industry. Some of these national policies were the National Policy of Integrative and Complementary Practices - National Policy of Integrative and Complementary Practices – PNPIC ⁴⁵, the National Policy of Medicinal Plants and Herbal Drugs (National Policy on Medicinal Plants and Herbal Medicines, 2006) and the National Program of Medicinal Plants and Herbal Drugs (National Program for Medicinal Plants and Herbal Medicines – PNPMF).

The public policies mentioned above established important decrees for productive advancement, such as RDC n° 60 (2011), approving the Herbal Drugs Form of the Brazilian Pharmacopoeia, which contains 83 herbal drug monographies, and RDC n° 13 (2013) of Good Practices for Traditional Herbal Drug Production and the National Drug List (2014).

The National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA) regulates the analysis of agrochemical residues in the Brazilian Pharmacopoeia, but residues of undesirable and undeclared substances such as pesticides, radioactive materials, pathogens, mycotoxins, heavy metals and arsenic remain present in plant and herbal drugs ⁴⁶. The PNPMF guidelines establish actions with the aim of promoting technological, economic and social development that require articulation between institutions to stimulate and consolidate the production complex.

The Local Productive Arrangement, which is aimed at strengthening the implementation of this public policy and includes stages from input production (cultivation/management) to industrialized herbal drug production, shows the innovation, economic, technological and social potential of industrialized herbal drugs ²⁸, and considers family farming one of the main components of this production chain (Figure 1).

In this context, establishing a medicinal plant production chain remains an imminent demand, requiring basic studies from production of inputs to be used in plantations to evaluations of the active components present in the planted species, with the aim of meeting the safety and efficacy criteria for medicinal plant and herbal drug production.

1.3 Organic production panorama in Brazil

According to the International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), organic production systems are still expanding. Organic production occupies approximately 35 million hectares worldwide, especially in Europe (8.2 million hectares), Latin America (8.1 million hectares – Brazil and Argentina), the USA, Japan and Australia. It is practiced in 150 countries, mostly on family farms ⁶.

This expansion is related both to environmental problems and food contamination caused by conventional and industrial agriculture and to the fact that organic-based agriculture is beneficial to biodiversity, environment, fauna and consumers, who have a high demand for products that are chemical free and/or not genetically modified ⁶.

According to the 2009 Agricultural Census, organic producers in Brazil represented 1.8% (or 90,497) of total agricultural farms. The main areas of development are cattle and other animal breeding (41.7%), temporary plantations (33.5%), permanent plantations that include fruit trees and coffee (10.4%), horticulture/floriculture (9.9%) and forestry (3.8%) ⁴⁷.

According to the 2006 IBGE Census, approximately 1.7 million hectares are estimated to be under organic management in Brazil ⁴⁷ with most farms being small, of family origin, and concentrated in the states of Bahia (15,194), Minas Gerais (12,910), Rio Grande do Sul (8,532) and Paraná (7,527).

Although organic production is growing, especially in Brazil, it still faces great difficulties related to public policies, lines of credit, commercialization, investment in specialized technology for input and seed supply, infrastructures, and agro-industries, all of which are factors that affect scale production ^{6, 48}.

In addition, agricultural research has been inefficient in responding to the needs of the organic production system, with the challenge of production expansion being related to research investment, development and technological innovation. Science making and ways of knowledge generation that are not segmented according to the “agrobusiness” development model (conventional agriculture centralized in multinationals) need to be reevaluated.

1.3.1 Agricultural and animal farming residues

According to a report from the Institute of Applied Economic Research ⁵⁰, in 2009 an estimated 291 million tons of residues were generated by agro-industry associated with

agriculture, and approximately 1.7 billion tons of waste were generated by animal farming, which are contaminant sources because of their greenhouse gas emissions and nitrogen release into the soil and water ⁵¹.

Composting is the most effective, alternative and adequate method of solid organic residue treatment for agricultural use ^{52, 53}. It reuses residues and contributes to environmental conservation, addressing economical and financial questions ⁵⁴ through the generation of new products demanded for agricultural production.

The agricultural and animal farming sector is vast, resulting in high production and availability of residues, both of plant (e.g., coffee straw, sugarcane bagasse, vinasse, saw dust, cakes) and of animal origin (e.g., cattle, horse, pig and poultry manure). In Brazil, the production of these agricultural and animal farming byproducts is distributed per region, which facilitates their reuse for organic compost production (Figure 2).

The main agriculture and animal farming production chains in Brazil are centered on coffee, dairy cattle and sugarcane production. In 2017, the coffee harvest was 45.5 million bags, 79% of them Arabica coffee; dairy production increased 3%, with 34.5 billion liters; and sugarcane production increased 2.3% in 2016/2017, an increase rate that should result in a production of 45.5 million tons in 2026/27 ⁵⁴. This affects the organization of lines of credit, available technologies, and production areas.

1.3.2 Market analyses of organic composts and vermicompost recommended for medicinal plant production

In Brazil, agribusiness is well developed in terms of goods, products, research and technological services applied to agriculture and animal farming. However, because of the technological packages derived from the Green Revolution, research and technologies are directed at meeting the interests of big companies and multinationals, directly affecting the development of technologies that contribute to advances in agroecology, organic production, traditional knowledge, and other sectors of organic production ¹⁶.

The internal market is stable in terms of demand for mineral fertilizers, insecticides, fungicides and other products destined for conventional agriculture. However, other agricultural sectors require standardized and certified products regarding their application and recommendation for unconventional agricultural production. Of the production sectors focused on agroecology and its components, the best-established

production chains are those of big crops, fruit trees and horticulture, and although few, there are some products available to establish such crops in the field.

For medicinal plant production, which is not exclusively focused on biomass yield (kg/ha¹) but on the yield of the productive complex, including essential oils and active components with biological and/or pharmaceutical action, there are no commercial products formulated for plant development and production for medicinal purposes.

It should be highlighted that medicinal plant production should not be based on structural or phenological similarity with leaf, fruit and/or root vegetables or with landscaping plants. Medicinal plant production requires research and technology that can promote and establish massive production chains capable of supplying the internal market and strengthening current public policies, such as RENAME, RENISUS, PNPMF and APL.

These public policies are aimed at strengthening the medicinal plant production sector, thus guaranteeing the medicinal plant supply, i.e., the raw material destined for essential drug and dry plant production to be acquired by the users of the Unified Health System (SUS). Although these public policies are currently in force, medicinal plant production remains insufficient to meet the national demand for raw materials.

Basic advancements in medicinal plant production are therefore necessary, namely, regarding inputs (organic composts and vermicompost), plantation and management protocols, and other goods, services and technology. The organic products (organic composts and vermicompost) currently available in the market for agroecological cultivation (organic, biodynamic, ecological and biological), their composition and recommendations for their application to crops are presented in Table 1.

Table 1. List of commercial organic composts and vermicompost available in the Brazilian market (continue)

| Product | Composition | Agricultural recommendation |
|-------------------|-------------------------------------|---|
| (1) TeraFertil | Sanitary waste and organic residues | Citrus trees, eucalypt, sugarcane, flowers, coffee, fruit trees, trees, flowers and lawns |
| SaneFertil | Sanitary waste and organic residues | Eucalypt, sugarcane, ornamental plants, coffee |

(2)

| | | |
|--------------------|---------------|--|
| EcoAdubo | | All types of plants: delicate flowers such as orchids, roses and violets; ornamental plants, such as ferns and palm trees, lawns |
| Organic fertilizer | Not described | |

(3)

| | | |
|----------|---------------|---|
| MAGMATon | Not described | Seedlings, Leaf vegetables, fruit vegetables, tubers, coffee, cereals, citrus trees, bananas, fruit trees, gardens, flowers, lawns, pastures and grass fields |
|----------|---------------|---|

(4)

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| McBiofert | Animal origin and free amino acids | All crops |
| Folhito MIX Organic Fertilizer | Commercial laying hen manure (pure manure), gypsum (sulfur rich), sewage sludge from cold-storage rooms and agroindustry (nitrogen rich), eggshell (calcium rich), ash from wood-burning boilers (phosphorus rich), unusable feed | Corn, tobacco, soybean, pastures (oat, ryegrass, Tifton grass, Aries, Brachiaria), wheat, barley, canola, rice, bananas, onions, native fields, walnut trees, olive trees, gardens, vegetables, fruit trees |
| Lithothamnium Algae | Marine algae Lithothamnium | Cotton, corn, rice and wheat, soybeans, beans and peanut, sugarcane, coffee and cocoa, garlic, onion, carrot and yam, potatoes, cassava, leaf and fruit vegetables, fruit trees, garden plants, ornamental plants, orchids |
| Adubos Ouro | Poultry manure | All crops |

(5)

Azet

-

| | | |
|------------------|---|---|
| | Bagasse, grape stems and seeds, peat, ash from acacia wood, eucalypts and poultry manure and bed. | |
| Alga MC | Marine algae - <i>Ascophyllum nodosum</i> | Citrus trees and fruit trees, melons, watermelons, zucchini, cucumbers, potatoes, onions, artichokes, tomatoes, eggplants, peppers, strawberries, lettuce, spinach, celery, alfalfa, clover, vines |
| Algasol | Marine algae (<i>Ascophyllum nodosum</i>), natural extracts, betaine, oligosaccharides, humic extract | All crops |
| MC Armor | Amino acids and biomolecules | Woody plants, vegetables, citrus trees and ornamental plants |
| MC Biocomplex | Plant extracts and micronized mineral phosphorus, amino acids, humic substances and natural plant extracts, yeast protein and rock phosphate. | Horticulture |
| MC Biogo | AATC: 5.00%; Fulvic acid 0.10% | Vegetables, strawberries, potatoes: 50-100 ml / hl; olive trees, citrus trees, fruit trees, vines: 50 ml / hl.; winter cereals, rice, beets, cotton |
| Biole-C | Protein hydrolysate | Nurseries, ornamental plants, tropical plants, vine: 80-100 g / ha; fruit trees, olive trees, legumes, strawberries: 100-120 g / ha; cereals, corn, rice, industrial crops: 180-200 g / ha |

| | | |
|--|--|--|
| Biole-R | Protein hydrolysate, fulvic acid: 4.80% (oligopeptides, extract of algae <i>Ascophyllum nodosum</i> | Fruit trees, olive trees, strawberries: 4-5 l / ha; fruits and vegetables: 4-5 l / ha; flowers: 4-5 l / ha; seeds |
| MC Ecosoil S 10-0-5 | Granular compost, Humic acids, fulvic acids 45%. | All crops |
| MC Ecosoil S Humic | Potassium enriched leonardite humic and fulvic acids | Tree species |
| MC Ecosoil S Petro 330 Ryzeaplus | Algae and RyZeaPlus (last generation mycorrhizae) and microorganisms | Olive trees: 800-1000; vines: 600-800; cereals: 500-700; durum wheat, wheat, lupine beans: 300-400; fruit trees: 800-1000; apricots, tangerines: 900-1100; vegetable crops: 800-1000; radishes, onions: 600-800; zucchini, carrots: 600-800; endives, spinach, potatoes: 700-900; tomatoes, 1000-1100; ornamental plants, lawn |
| MC Fulvic S 95 | Fulvic acids: 95% | Not described |
| MC Humic S 80 | Humic organic amendment composed of potassium humate from American leonardite, treated with potassium hydroxide | Alfalfa and forage: 3-10 kg / ha; rice, cereals and beans: 2-3 kg / ha; lawns and sport areas: 1-2.5 kg / ha; citrus trees, fruits, bananas and vines: 1-3 kg / ha; corn, potatoes and beets |
| MC Humic- Fulvic 20 | Yeast and microorganisms | Vegetables, fruit, citrus trees: 7-12 l / ha; Olive trees: 12 l / ha; Banana: 50-60 |

| | | |
|---------------------------------|--|---|
| MC Solo Orgânico L 855H11 | Total humic extract 14.37%; humic acids 5.62%; fulvic acids: 8.75%; ADENINE, ZEATIN, BETAINS and MANITOL | Vegetables, strawberries, citrus, vines, bananas |
| (6) Agrobio | Boric acid, wood ash, castor bean cake, meat and bone meal, copper sulphate, cobalt, manganese, magnesium, zinc and water, milk, molasses, magnesium thermal phosphate, iodine solution and manure | Seedlings, leaf and fruit vegetables, perennial crops |
| Biogea | Fresh organic matter: fresh manure, remains of organic vegetables and fruits, coco- grass, natural phosphate and rock powder | Seedlings, fruit and leaf vegetables, perennial crops and fruit trees |
| Biofertilizer- | Whey, bone meal, ash, molasses and microorganisms | Vegetables, cereals and fruit trees |
| (7) Folhito Mix | Commercial laying hen and broiler manure – pure manure; gypsum – sulfur (S) rich; exhausted substrate from mushroom production; eggshells - calcium (Ca) and sulfur (S) rich; unusable feed | Corn, tobacco, soybeans, pastures, vegetables, gardens, rice, bananas, onions and fruit trees |
| Folhito Compostagem | Poultry bedding; animal manure; Industrial process sweep; sewage sludge; green residues (tree pruning and biomass residues and similar); | Not described |

residues from cafeterias or
restaurants; dust from industrial
processes (tobacco dust,
sawdust and similar); ash from
biomass combustion boilers;
animal and plant remains in
general

| | | |
|-------------------------------------|---|---|
| (8) Fishfertil- active | Fish hydrolysate (sea fish), sugarcane molasses, citric acid and saccharides | Commercial crops and ornamental plants |
| Fishfétil K | Fish hydrolysate (sea fish), sugarcane molasses, potassium sulfate, citric acid and saccharides | Commercial crops and ornamental plants |
| Fishfétil indure | Fish hydrolysate (sea fish), crustacean hydrolysate (crustacean shells), sugarcane molasses, edible citric acid and saccharides | Flowers, ornamental plants and lawns |
| Fishfétil classic | Fish hydrolysate (sea fish), sugarcane molasses, citric acid and saccharides | Commercial crops |
| (9) MZE Biorganic | Rock powder, cereal meal and sugarcane molasses | Not described |

Legend: List of Companies accessed: (1) Terra Fértil –organic fertilizer; (2) Plantei – fertilizers - organic; (3). NutriSaфра; (4). MfRural; (5) Neudfor; (6) Agrobio; (7) Folhito Mix; (8) Fish fértil; (9) Microbio;

The agricultural and animal farming residue composition of the 33 products listed above is diverse. However, the use of coffee straw and vinasse is not directly mentioned, and most are enriched with some elicitor molecule (fulvic acid, humic acid, free amino acids and algae) in addition to microorganisms that efficiently contribute to promoting plant growth ⁵⁵.

These commercial products are mainly destined for cereals, fruits and vegetables, annual crops and flower production. No recommendations for application to medicinal plants were found. Although many medicinal plants present similar development to some of the listed species, the focus is raw material and not the effect of the commercial product on the elicitation of active components with pharmacological and biological properties.

However, residue recycling is essential to reduce the consumption of natural resources in agriculture, since new products (organic composts and/or vermicompost) are produced from the residues of industrial and agricultural activities, which can be applied to the production of different crops. In addition to allowing for nutrient recycling, these organic composts and vermicompost act as soil conditioner, increasing the levels of organic matter and resulting in improved physical, chemical and biological soil characteristics ^{4, 13, 56, 14}.

However, composting is the most often used and accepted method of organic residue recycling in agriculture because it stabilizes the material, avoiding nutrient immobilization and phytotoxicity ⁵⁷. Organic compost has several benefits for agricultural production and for the soil, since in addition to supplying nutrients to plants, it promotes the complexation of toxic elements and micronutrients, improves soil structure, and results in higher microbial activity, soil carbon accumulation, and water infiltration and retention, acting as a soil conditioner ³.

The reuse of solid residues to produce organic composts and/or vermicompost is therefore a technology with potential for plant growth promotion, since the byproducts of agroindustry (agriculture and animal farming) constitute a health problem ⁵⁸, contaminating soil, water, air and people when they are not disposed of in a manner that is coherent and responsible toward the environment. In addition, conventional fertilizers

that depend on natural resources (mineral fertilizers) are becoming exhausted by the irresponsible exploitation of large agribusiness companies and multinationals.

The need for advances in the production of technologies applied to medicinal plant development and growth that not only promote raw material production but also elicit the secondary metabolism, resulting in higher essential oil yield and active ingredient concentrations, should be highlighted.

2 Conclusion

Agricultural production chains are of great importance to the economic movement of small and large producers. However, methods of reusing agricultural and animal farming residues need to be established to avoid contamination of water sources, soil, fauna, flora and population. In addition, countering the agribusiness production model, organic food production is undergoing constant growth, along with medicinal plant production, with a high demand for technologies, services and products. This sector will only be able to advance through the efforts of research institutions and continuing education, strengthening family farming and the permanence of families in the countryside. The production of specific organic composts and vermicompost for the production of medicinal plants (raw material) rich in active compounds with biological and pharmacological activity is therefore crucial to strengthening the national pharmaceutical industry for both the production of herbal drugs and the consolidation of public policies related to medicinal plants and herbal drugs through the prescription of dry plants by the SUS. It is highlighted that developing technologies and studies for the reuse of residues from sugarcane, beef and dairy cattle and coffee production for the production of commercial products and/or social technology, which can then be reapplied to the production sector, will fulfill the social duty of knowledge of the population and environment, generating jobs, products, sovereignty and food safety through the production of organic food and medicinal plants.

Reference

1. SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. Brazil in the context of plants and derivatives quality control. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010, 20 (3), 435-440. ISSN 0102-695X.
2. RODRIGUES, W. Competitiveness and institutional change in the productive chain of medicinal plants in Brazil. *Interações (Campo Grande)* [online]. 2016, vol.17, n.2 [access in 2019-09-23], 267-277. Available from Internet: <https://doi.org/10.20435/1984042X2016210>, ISSN 1518-7012
3. SANTOS, A. T. L. et al. Utilization of the organic fraction of urban solid waste for the production of organic compost. *Brazilian Journal of Amazonian Sciences*. 2014. 3 (1), 15–28. ISSN 2317-5729
4. WU, T.Y.; LIM, S.L.; LIM, P.N.; SHAK, K.P.Y. (2014). Biotransformation of biodegradable solid wastes into organic fertilizers using composting or/and vermicomposting. *Chemical Engineering Transactions*. 2014. (39): 1579-1584. ISSN 2283-9216
5. COTTA, J.A.O.; CARVALHO, N.L.C.; BRUM, T.S.; REZENDE, M.O.O. Composting versus vermicomposting: comparison of techniques using vegetal waste, cattle manure and sawdust. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 2015. 20 (1): 65-78. ISSN 1413-4152
6. WILLER, H.e KILCHER, L., (2010). *The World of Organic Agriculture - Statistics and Emerging Trends*. IFOAM
7. LOPEZ-GONZALEZ, J. A., SUAREZ-ESTRELLA, F., VARGAS-GARCIA, M. C., LOPEZ, M. J., JURADO, M. M., AND MORENO, J. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresour Technol*. 2015, vol.175, [access in 2019-09-23], 406-16. Available from Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.123>.
8. JIANG, T., MA, X., YANG, J., TANG, Q., YI, Z., CHEN, M., AND LI, G. Effect of different struvite crystallization methods on gaseous emission and the comprehensive comparison during the composting. *Bioresour Technol*. 2016, vol. 217, [access in 2019-09-23], 219-26. Available from Internet: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.046>
9. ERTHAL, V. J. T. et. al., Physical and chemical changes of an argisol by the application of bovine culture water. *Brazilian Journal of Agricultural and Environmental Engineering*, Campina Grande. 2010. (14): 467-477.

10. LIMA, L. O.; GOMES, E. C. Food or medicine? Plant species under Brazilian law. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas. [online], 2014, vol. 16, [cited in 2019-09-23], (3): 771–782. Available from Internet:https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_096
11. NOGUEIRA, R. E. G. et al. Disposal of solid waste from livestock activities and risks of environmental pollution in the community of the city of Cascavel – Paraná. *Brazilian Journal of Applied Technology in Agrarian Science*. 2015. 8(3): 93-101. ISSN 1983-6325
12. SILVA, C.A. Use of organic waste in agriculture. In: SANTOS, G.A. et al. (Ed.): *The Basics of Organic Matter: Tropical and Subtropical Ecosystems*. Porto Alegre: Metrópole. 2008. (32): 597-624.
13. MORAES, J. G. V., (2015). Biofertilizers: identification of regulatory barriers and proposals to make this agricultural input viable. 81 f. Dissertation (Master in Agribusiness) - School of Economics of São Paulo of the Getúlio Vargas Foundation, São Paulo.
14. SOARES, J.D.R. ET AL. Composting of agricultural residues: A source of humic substances. *Scientia Agraria Paranaensis*. 2017. 16(4): 414-421. ISSN: 1983-1471.
15. SOUSA, A. P. AND GOIÁS, B. S. (2015). Organic agriculture in Brazil na alternative for agricultural for development. *Electronic Journal of Economics of the State University of Goiás*. 11, 235 – 247.
16. LAZZARI, F. M.; SOUZA, A. S. Green Revolution: Impacts on Traditional Knowledge. 4^o International Congress of Law and Contemporary. [online], 2017, [cited in 2019-09-19]1–16. ISSN: 2238 – 9121. Available from Internet: <http://www.ufsm.br/congressodireito/anais>
17. MATOS, P. F.; PESSOA, V. L. S. Modernization Of Agriculture In Brazil And The New Uses Of The Territory. *Geo UERJ*. 2011. 2(22): 290–322. ISSN 1981-9021
18. FLORES, M. P.; GREGORI, M. S.; ARAUJO, L. E. B. Food safety and chemical-dependent agrarian production models. *Electronic Journal of the Law Course*, 318-328.
19. PEREIRA, L. A.; SOUSA, R. A. D. Intensive use of pesticides – the new face of the agrarian issue. *OKARA: Geography under discussion*. 2016. 10(1): 185-194. ISSN: 1982-3878
20. GURGEL, A. M.; GIRALDO, L. Reflections of the loss of state control of pesticides in Brazil and their regulation by the market. *Reciis – Rev Eletron Comun Inf Inov Saúde*. 2017. 11(3): 1-16. e-ISSN 1981-6278
21. SAUER, S.; LEITE, S. P. Agricultural Expansion, Prices and Land Appropriation by Foreigners in Brazil. *RESR*. 2012. 50(3): 503-524. ISSN: 0103-2003

22. MENDONÇA, M. L. The role of agriculture in international relations and the construction of the concept of agribusiness. *International Context*. 2015. [access in 2019-09-19] 37(2): 375-402. Available from Internet: http://www.snh2013.anpuh.org/resources/anais/27/1361370156_ARQUIVO_ampunhartigorelacaoemadoleceregarvidez2013.pdf
23. SAMPAIO, R. M. O.; NETO, J. C. G. The paradigm of the intense use of agrochemicals in Brazil under the context of the globalization of agriculture. *Journal of Agrarian and Agri-Environmental Law*. 2018. 4(1):111–129. ISSN: 2526 – 0081
24. MONTEIRO, E. R.; LACERDA, J. T. D. Promoting the rational use of drugs: a proposal for an evaluation model of municipal management. *Health in Debate*. [online], 2016, vol. 40(111), [[access in 2019-09-19], 101-116. Available from Internet: 10.1590/0103-1104201611108
25. MENDONÇA, V. M. et al. Traditional phytotherapy and integration and complementary practices in the health system of Brazil Valéria. *Health Themes*. 2018. 18(1): 66–97. ISSN 2447-2131
26. BARROS, J. R. M. INDUSTRY AND BRAZILIAN AGRIBUSINESS. IDBI: 28.
27. ALVES, L. F.; PONTES, T. V. C. Research with Chemistry and Pharmacology of Natural Products in Brazil : A Pesquisa com Química e Farmacologia de Product. *Revista Virtual de Química*. 2017. 9(4): 1394-1433. ISSN: 1984 – 6835.
28. TORRES, K. R. The local productive arrangements (APLs) in the context of the implementation of the Policy and the National Program of Medicinal and Phytotherapeutic Plants. 2015 In: BRAZIL. Ministry of National Integration. Celso Furtado Regional Development Award 2014 Tribute to Armando Dias Mendes. Brasília: Ministério da Integração Nacional. CDD 22.ed. – 615.321
29. RONDÓ, M.; LOPES, M.. Foreign Policy and Democracy: the construction of new paradigms in. Friedrich Ebert Stiftung, 2016.
30. PIMENTEL, V. et al. Brazilian biodiversity as a source of pharmaceutical innovation: a new hope? *Revista do BNDES*. [online] 2015, vol.43. [cited in 2019-09-19], 41–89. Available from Internet: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/5602>
31. HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potential of Brazilian native plants for the development of phytomedications using as an example *Lippia alba* (MILL .) N . E . BROWN (VERBENACEAE). *Saúde*. [online], 2007, vol. 33(1), [cited in 2019-09-19], 43–48. Available from Internet: <https://pdfs.semanticscholar.org/a740/8291da48ac5ad9e7b67c81f11a2ac8c6a0a8.pdf>

32. RIBEIRO, D. A. et al. Therapeutic potential and use of medicinal plants in an area of Caatinga in the state of Ceará , nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.*. 2014. 16(4): 912–930. ISSN: 1516 – 0572
33. ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. F.; PIMENTA, F. P. Research groups and their scientific literature on medicinal plants : an exploratory study in the state of Rio de Janeiro. *Journal Fitos.* [online], 2015, vol. 9(1), [cited in 2019-09-19], 45–54. Available from Internet: <http://doi.org/10.5935/2446-4775.20150005>
34. CALIXTO, B, C. J., & JUNIOR, J. M. S. Drug Development in Brazil: Challenges. *Gazeta Médica Da Bahia.* 2008. (78): 98–106.
35. LIRA, T. D. M.; CHAVES, M. D. P. S. R. Riverside communities in the Amazônia: sociocultural and political organization. *Interações (Campo Grande).* 2016. 17(1): 66-76. ISSN: 1518-7012
36. KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* [online], 2005, vol. 4(3), [access in 2019-07-13], 206-220. Available from Internet: 10.1038 / nrd1657
37. ARAÚJO, R. F. M. et al. Phytomedicines: Legislation And Market in Brazil. *Rev. Bras. Farm.* [online], 2013, vol. 94(3), [cited 2019-06-23], 331 -341. Available from Internet: <http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-v94n3-18.pdf>
38. CARVALHO, A. C. B. et al. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. *Braz. J. Pharm. Sci.*, São Paulo. 2011. 47(3): 467-473. ISSN: 2175-9790.
39. MACEDO, J. A. B. Medicinal and phytotherapeutic plants in primary health care: contribution to professionals. *Journal Fitos.* [online], vol.62, [cited 2019-06-23], 32–39. Available from Internet: <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.2016004>
40. MARQUES, L. C.; PETROVICK, P. R. Normatization of the production and commercialization of herbal medicines. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P .; MENTZ, L. A .; PETROVICK, P.R., (2007). *Pharmacognosy: from plant to medicine.* 6 ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, 327-369.
41. CALIXTO, J.B. et al. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines foerbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000. 33(2): 179-189. ISSN: 0100-879X
42. LOPES, K. M. T.; NASCIMENTO, P. R.. Popular Culture and Science in the Phytotherapeutic. *Revinter.* 2014. 122–133.

43. MATOS, A. T. Treatment and Agricultural Utilization of Solid Residues. Viçosa, Minas Gerais: Ed. UFV, 2014. .
44. PADULA, R.. Health International Political Economy , strategic autonomy and national security. *Rev. Carta Inter.* [online], 2017. 12(2), [cited in 2019-09-01] 174–196. Available from Internet: 10.21530/ci.v12n2.2017.641
45. PERFEITO, J. P. S. and ANDREOTTI, P. F. Subject: Analysis of pesticide residues in herbal medicines 1st edition, Brasília, 2016. [june 2019]. Available from Internet: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14878e/s14878e.pdf>
46. BRASIL. Ministry of the Environment. 2011. National Solid Waste Program. Brasilia, 102.
47. SALVADOR, C. A. (2011). Analysis of the Agropecuaria Crop 2011/12 Organic Agriculture. Secretariat of Agriculture and Supply, Department of Rural Economy. ISBN: 9788562557019
- 48.

- ASSIS, M.A. et al. Research groups and their scientific literature on medicinal plants : an exploratory study in the state of Rio de Janeiro. *Journal Fitos*. 2015. 9(1): 1–71. DOI 10.5935/2446-4775.20150005
49. NETO, T. Disposal of solid waste from livestock activities and risks of environmental pollution in the community of the c. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*. 2015. (6325): 101–2015.
50. IPEA. INSTITUTE OF APPLIED ECONOMIC RESEARCH. Diagnosis of organic residues in the agrosilvipastoral industry and associated agroindustries. Research Report, Brasilia, 2012. 134p.
51. ORRICO JÚNIOR, M.A.P.; ORRICO, A.C.A.; LUCAS JÚNIOR, J. Composting of the solid fraction of swine wastewater. *Agricultural Engineering*, Jaboticabal. [online] 2009. 29(3), [cited 2019-06-16]483-491. Available from Internet :<http://www.scielo.br/pdf/eagri/v29n3/a15v29n3>
52. COELHO, C.; CAVANI, L.; HALLE, A.T.; GUYOT, G.; CIAVATTA, C.; RICHARD, C. Rates of production of hydroxyl radical and singlet oxygen from irradiated compost. *Chemosphere*. [online], 2011. 85(4), [cited 2019-06-23], 630-636. Available from Internet: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.007>
53. LASHERMES, G.; BARRIUSO, E.; HOUOT, S. Dissipation pathways of organic pollutants during the composting of organic wastes. *Chemosphere*. [online] 2012. 87(2), [cited 2019-06-23],137-143. Available from Internet: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.004>
54. NASCIMENTO FILHO, W. B. D.; FRANCO, C. R. Potential Assessment of Waste Produced Through the Agro-Industrial Processing in Brazil. *Virtual Journal of Chemistry*. [Online] 2015. 7(8), [cited 2019-06-23], 1968-1987. Available from Internet:10.5935 / 1984-6835.20150116
55. CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*. [online] 2014. 383, [cited 2019-08-16], 3 - 41. Available from Internet: 10.1007/s11104-014-2131-8
56. LIM, S.L.; LEE, L.H.; WU, T.Y. Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: recent overview, greenhouse gases emissions and economic analysis. *Journal of Cleaner Production*. [online], 2016 (111), [cited 2019-08-16], 262-278. Available from Internet: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.08.083>

57. GUIDONI, L.L.C.; BITTENCOURT, G.; MARQUES, R.V.; CORRÊA, L.B.; CORRÊA, E.K. Composting at home: implementation and evaluation of the process. *Tecno-Lógica*. [online], 2013. 17(1), [cited 2019-08-16], 44-51. Available from Internet: <https://online.unisc.br/seer/index.php/tecnologica/article/view/3640/2617>
58. DIAS, D. M., MARTINEZ, C. B., BARROS, R. T. V., AND LIBÂNIO, M., (2012). Model to domestic solid waste generation estimative in urban areas based on. Unicamp Scientific and Intellectual Production Repository.

Artigo 2

Humic Substances and Efficient Microorganisms: Elicitation of Medicinal Plants - A Review

Artigo publicado na Journal of Agricultural Science: [10.5539/jas.v11n7p268](https://doi.org/10.5539/jas.v11n7p268)

Abstract

In function of the green revolution the indiscriminate use of agrochemicals and pesticides in agriculture has been also shown in the production of medicinal plants, resulting in the increase of productivity but with high residual contamination and low rates in the production of secondary metabolites responsible for the biological and pharmacological activity in vegetable drugs. In another hand, new techniques of elicitation has been applied to stimulate the medicinal plants production through the organic and agroecological management, contributing for the increase of performance, quality and production. In this context, it is aimed with this review to present such as the humic substances: fulvic acid, humic acid and efficient microorganisms which influence and help the ontogeny and the secondary metabolites production of medicinal plants. The reviewed articles show that the use of fulvic acid, humic acid and efficient microorganisms in the production of medicinal plants contributes on the increase of biosynthesis, secondary metabolites production such as coumarins, alkaloids, phenylpropanoids and essential oils, as well as the increase of nutrients absorption, growth and development of species.

Keywords: biostimulation, essential oils, secondary metabolism, *in vivo*, humic acid

1 Introduction

Since the beginning of the green revolution the agriculture panoram has changed by the excessive use of fertilizers, pesticides, land mechanization and latifundia concentration (Lazzari & Souza, 2017; Matos & Pessoa, 2011). In order to increase productivity these agrochemicals has been indiscriminately used not only in grains and horticultural crops, but also in medicinal plants (Pereira & Raimunda, 2016).

The medicinal plants are essential source of secondary metabolites and bioactive compounds responsible for the biological and pharmacological activity of the plant *in*

vivo (Costa & Jorge, 2011; Czelusniak, Brocco, Pereira, & Freitas, 2012; Pereira & Cardoso, 2012; Gobbo-Neto & Lopes, 2007), as alkaloids, phenolic compounds, terpenes and others. Historically they have been used by the population through homemade crops, live pharmacies, as well as acquisition in natural products stores and industrial herbal medicines (Calixto & Siqueira, 2008).

In Brazil, the cultivation of medicinal species must be totally pesticide free. However, residues of undesirable and undeclared substances such as pesticides, radioactive compounds, pathogens, mycotoxins, heavy metals and arsenic are constantly found in plant-derived drugs and phytotherapies altering the quality of the products with therapeutic purposes in the treatment of various diseases (Brasil, 2014).

Research on the cultivation of species with therapeutic purposes is still recent. Therefore, some technologies used in the production of large crops and vegetables, such as the use of elicitors (endogenous or exogenous molecules) *in vivo* (Canellas et al., 2015), can be applied in the organic cultivation of medicinal plants. Since research with the use of elicitor agents has been focused more in *in vitro* culture (Rafiee et al., 2016).

Studies carried out with plants under field grown highlights the use of plant growth promoting fungi (PGPF), plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) (Adesemoye et al., 2009; Bhattacharyya et al., 2012), humic substances (fulvic and humic acids) (Canellas et al., 2014; Olivares et al., 2017), seaweed extracts (Craigie, 2011), hydrolyzed proteins and amino acids (Calvo et al., 2014). These bioestimulants can influence on ontogeny, secondary metabolite biosynthesis, efficiency and nutrient uptake by plants.

Researches have been done about the effect of bioestimulants such as microorganisms, rhizobacterium and humic substances on the production of medicinal plants *in vitro* (Halpern et al., 2015; Canellas et al., 2015; Olivares, 2017). Therefore, it is necessary to know if the content of secondary metabolites changes when the elicitor agents are applied *in vivo* and if its application in agroecological systems are economically and socially viable, overcoming the conventional agriculture and keeping the levels of productivity.

On this review, we show studies about the use of humic substances and microorganisms applied in the field (*in vivo*), their effect on ontogeny and on metabolites content in medicinal plants. The numbers of studies *in vivo* are extremely low, which makes it a scientific and social challenge for the advancement of agroecology and organic production of medicinal plants.

2 Humic Substances: Humic Acid and Fulvic Acid

The biological structure of the soil is rich in microorganisms that perform essential role in the carbon cycle and in the genesys of humic substances (Bakker et al., 2013; Fischer et al., 2017). Amongst the exudades released by the microorganisms present in plants, we can mention the formic organic acids, acetic, oxalic, tartaric and citric (Canellas et al., 2008; Zhalnina et al., 2018; Licá et al., 2018), the protons dissociate-helpers in the decomposition of minerals in soil in which middle life is too short, as well as the aromatic acids, benzene-carboxylic and phenolics (M. A. Baldotto & E. B. Baldotto, 2014).

The organic material is decomposed into new material (humus) through the microorganisms and chemical degradation of the biota constituting the biomolecules which are placed between the horizons O and A (Ebeling et al., 2011). The humic substances are organic compounds condensated that differ from biopolymers by its molecular structure and high soil persistence (Nebbioso & Piccolo, 2012). According to the International Humic Substances Society, the humic substances can be defined by macromolecules or supramolecules (Fischer, 2017).

The humic substances contain a hydrophilic portion and other one- hydrophobic (Canellas et al., 2008; Fischer, 2017) where the humic acid (HA) is founded turned to the inside part and a hydrophilic fulvic acid turned to the outside (Nebbioso & Piccolo, 2012; Drosos, 2017). These aggregate supramolecules are organised in high and low weight of organic compounds (Kawahigashi, 2005) and has varying specified structure features accordingly with the organic matter and time of transformation (Asli, 2010; Nebbioso & Piccolo, 2012).

The humic acids influence on the fruits, flowers and seeds development (M. A. Baldotto & E. B. Baldotto, 2015) that acts in several phases of the vegetable physiology (Canellas & Olivares, 2014) such as growth, development, photosynthetic structures of respiratory activity (Costa et al., 2008); changes on biochemical pathways as primary and secondary metabolism (Trevisan et al., 2011; Aminifard et al., 2012; Canellas & Olivares, 2014; Nardi et al., 2017). Due to all these beneficial effects of elicitors on plant productivity, they have attracted the interest of farmers and companies.

Researches show that humic substances contribute on the better absorption of nutrients (Halpern et al., 2015). They also perform indirect actions over the chemical and dynamic of the microorganism on the rhizosphere, altering the interaction soil-plant-

microbiota (Canellas & Olivares, 2014) in relation to the assimilation of macro and micro nutrients as a function of the increase on the permeability of the plasmatic membrane with the action of the humic substances (Silva Lima et al., 2014).

Changes on the uptake of nutrients and humic substances related to the absorption rates are explained by the kinetic parameters of absorption, which are estimated through the maximum absorption rate, ion concentration and minimum ion concentration in the solution that the plant cannot absorb (Silva Lima et al., 2014).

Therefore, the humic and the fulvic acid can influence directly and indirectly in the plants metabolism (Canellas et al., 2014; Vaccaro et al., 2015), altering the metal complexation, increasing the capacity of cationic exchange (Ateia et al., 2017; Lee et al., 2017; Kwiatkowska-Malina, 2018), nutrients supply and humidity retention, interfering on the ions transportation, respiratory activity, chlorophyll levels, nucleic acid synthesis and on the activity of several enzymes (Muscolo et al., 2013; Ozfidan-Konakci et al., 2018; Shahabivand et al., 2018).

Table 1. Overview of the medicinal plants species elicited by humic substances: fulvic and humic acid

| Scientific name | Application via | Evaluation | Pharmacogenic | Efficient Treatment | Results | Articles |
|--------------------------------------|--------------------|---|-------------------|---|--|-------------------------|
| <i>Justicia pectoralis</i> Jacq. | Pulverization | Coumarin | Leaf and dry stem | Humic dinamization CH ₃ Acid | Dinamizations > Coumarin rates on plants of 54.35% | Andrade et al. (2001) |
| <i>Lantana camara</i> L. | Soil | Growth development and | - | - | > Vegetative period and growth > Organogenesis | Costa et al. (2008) |
| <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | Leaf pulverization | Antioxidant activity, anthociocyns rates | Whole plant | - | > 88.0 & 89.33% anthocyanins and antioxidants > Efficiency in the absorption of N and P | Ahmed et al. (2011) |
| <i>Hyssopus officinalis</i> L. | Soil | Non definition | Leaf | 300 mg/L | > Biomass rates 88% > Essential oil rates 71% | Khazaie et al. (2011) |
| <i>Chrysanthemum indicum</i> L. | Leaf pulverization | Total Carbohydrates, proline concentration | Fresh plant | 1.0, 1.5 and 2.0% Humic Acid | > Total carbohydrates, chlorosis improvement < Proline rates | Mazhar et al. (2012) |
| <i>Capsicum annum</i> var. Red chili | Soil | Antioxidant, total phenols, flavonoids, content of capsaicin, lycopene and B-Carotene | Fruits | 100 mg kg ⁻¹ | > Antioxidants, flavonoids, capsaicine, carotenoids < Total phenols | Aminifard et al. (2012) |
| <i>Rhodiola rosea</i> L. | Soil | Enzymatic acitivity and phenillpropanoids | Rhizome and roots | Leonardite Humic Acid 4% fulvic acid | 95.5% & > Phenylpropanoids rates | Kołodziej et al. (2013) |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------|--|-------------------------|--|---|-------------------------|
| <i>Mentha piperita</i> L. | Leaf pulverization | Cineol, menthol, menthone, isomentone | leaves | 0.4 g L ⁻¹ Humic Acid | > Menthol essential oil rates from 48% to 57.5%, | El-Gohary et al. (2014) |
| <i>Allium sativum</i> L. | Fertirrigation | Total phenols, flavonoids, allicin | Whole plant | 20 kg ha ⁻¹ | > Total phenols and flavonoids > Antioxidant activity | Ghasemi et al. (2015) |
| <i>Mintha piperita</i> var. Citrata | Leaf pulverization | Essential Oil (Linalool, linalyl acetate, caryophyllene, b-fenchilíco) | Fresh leaf | 0.4 g L ⁻¹ Humic Acid | > Essential oil rates > 12.49% to 25.23% (1° cut) and 26.37% (2° cut) Linalool | Hendawy et al. (2015) |
| <i>Calendula officinalis</i> L. | Leaf spray | chlorophyll (A & B), carotenoids | Flower | Bovine ascorbic acid 100 ppm and humic acid in 100 ppm | > Fresh and dry weight of sprouts, roots and inflorescence by plant (g) > Chlorophyll (A & B), total carotenoids in leaves and flowers | Mohsen et al. (2016) |
| <i>Gerbera planta</i> cv. Malibu | Soil | Antioxidant acitity, malondialdehyde | Flowers | Humic Acid 500 mg | > Malondialdehyde rates > Superoxide dismutase activity | Haghighi et al. (2016) |
| <i>Anethum graveolens</i> L. | Leaf pulverization | Essential oil (carvone, dihydrocarvone, limonene, dill apiol e piperitone) | Anethum straws and seed | 400 ppm acid and 400 ppm humic dactic indol acid | > Oil rates in the straw (limolene and carvone) > Oil rates in the seeds | Said-Al et al. (2016) |

2.1 The Influence of Humic Substances on the Ontogeny, Primary and Secondary Metabolism

Studies evaluating the application of humic substances in medicinal plants *in vivo* (Table 1) demonstrate that those substances can contribute to the increase of the biosynthesis of secondary metabolites and to the activity of bioactive substances from different classes, such as flavonoids, coumarins, phenylpropanoids, total phenols and anthocyanins (Ahmed et al., 2011; Khazaie et al., 2011; Aminifard et al., 2012; El-Gohary et al., 2014; Ghasemi et al., 2015; Hendawy et al., 2015; Said-Al et al., 2016).

There are different ways of applying humic substances: via soil, spray or fertigation (Kołodziej et al., 2013; Hendawy et al., 2015; Ghasemi et al., 2015). Nevertheless, those substances significantly increased the biosynthesis of the metabolism of medicinal plants and production of metabolites with biological and pharmacological properties independent of the way they were applied on the plants (Andrade et al., 2001; Khazaie et al., 2011; Kołodziej et al., 2013).

Humic acid can also be applied via homeopathy techniques promoting a 55.10% increase in coumarin content in *Justicia pectoralis Jacq.* (Andrade et al., 2001) when dynamized as well as demonstrated great variability in the electromagnetic field of these plants.

Although the application procedure does not show difference on the performance and biosynthesis of metabolites on medicinal species, humic substances applied via soil act as soil conditioners. They interact with great number of functional groups which allows wide espectro of reactivity with other molecules (Drosos et al., 2017), hydrophilicity forming hydrogen bonds with water and the structural malleability wich is the capacity of intermolecular association and changes on pH and redox values (Caron et al., 2015; Fischer, 2017).

These changes in the physical, chemical and microbiological structure of the soil have the purpose of greater water retention, aeration, directly influencing root growth, nutrient absorption, primary and secondary metabolic pathways (Canellas & Olivares, 2014; Canellas et al., 2015; Olivares et al., 2017; Ozfidan-Konakci et al., 2018), hormone signaling and, consequently, higher yield of the medicinal plants.

In this context, the application of humic and fulvic acid *in vivo* increased growth, development and organogenesis of the plants in the field, influencing on the differentiation of the vegetative tissues in the production of flowers (Costa et al., 2008).

Higher content and concentration of active ingredients of the essential oils of *Hyssopus officinalis L.*, *Mentha piperita L.*, *Mintha piperita var. Citrate*, *Anethum graveolens L.* was also observed, showing a positive correlation between the increase of dry or fresh biomass with the essential oil content (Hendawy et al., 2015; El-Gohary et al., 2014).

Anthocyanins and phenolic compounds (monoterpene, terpene, phenylpropanoids, flavonoids) are the main classes of secondary metabolites influenced by the application of humic substances found in the literature (Haghighi et al., 2016; Said-Al et al., 2016). In fruits of *Capsicum annum var. Red chili* humic acid increased the concentration of flavonoids, capsaicin, carotenoids (lycopene and B-carotene) and antioxidant activity (Aminifard et al., 2012).

Humic substances improves the root system development, which contributes to higher nutrient uptake efficiency, leading to changes on the root exudation profile (Canellas & Olivares, 2014), lateral and adventitious roots formation. These responses involve mechanisms of cellular stimulation and differentiation that act as messenger inducing physiological effects, as well as influence on the production of chlorophyll A and B and carotenoid content (Ghasemi et al., 2015).

Therefore, the application of humic substances in the *in vivo* cultivation of medicinal plants opens up the opportunity for the development of organic fertilizers for agroecological systems, aiming at good quality raw material without pesticides with increased concentration of secondary metabolites biologically and pharmacologically interesting (Canellas et al., 2015; Halpern et al., 2015, Olivares et al., 2017).

3 Application of Plant Growth Promoting Microorganisms

It is estimated that living microorganisms, aggregate to organic matter and rhizosphere, occupy less than 5% of the total space of soil. What makes this environment a dynamic and living space, with a central role in processes of decomposition and cycling of nutrients available to the plants through the mineralization (Chavarria et al., 2018; Lehmann et al., 2018; Zheng et al., 2018).

The microorganisms applied on agroecological and organic systems have influence on the health and microbial activity of the soil (Chavarria et al., 2018). Soil community is diverse, constituted by fungi and bacterium that perform as promoters of plant growth (Leite et al., 2016; Silva et al., 2017; Trinh et al., 2018). Thus the

microorganisms of the rhizosphere shape efficient systems for absorption and catabolism of organic compounds existent in the exudate roots (Bakker et al., 2013; Ahemad & Kibret, 2014).

Plant growth promoting bacterium can influence directly or indirectly the general morphology of plants, as they have the ability to colonize tissues and different mechanisms of action (Pandya et al., 2013; Chagas et al., 2018). They can act on iron sequestration and phytoremediation (Karami & Shamsuddin, 2010), phosphorus solubilization, atmospheric nitrogen fixation (Santi et al., 2013; Ahemad & Kibret, 2014), hormone production, organic siderophore compounds (Bhattacharyya & Jha, 2012), systemic resistance to pathogens, tolerance to abiotic and biotic stress (Etesami & Maheshwari, 2018; Shameer & Prasad, 2018).

The main efficient microorganisms associated to rhizosphere capable of exerting a beneficial effect on plant growth and physiology are the *Azospirillum* spp., *Alcaligenes* spp., *Artrobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Serratia* spp., *Streptomyces* spp. and mycorrhizal fungi as the *Arbuscular mycorrhizal fungi* present in 80% of the roots (Bulgarelli et al., 2013; Gupta et al., 2018).

Bacterium of the genus *Azospirillum* spp., *Bacillus* spp. and *Enterobacter* spp. are effective for promoting better performance of plants acting on the regulation of physiological process (Bhattacharyya et al., 2012), stimulating the ability of producing and degrading plant growth regulators like gibberellins, auxins, cytokinins and ethylene phytohormones (Calvo et al., 2014).

The role of microorganisms applied to agriculture are diverse, for example, mycorrhizal arbuscular fungi have the ability to solubilize phosphorus (P) by secretion of phosphatases which degrade the P organic or the acids that dissolve inorganic compounds of P (Richardson et al., 2009; Yousefi et al., 2011). The free-living diazotrophic microorganisms (*Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Cyanobacterium*) can fix nitrogen from the atmosphere to the soil to be mineralized and made it available to the plants in the form of ammonia they can also synthesize phytohormones (Fukami et al., 2018).

Besides, microorganisms can act as elicitors and increase the production of secondary metabolites involved in the biological and pharmaceutical activity of medicinal plants (Mohammadi et al., 2017), such as flavonoids and terpenes content, phenolic compounds, microbial activity, chlorophyll content, nutrient uptake, plant growth and

development (Banchio et al., 2008; Cappellari et al., 2013; Zhao et al., 2016; Damam et al., 2016; Swamy et al., 2016).

Most of the studies regarding the use of microorganisms on medicinal plants aiming phytochemical and biochemical changes on secondary metabolites production were carried out *in vitro* (Rafiee et al., 2016; Du et al., 2013; Vafadar et al., 2014; Çetin et al., 2016). However, researches about the use of elicitors agents in the field are very important due to its great and innovative potential on the organic grown of medicinal plants, once uncontrolled edaphoclimatic factors may influence the colonization and the mechanisms of action of growth promoting microorganisms.

Thus, the use of efficient microorganisms as phytoremediators, bioprotectors and biofertilizers are potential tools for organic and agroecologic agriculture, improving plant physiology, intermediating the production of substances of the primary and secondary metabolism, which are related to yield, production of active ingredients and essential oil with good quality for therapeutic use.

4 Influence of Microorganisms on Phytochemical Composition

Microorganisms (fungi and bacterium) applied in the cultivation of medicinal plants *in vivo* (Table 2) had great influence on plant growth and development, photosynthetic rate, production of secondary metabolites, abiotic stress tolerance and increased synthesis of active compounds (Aseri et al., 2008; Shahmohammadi et al., 2014; Akhazari et al., 2015; Tahami et al., 2017).

Interactions between microorganisms and medicinal plants can lead to neutral, negative or positive effects on plants (Ahemad & Kibret, 2014). In this review, we verified the use of different genera of microorganisms such as *Bacillus* spp., *Azotobacter* spp. and *Azospirillum* spp., heterotrophic and nitrogen-fixing aerobic bacterium, being that *Azospirillum* genera (facultative endophytes) the most commonly applied on the plants (Mohammad et al., 2012; Shahmohammadi et al., 2014; Tahami et al., 2017).

Facultative endophytic bacterium have the ability to colonize the interior and surface of the roots as a function of the chemotaxis of rhizosphere exudates (Ahemad & Kibret, 2014). They can convert atmospheric N to ammonium, produce phytohormones such as cytokinins, gibberilins and auxins (El-Hadi et al., 2009), increase water and mineral absorption, tolerance to abiotic stresses (Shameer & Prasad, 2018; Fukami et al., 2018; Silva & Pires, 2017), and are able to colonize the endorizosphere and xylem vessels

(Fatma et al., 2008). Thus, there is a growing interest in inoculating microorganisms *in vivo* as they not only increase the productivity and phytochemical profile of medicinal plants but also reduce the use of chemical fertilizers (Adesemoye et al., 2009).

Table 2. Review of medicinal plants species elicited by efficient microorganisms

| Scientific Name | Application via | Evaluation | Farmacogenesis | Efficient Treatment | Results | Articles |
|---------------------------------|---------------------|--|----------------|---|--|-----------------------|
| <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. | Soil | Morphological features, essential oil and phenolic compounds | Fruits | <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> and <i>Bacillus megatherium</i> | > Plant height, n° of branches, fresh and dry weight and weight fresco and usefulness of fruits > Essential oil rates > Anetol rates > Absorption of N and P | Mahfouz et al. (2007) |
| <i>Majorana hortensis</i> L. | Soil and irrigation | Growth and essential oil | and Leaf | <i>Bacillus circulans</i> | *Azos. Brasiliense + Azot. Chroococcum + <i>B. polymyxa</i> and <i>B. circulans</i> > Plant-growth * Azotobacter misturado + <i>B. megatherium</i> > Essential oil rates 39-52% * Nitrogen vines + <i>Bacillus circulans</i> > γ -terpinene rates (16.83%), a-terpinene (13.11%), phellandrene (2.41%), a-mirrene (2.01%) | + Fatma et al. (2008) |

| | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------|---|-----------|--|--|---------------------|
| <i>Punica granatum</i> L. | Soil and seed inoculation | Microbial activity, chlorophyll and nutrients rates | Seedlings | <i>A. brasilense</i> and <i>G. mosseae</i> | > Leaf area and dry weight > Rate total de chlorophyll, accumulation and reduction of sugars > Total phenols and amino nitrogen > Dehydrogenase activity, alkaline phosphatase and nitrogenase > Microbial activity and nutrients rates | Aseri et al. (2008) |
| <i>Punica granatum</i> L. | Soil and seed inoculation | Microbial activity, chlorophyll and nutrients rates | Seedlings | <i>A. brasilense</i> and <i>G. mosseae</i> | > Leaf area and dry weight > Rates total de chlorophyll, accumulation and reduction of sugars > Total phenols and amino nitrogen > Dehydrogenase activity, alkaline phosphatase and nitrogenase > Microbial activity and nutrients rates | Aseri et al. (2008) |

| | | | | | | | |
|---|-------------------------------|---|-----------------|---|----------|--|----------------------------|
| <i>Mentha viridis</i> L. Japanese mint: <i>Mentha arvensis</i> L. Peppermint: <i>Mentha piperita</i> L. | Soil | Essential oil usefullness and chlorophyll | oil Dry leaves | <i>Azospirillum</i> <i>Azotobacter mixture</i> | + > | Height of <i>Menta piperita</i> biomass, dry weight, flower and root > Essential oil usefullness <i>Mentha arvensis</i> and <i>Menta piperita</i> L. > Microbial proliferation in the rizosphere of the Menta Piperita > Fungi rates—beneficial and harmful > Chlorophyll rates | El-Hadi et al. (2009) |
| <i>Pimpinella anisum</i> L. | Inoculation and fertilization | Seeds production and essential oil rates | Seeds | 10 ton/ha + inoculation of <i>Bacillus circulans</i> pulverization in the stretching stem stage | > | Seed production of 2973.2 kg/ha > Essential oil rates—104.3 kg/há | Mohammad et al. (2012) |
| <i>Matricaria chamomilla</i> L. | Soil | Essential oil usefullness | oil Dry flowers | <i>Azotobacter</i> <i>Azospirillum</i> | and > | Essential oil usefullness | Dastborhan et al. (2012) |
| <i>Carum copticum</i> L. | Spray base of the plant | Essential oil | Seed | <i>Nitrogen fixers bacterium</i> | > | Essential oil rates | Ghilavizadeh et al. (2013) |
| <i>Anethum graveolens</i> L. | Soil and leaf pulverization | Nuber of seeds and production | umbels Seed | Micorrhiza interadices and <i>Glomus mosseae</i> | gladus > | Production of umbel seeds > Absorption of water and nutrients | Hashemzadeh et al. (2013) |
| <i>Coriandrum sativum</i> L. | Spray base of the plant | Growth and seeds production | Seed | Nitrogen fixers bacterium | > | Umbel numbers, seed numbers | Akhani et al. (2012) |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|--|-------------------|--|--|-----------------------------|
| <i>Coriandrum sativum</i> L. | Inoculation | Essential oil rates and components | Seed | Biofertilizers (Inoculate seeds with azotobacter + Azospirillum) | > Essential oil usefulness > Rates of alpha-pinene | Darzi et al. (2013) |
| <i>Anethum graveolens</i> L. | Seed inoculation | Essential oil | Seeds | 10 ton of compound inoculation of seeds | + > Seed production > Essential oil usefulness | Shahmohammadi et al. (2014) |
| <i>Medicago polymorpha</i> L. | Seed inoculation | Nutrients and growth | rates Whole plant | Vermicomponent arbuscularmicorrhiza | + > Rates of N and K in vegetal tissues > Leaf area | Akhazari et al. (2015) |
| <i>Chamomilla recutita</i> L. Rausch. | Leaf pulverization | Growth, essential oil and flavonoids rates | Flower and fruit | - | Not statistically meaningful | Kwiatkowski (2015) |
| <i>Mentha arvensis</i> L. | Soil | Essential biomass of leaf and roots, nutrients | oil, Fresh leaf | <i>G. fascicula-tum oxido tolerans</i> + <i>E.</i> | > Fresh weight and the plant stem proportion of plants in saline or non saline conditions > Essential oil usefulness < Micorrhizae colonization (<i>H. desiderata</i>) > Micorrhizae colonization (species of Glomus) > Rates of P and N | Bharti et al. (2016) |
| <i>Mentha arvensis</i> L. | Soil | Essential biomass of leaf and roots, nutrients | oil, Fresh leaf | <i>G. fascicula-tum oxido tolerans</i> + <i>E.</i> | > Fresh weight and the plant stem proportion of plants in saline or non saline conditions | Bharti et al. (2016) |

| | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|---|-----------|--|-----|--|
| | | | | | | <ul style="list-style-type: none"> > Essential oil usefulness < Micorrhizae colonization (H. <i>desiderata</i>) > Micorrhizae colonization (species of <i>Glomus</i>) > Rates of P and N |
| <i>Ocimum basilicum</i> L. | Soil and seed inoculation | Growth, development and essential oil | Leaf | <i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> Bacterium s | and | <ul style="list-style-type: none"> > Leaf areaárea foliar, n° Tahami et al. (2017) > of branches and dry weight > Growth, usefulness and density of the roots > Essential oil usefulness |
| <i>Rauwolfia serpentine</i> | Soil and coal | Growth, alkaloid rates, microbial biomass | Dry roots | <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> and <i>Pseudomonas putida</i> | | <ul style="list-style-type: none"> > Growth Rai et al. (2017) > Usefulness and alkaloid rates > Absorption of nitrite, nitrate and phosphate > Usefulness of alkaloids |

The number of umbels and seeds increased with the application of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum lipoferum* in plants of *Coriandrum sativum* L. (Akhani et al., 2012), which has fungicidal, bactericidal and anthelmintic properties (Shahmohammadi et al., 2014). As for *Anethum graveolens* (L.) seed production increased as well as the yield of essential oil. This may be related to the better development of the ontogenic phase of the species, as well as a higher uptake of nitrite, nitrate and phosphate (Cappellari et al., 2013), influencing on growth, increased leaf area, higher photosynthetic rates that may contribute to yield, essential oil production and increased concentration of active principles (Damam et al., 2016; Rai et al., 2017).

Several studies point out the importance and interest of applying *Azotobacter* spp. and *Azospirillum* spp. *in vivo* in order to improve the physiology and phytochemistry of medicinal plants. They can increase yield and content of active constituents of the essential oil in various medicinal species like *Foeniculum vulgare* Mill. (Mahfouz et al., 2007).

Rauwolfia serpentina had better performance and anetol rates; higher alkaloids rates were found in *Carum copticum*. Rai et al. (2017); alpha-pinene content increased in *Coriandrum sativum* L. (Ghilavizadeh et al., 2013); on the cultivation of, had increased the alpha-pinene rates (Akhani et al., 2012); greater content of the essential oil of the *Matricaria chamomilla* L. (Dastborhan et al., 2012). When the *Bacillus* spp. is applied in the production, it's verified the increase on the radicular system and better usefulness of the essential oil (Tahami et al., 2017).

In addition to the rhizobacterium applied as elicitors, arbuscular mycorrhizal fungi (AM) can help to improve the physical, chemical and structural properties of the soil. By increasing the availability of phosphorus through its specialized hyphae, the organic matter content and reduction of the apparent soil density (Yousefi et al., 2011; Akhazari et al., 2015), water retention by stimulating the plant's root system to exploit greater soil volume and to assist in the accumulation of secondary metabolites (Swamy et al., 2016).

Among the species evaluated by Bharti et al. (2016) and Hashemzadeh et al. (2013) the AM fungi *Gladus* spp. and *Glomus* spp. can interfere in the physiological development, increasing the total content of chlorophyll, the accumulation of higher levels of nutrients, total phenols and amino nitrogen by increasing the activities of dehydrogenase, alkaline phosphatase and nitrogenase that causes alteration in the mineralization of nutrients present in organic matter (Aseri et al., 2008).

Studies have shown that application of fungi (AM) in the production of *Mentha arvensis* L. in saline and non-saline conditions may induce tolerance and/or resistance to abiotic stress like water and salt stress (Bharti et al., 2016). Therefore, agronomic characteristics can be improved, such as biomass, height, stem and leaf ratio, higher nitrogen and phosphorus absorption due to the increase of mycorrhizal colonization.

On the other hand, species of fungi (AM) under abiotic stress conditions such as *Halomonas* spp. reduced rhizosphere colonization and yield in essential oil content (Bharti et al., 2016). Similar results were found with the application of photosynthetic bacterium, actinobacterium, lactic acid bacterium, fermentation fungi and yeast in the cultivation of *Chamomilla recutita* L. Rausch. The authors did not find significant differences for essential oil yield and flavonoid content (Kwiatkowski et al., 2015).

Thus, the application of fungi and bacterium as elicitors in the *in vivo* cultivation of medicinal plants is an important tool in organic and agroecological production, which contributes to the production of raw material with quality and pharmacological interest.

They can also improve the performance and optimization of the use of nutrients, opposing the application of chemicals in the production of medicinal plants, conferring quality production with respect to the man and to the environment (Adesemoye et al., 2009; Olivares et al., 2017).

5 Conclusion

Based on the reviewed studies, the use of eliciting agents in the cultivation of medicinal plants through the application of humic substances (fulvic and humic acid), efficient microorganisms *in vivo*, it opens opportunities for the development of organic fertilizers and biofertilizers that can be applied in organic and agroecological cultivation for a sustainable agriculture. The use of humic substances and microorganisms improved the physicochemical characteristics of the soil, increased availability of nutrients for medicinal species, contributed to growth and development through the production of phytohormones, induction of the root system, release of exudates, influence on phytochemistry, primary and secondary metabolism by increasing the production of active principles and essential oil for therapeutic, biological and pharmacological use in the treatment of numerous diseases. The use of these elicitor agents in the field, focusing on medicinal species, is a scientific and social potential in improving the yield and quality of the production of medicinal plants without contamination by pesticides and chemical

fertilizers that, besides the social and environmental benefits, potentiate the production of metabolites plants.

References

- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., & Kloepper, J. W. (2009). Plant growth-promoting rhizobacterium allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, *58*, 921-929. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9531-y>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacterium :Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, *26*, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmed, Y. M., Shalaby, E. A., & Shanan, N. T. (2013). The use of organic and inorganic cultures in improving vegetative growth, yield characters and antioxidant activity of roselle plants (*Hibiscus sabdariffa* L.). *African Journal of Biotechnology*, *10*, 1988-1996. <https://doi.org/10.5897/AJB10.876>
- Akahami, A., Darzi, M. T., & Hadi, M. H. S. (2012). Effects of Biofertilizer and Plant Density on Yield Components and Seed Yield of Coriander (*Coriandrum sativum*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, *4*, 1205-1211.
- Akhzari, D., Attaeian, B., Arami, A., Mahmoodi, F., & Aslani, F. (2015). Effects of Vermicompost and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Soil Properties and Growth of *Medicago polymorpha* L. *Compost Science and Utilization*, *23*, 142-53. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2015.1013585>
- Aminifard, M. H., Aroiee, H., Azizi, M., Nemati, H., & Jaafar, H. Z. E. (2012). Effect of humic acid on antioxidant activities and fruit quality of hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, *18*, 360-369. <https://doi.org/10.1080/10496475.2012.713905>
- Andrade, F. M. C. (2001). Effect of homeopathy on growth and yield of coumarin in “chambá” (*Justicia pectoralis* Jacq.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *4*, 19-28.
- Andrade, F. M. C. E. C., & Casali, V. W. D. C. (2011). Homeopathy, agroecology and sustainability. *Revista Brasileira de Agroecologia*, *6*, 49-56.
- Aseri, G. K., Neelam, J., Jitendra, P., Rao, A. V., & Meghwal, R. (2008). Biofertilizers Improve Plant Growth, Fruit Yield, Nutrition, Metabolism and Rhizosphere Enzyme Activities of Pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Scientia Horticulturae*, *117*, 130-35. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.03.014>

- Asli, S., & Neumann, P. M. (2010). Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant and Soil*, 336, 313-322. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0483-2>
- Ateia, M., Ran, J., Fujii, M., & Yoshimura, C. (2017). The relationship between molecular composition and fluorescence properties of humic substances. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, 867-880. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1214-x>
- Bakker, P. A. H. M., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C. A., & Pieterse, C. M. J. (2013). The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 4, 165. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165>
- Baldotto, M. A., & Baldotto, L. E. B. (2014). Humic acids. *Rev. Ceres*, 61, 856-881. <https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000011>
- Baldotto, M. A., & Baldotto, L. E. B. (2015). Organic carbon stocks and fractions and soil fertility under forest, agriculture and livestock. *Revista Ceres*, 62, 301-309. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562030010>
- Balsan, R. (2006). Decurrent impacts of the agricultura modernization in Brazil, Campo-Território. *Revista de Geografia Agrária*, 1, 123-151.
- Banchio, E., Bogino, P. C., Zygadlo, J., & Giordano, W. (2008). Plant growth promoting rhizobacterium improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 766-771. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2008.08.006>
- Bharti, N., Baghel, S., Barnawal, D., Yadav, A., & Kalra, A. (2013). The greater effectiveness of *Glomusmosseae* and *Glomus* intraradices in improving productivity, oil content and tolerance of salt-stressed menthol mint (*Mentha arvensis*). *Sci. of Food & Agri.*, 93, 2154-2161. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6021>
- Bharti, N., Barnawal, D., Shukla, S., Tewari, S. K., Katiyar, R. S., & Kalra, A. (2016). Integrated application of Exiguobacterium oxidotolerans, *Glomus fasciculatum*, and vermicompost improves growth, yield and quality of *Mentha arvensis* in salt-stressed soils. *Industrial Crops and Products*, 83, 717-728. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.021>
- Bhattacharyya, P., & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR): Emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 28, 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- BRASIL. (2011). *Brazilian homeopathic pharmacopoeia* (3rd ed.). Anvisa.

- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterium I microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 807-838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Calixto, B. C. J., & Siqueira, J. M. S. (2008). Drug Development in Brazil: Challenges. *Gazeta Médica da Bahia*, *78*, 98-106.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, *383*, 3-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Canellas, L. P. (2008). Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. *Soil Science*, *173*, 624-637. <https://doi.org/10.1097/SS.0b013e3181847ebf>
- Canellas, L. P., & Olivares, F. L. (2014). Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *1*, 1. <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, *196*, 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- Cappellari, L. R., Santoro, M. V., Nievas, F., Giordano, W., & Banchio, E. (2013). Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacterium. *Applied Soil Ecology*, *70*, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.04.001>
- Caron, V., Pereira, J., & Camargo, P. (2015). Soil Conditioners: Humic And Fulvic Acids. *Produtor Rural*, *58*, 46.
- Çetin, E. S., & Baydar, N. G. (2016). Elicitor applications to cell suspension culture for production of phenolic compounds in grapevine. *Tarim Bilimleri Dergisi*, *22*, 42-53. https://doi.org/10.1501/Tarimbil_0000001366
- Chagas, F. O., Pessotti, R. D. C., Caraballo-Rodríguez, A. M., & Pupo, M. T. (2018). Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chemical Society Reviews*, *47*, 1652-1704. <https://doi.org/10.1039/C7CS00343A>
- Chavarria, D. N. (2018). Response of soil microbial communities to agroecological versus conventional systems of extensive agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *264*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.05.008>
- Costa, T., & Jorge, N. (2011). Chemical composition of nuts and edible seeds and their relation to nutrition and health Bioactive Compounds Present in Nuts and Walnuts. *Ciência Biológica e Da Saúde*, *13*, 195-203.

- Costa, V. C. O. (2008). Chemical composition and modulation of bacterium 1 drug resistance of the essential oil from the leaves of *Rollinia leptopetala* R.E. Fries. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 245-248. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200019>
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23, 371-393. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>
- Czelusniak, K. E., Brocco, A., Pereira, D. F., & Freitas, G. B. L. (2012). Morpho-anatomy, phytochemistry and pharmacology of *Mikania glomerata* Sprengel: A brief literature review *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 14, 400-409. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200022>
- Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B., & Kausar, R. (2016). Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterium 1 strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 37, 130-136.
- Darzi, M. T. A. A., & Hadi, M. H. S. (2012). Influence of organic manure and bacterium of *bacillus circulans* on yield and essential oil concentration in anise (*Pimpinella anisum*). *Internacional Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4, 64-69. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.949>
- Darzi, M. T., Shirkhodaei, M., & Hadi, M. H. S. (2013). Effects of Vermicomost and *Azotobacter* and *Azospirillum* bacterium on quantity and quality of essential oil of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2, 1277-1283. <https://doi.org/2013-2-S/1277-1283>
- Dastborhan, S., Zehtab-Salmasi, S., Nasrollahzadeh, S., & Tavassoli, A. R. (2012). Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium and Nitrogen Fertilizer on Yield and Essential Oil of German Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Acta Horticulturae*, 964, 121-28. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.964.15>
- Döbereiner, J. (1991). The Genus *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In A. Balows, H. G. Tripper, M. Dworkin, W. Harder, & K.-H. Schleider (Eds.), *The prokaryotes* (2nd ed., pp. 2236-2253). New York: Springer-Verlag.
- Dojima, T., & Craker, L. E. (2016). Potential benefits of soil microorganisms on medicinal and aromatic plants. *ACS Symposium Series*, 12, 18. <https://doi.org/10.1021/bk-2016-1218.ch006>

- Drosos, M., Nebbioso, A., Mazzei, P., Vinci, G., Spaccini, R., & Piccolo, A. (2017). A molecular zoom into soil Humeome by a direct sequential chemical fractionation of soil. *Science of the Total Environment*, 586, 807-816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.059>
- Du. (2013). Effects of microbial elicitor on production of hypocrellin by *Shiraia bambusicola*. *Folia Microbiologica*, 58, 283-289. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0203-9>
- Ebeling, A. G., Helena, L., Pereira, M. G., Flavia, E., Pinheiro, M., & Valladares, G. S. (2011). Humic substances and relationship to soil attributes. *Bragantia*, 70, 157-165. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052011000100022>
- El-Gohary, A. E., El-Sherbeny, S. E., Ghazal, G. M. E. M., Khalid, K. A., & Hussein, M. S. (2014). Evaluation of Essential Oil and Monoterpenes of Peppermint (*Mentha piperita* L.) under Humic Acid with Foliar Nutrition. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5, 1885-1890.
- Etesami, H., & Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacterium (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Fatma, A. G., Lobna, A. M., & Osman, N. M. (2008). The effects of compost and biofertilizers on the growth, yield and essential Oil of sweet marjoram (*Majorana hortensis*) plant. *Int. J. Agric. Biol.*, 10, 381-387.
- Fishcer, T. (2017). Humic supramolecular structures have polar surfaces and unpolar cores in native soil. *Chemosphere*, 183, 437-443. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.125>
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). Azospirillum: Benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8, 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
- Gharib, F. A., Moussa, L. A., & Massoud, O. N. (2008). Effect of compost and biofertilizers on growth, yield and n essential oil of sweet marjoram (*Majorana hortensis*) plant. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 381-387.
- Ghasemi, K. (2015). Antioxidant properties of garlic as affected by selenium and humic acid treatments. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 43, 173-181. <https://doi.org/10.1080/01140671.2014.991743>

- Ghilavizadeh, A., Darzi, M. T., Haj, M., & Hadi, S. (2013). Effects of Biofertilizer and Plant Density on Essential Oil Content and Yield Traits of Ajowan (*Carum copticum*). *Middle-East J. Sci. Res.*, *14*, 1508-1512. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.14.11.2364>
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Medicinal Plants: Factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quimica Nova*, *30*, 374-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Gupta, S., Kaushal, R., & Sood, G. (2018). Impact of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium on Vegetable Crop Production. *International Journal of Vegetable Science*, *24*, 289-300. <https://doi.org/10.1080/19315260.2017.1407984>
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. *Advances in Agronomy*, *130*, 141-174. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001>
- Hashemzadeh, F., Mirshekari, B., Khoei, F. R., Yarnia, M., & Tarinajad, A. (2013). Effect of bio and chemical fertilizers on seed yield and its components of dill (*Anethum graveolens*). *Journal of Medicinal Plants Research*, *7*, 111-117. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.363>
- Hendawy, S. F., Hussein, M. S., El-Gohary, A. E., & Ibrahim, M. E. (2015). Effect of Foliar Organic Fertilization on the Growth, Yield and Oil Content of *Mentha Piperita* Var. *Citrata*. *Asian Journal of Agricultural Research*, *9*, 237-248. <https://doi.org/10.3923/ajar.2015.237.248>
- Karami, A., & Shamsuddin, Z. H. (2013). Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. *African Journal of Biotechnology*, *9*, 3689-3698.
- Kawahigashi, M., Sumida, H., & Yamamoto, K. (2005). Size and shape of soil humic acids estimated by viscosity and molecular weight. *Journal of Colloid and Interface Science*, *284*, 463-469. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.023>
- Khazaie, H. R., Rezaie, E. E., & Bannayan, M. (2011). Application times and concentration of humic acid impact on aboveground biomass and oil production of hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*, 5148-5154.
- Kołodziej, B., Sugier, D., & Bielińska, E. (2013). The effect of leonardite application and various plantation modalities on yielding and quality of roseroot (*Rhodiola rosea* L.) and soil enzymatic activity. *Journal of Geochemical Exploration*, *129*, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.014>

- Kwiatkowska-Malina, J. (2018). Functions of organic matter in polluted soils: The effect of organic amendments on phytoavailability of heavy metals. *Applied Soil Ecology*, *123*, 542-545. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.021>
- Kwiatkowski, C. A. (2015). Yield and Quality of Chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.) Raw Material Depending on Selected Foliar Sprays and Plant Spacing. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, *14*, 143-156.
- Lazzari, F. M., & Souza, A. S. (2017). *Green Revolution: Impacts on Traditional Knowledge* (pp. 1-16). 4º Congresso Internacional de Direito e Contemporaneidade.
- Lee, Y. P., Fujii, M., Kikuchi, T., Terao, K., & Yoshimura, C. (2017). Variation of iron redox kinetics and its relation with molecular composition of standard humic substances at circumneutral pH. *PLoS ONE*, *12*, 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176484>
- Lehmann, K. (2018). Selective transport and retention of organic matter and bacterium shapes initial pedogenesis in artificial soil—A two-layer column study. *Geoderma*, *325*, 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.03.016>
- Leite, P. A. K. (2016). Selection of rhizobacterium as growth promoters in watermelon. *Scientia Plena*, *12*, 4.
- Licá, I. C. L., Soares, A. M. D. S., de Mesquita, L. S. S., & Malik, S. (2018). Biological properties and pharmacological potential of plant exudates. *Food Research International*, *105*, 1039-1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.051>
- Luciano, P. C., & Fabio, L. O. (2017). Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. *Plant and Soil*, *417*, 403-413. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3267-0>
- Mahfouz, S. A., & Shamf-Eldin, M. A. (2007). Effect of Mineral vs. Biofertilizer on Growth, Yield, and Essential Oil Content of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *International Agrophysics*, *21*, 361-66. <https://doi.org/10.1055/s-2007-987419>
- Matos, A. K. V. de. (2010). Green Revolution, Biotechnology and Alternative Technologies. *Cadernos da FUCAMP*, *10*, 01-17.
- Matos, P. F., & Pessoa, V. L. S. (2011). The Modernization of Agriculture in Brazil and the New Uses of the Territory. *Geo UERJ*, *2*, 290-322. <https://doi.org/10.12957/geouerj.2011.2456>
- Miranda, H. (2008.) The environmental issue at the origin of the Brazilian agrarian problem and the case of the South region 1. *Economia*, *2*, 103-132.
- Mohammad, T. D. (2012). Effects of the application of organic manure and biofertilizer on the fruit yield and yield components in Dill (*Anethum graveolens*). *Journal of*

- Medicinal Plants Research*, 6, 17. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.204>
- Mohammadi, H. (2017). Effects of beneficial root pseudomonas on morphological, physiological, and phytochemical characteristics of *Satureja hortensis* (Lamiaceae) under water stress. *Revista Brasileira de Botanica*, 40, 41-48. <https://doi.org/10.1007/s40415-016-0319-2>
- Muscolo, A., Sidari, M., & Nardi, S. (2013). Humic substance: Relationship between structure and activity. deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.012>
- Nadia, E. H., El-Ala, H. K. A., El-Azim, W. M. A. (2009). Response of some Mentha species to plant growth promoting bacterium (PGPB) isolated from soil rhizosphere. *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*, 3(4), 4437-4448.
- Nardi, S., Ertani, A., & Francioso, O. (2017). Soil-root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180, 5-13. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>
- Nebbioso, A., & Piccolo, A. (2012). Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*, 720, 77-90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.027>
- Olivares, F. L. (2017). Plant growth promoting bacterium and humic substances: Crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4, 1. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>
- Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Bahtiyar, M., & Kucukoduk, M. (2018). The humic acid-induced changes in the water status, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense systems of wheat leaves with cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 155, 66-7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.071>
- Panya, M., Naresh Kumar, G., & Rajkumar, S. (2013). Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of vigna radiata root nodules. *FEMS Microbiology Letters*, 348, 58-65. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12245>
- Pereira, L. A., & Raimunda, A. D. S. (2016). The intensive use of pesticides—The new face of the agrarian question. *Okara: Geografia em Debate*, 10, 185-194.
- Perira, R. J., & Cardoso, M. D. G. (2012). Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3, 46-152.
- Rafiee, H. (2016). Application of plant biostimulants o new approach to improve the biological responses of medicinal plants - A critical review. *Journal of Medicinal Plants*, 15, 6-39.

- Rai, A., Sanjeev, K., Kuldeep, B., Nandita, S., & Rana, P. S. (2017). Improvement in growth and alkaloid content of *Rauwolfia serpentina* on application of organic matrix entrapped biofertilizers (*Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas putida*). *Journal of Plant Nutrition*, *41*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1222419>
- Ramachandra, R. A O., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, *20*, 101-153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)
- Richardson, A. E., Barea, J.-M., Mcneill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, *321*, 305-339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Said-Al Ahl, H., Gendy, A. G., & El, E. A. O. (2016). Humic acid and indole acetic acid affect yield and essential oil of dill grown under two different locations in Egypt. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *8*, 146-157.
- Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, *111*, 743-767. <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>
- Santos, D. Y. A. C. (2015). *Applied Botany: Secondary metabolites in plant-environment interaction*.
- Shahabivand, S., Padash, A., Aghaee, A., Nasiri, Y., & Rezaei, P. F. (2018). Plant biostimulants (*Funneliformis mosseae* and humic substances) rather than chemical fertilizer improved biochemical responses in peppermint. *Iranian Journal of Plant Physiology*, *8*(2), 2333-2344. <https://doi.org/10.22034/ijpp.2018.539109>
- Shahmohammadi, F., & Darzi, M. T. (2014). Influence of Compost and Biofertilizer on Yield and Essential Oil of Dill (*Anethum graveolens* L.). *Int J Adv Biol Biom Res*, *2*, 446-55.
- Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacterium for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, *84*(3), 603-615. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>
- Silva Lima, L., Olivares, F. L., Rodrigues de Oliveira, R., Vega, M. R. G., Aguiar, N. O., & Canellas, L. P. (2014). Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *1*, 23. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0023-z>

- Silva, S. R., & Pires, J. L. F. (2017). Response of 'BRS Guamirim' wheat to the application of *Azospirillum*, nitrogen and growth-promoting substances. *Revista CiÊncia Agronômica*, 48, 4. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170073>
- Swamy, M. K., Sayeed Akhtar, M., & Sinniah, U. R. (2016). Response of PGPR and AM fungi toward growth and secondary metabolite production in medicinal and aromatic plants. *Plant, Soil and Microbes*, 2, 145-168. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29573-2_7
- Tahami, M. K., Jahan, M., Khalilzadeh, H., & Mehdizadeh, M. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacterium in an Ecological Cropping System: A Study on Basil (*Ocimum basilicum* L.) Essential Oil Production. *Industrial Crops and Products*, 107, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.020>
- Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaro, A., Quaggiotti, S., & Nardi, S. (2011). Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.04.017>
- Trinh, C. S., Jeong, C. Y., Lee, W. J., Truong, H. A., Chung, N., Han, J., ... Lee, H. (2018). Paenibacillus pabuli strain P7S promotes plant growth and induces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.001>
- Vaccaro, S., Ertani, A., Nebbioso, A., Muscolo, A., Quaggiotti, S., Piccolo, A., & Nardi, S. (2015). Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2, 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-015-0033-5>
- Vafadar, F., Amooaghaie, R., & Otroshy, M. (2014). Effects of plant-growth-promoting rhizobacterium and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Plant Interactions*, 9, 128-136. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.779035>
- Yousefi, A. A., Khavazi, K., Moezi, A. A., Rejali, F., & Nadian, H. A. (2011). Phosphate solubilizing bacterium and arbuscular mycorrhizal fungi impacts on inorganic phosphorus fractions and wheat growth. *World Applied Sciences Journal*, 9, 1310-1318.
- Zhalnina, K. (2018). Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature Microbiology*, 1, 11. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3>

Zhao, Q., Wu, Y. N., Fan, Q., Han, Q. Q., Paré, P. W., Xu, R., ... Zhang, J. L. (2016). Improved Growth and Metabolite Accumulation in *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. by Inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* GB03. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*, 8103-8108. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03390>

Zheng, W., Zhao, Z., Gong, Q., Zhai, B., & Li, Z. (2018). Responses of fungal-bacterium community and network to organic inputs vary among different spatial habitats in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *125*, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.06.029>

Artigo 3

Quantificação e caracterização física, química, fitohormonal e microbiológica de vermicompostagem

(Artigo estruturado nas normas da Journal of Environmental Management)

Resumo: Os resíduos orgânicos se reaproveitados corretamente são potenciais matérias primas para a formulação de composto, vermicomposto e biofertilizantes a serem aplicados no cultivo de espécies vegetais. A vermicompostagem é considerada uma das alternativas mais viáveis e econômicas para a transformação de resíduos orgânicos em fertilizantes orgânicos, que além de ser um material de alta qualidade nutricional, fitohormonal e microbiológica, é considerado uma ferramenta tecnológica social utilizada por agricultores para a produção de alimentos. Neste sentido, objetivou-se identificar, quantificar e analisar as características físicas, químicas, fitohormonal, teor de aminoácidos e comunidade microbiana de três formulações de vermicompostagem, com e sem inoculação de microrganismos eficientes, e comparar a influência dos vermicompostos na produção de biomassa seca e teor de óleo essencial de *Origanum vulgare* L. Verifica-se que o processo de vermicompostagem potencializa os teores de macro e micronutrientes, fitohormônios, aminoácidos, substâncias húmicas e atividade microbiana, independente da formulação. Concluindo que todas as formulações de vermicomposto se enquadram as exigências mínimas estipuladas pela legislação brasileira para o registro de fertilizante orgânico composto classe A, sendo que a inoculação de microrganismos eficientes potencializa a comunidade microbiana do vermicomposto, bem como, o vermicomposto com inoculação de microrganismo eficiente da mata nativa pode ser aplicado em substituição ao fertilizante químico na produção de biomassa seca e teor de óleo essencial de *Origanum vulgare* L. Por fim, a vermicompostagem e inoculação de microrganismos eficientes é uma ferramenta estratégica para a autonomia produtiva de agricultores familiares e tradicionais.

Palavras-chave: Tecnologia social; Resíduos sólidos; Microrganismos eficientes; Fitohormônios; Substâncias húmicas

1 Introdução

No mundo, uma grande quantidade de resíduos orgânicos biodegradáveis são gerados todos os dias (Lv et al., 2019), os resíduos orgânicos e alimentares são os maiores componentes dos resíduos sólidos urbanos, sendo que no Brasil cer e com a deposição indevida, esses resíduos podem facilitar o desenvolvimento de vetores de doenças e algumas pragas urbanas (Suthar, 2009). Os resíduos agropecuários também são grandes passivos ambientais, e quando dispostos inadequadamente e de forma desordenada na natureza, geram contaminantes, como metais tóxicos, emissão de gases tóxicos e contaminação das reservas hídricas (Jiang et al., 2016).

De acordo com o Plano Nacional de Resíduos Sólidos (Lei 12.305/2010), no Brasil são produzidas, diariamente, cerca de 250 mil toneladas de resíduos, sendo sua composição: de 52% de resíduo orgânico, 26% de papel e papelão, 3% de metais (ferro, alumínio, aço, etc), 2% vidro e 17% de outros (Brasil, 2011). No entanto, os resíduos orgânicos, se reaproveitados corretamente, são potenciais matérias primas para a formulação de composto, vermicomposto e biofertilizantes a serem aplicados no cultivo de espécies vegetais (Pereira et al., 2021).

Sendo assim, como alternativa social, ecologicamente correta e econômica, a vermicompostagem pode ser utilizada para tratamento desses resíduos através da bio-oxidação do material orgânico, com baixo custo, aliado a isso, a aplicação de húmus (matéria orgânica bio-oxidada) no solo, pode reduzir e/ou substituir a dependência de fertilizantes químicos sintéticos, fornecer nutrientes, melhorar a estrutura do solo mantendo ou elevando a fertilidade (Awasthi et al., 2018; Aynehband et al., 2017; Song e Lee, 2010), além de ser uma importante ferramenta e tecnologia social utilizada por agricultores familiares para a produção de alimentos (Pereira et a., 2021).

A vermicompostagem é um processo de oxidação biológica não termofílica em que o material orgânico é convertido em vermicomposto, que é um material semelhante a turfa, exibindo alta porosidade, aeração, drenagem, capacidade de retenção de água e ricas atividades microbianas (Edwards 1998 ; Atiyeh et al. 2000 b; Arancon et al. 2004 a), por meio das interações entre minhocas e microrganismos associados ao trato digestivo e na massa a ser decomposta.

Além da vermicompostagem acelerar a estabilização da matéria orgânica, a presença de minhocas pode modificar a comunidade bacteriana devido ao aumento do índice de diversidade e inibição do crescimento de bactérias patogênicas, atuar na

produção e liberação de fitohormônios que impactam no metabolismo das plantas (Egamberdieva et al., 2017), ou na supressão de patógenos de resíduos orgânicos (Lv et al., 2019) e fitopatógenos de solo (Sulaiman et al., 2020).

Vários trabalhos mostram que a presença de microrganismos eficientes aliada à vermicompostagem pode reduzir o tempo de decomposição (Kumar et al., 2010), proporcionar o aumento de nutrientes, como nitrogênio total e fósforo (Singh e Sharma, 2002), elevar o teor de substâncias húmicas e carbono que auxiliam na estruturação microbiana do solo (Maji et al., 2017; Pathma e Sakthivel, 2013).

Essas atividades complexas de degradação da matéria orgânica e dinâmica de nutrientes dependem de muitos grupos de microrganismos como bactérias oxidantes e nitrificantes de amônia (Kowalchuk et al., 1999); microrganismos celulolíticos e lignocelulolíticos que estão relacionados à degradação de compostos vegetais (López-González et al., 2015); microrganismos solubilizadores de fosfato (Wei et al., 2018), dentre outros.

Por fim, a aplicação em campo de vermicompostagem como fertilizante orgânico ou condicionador de solo no cultivo de espécies medicinais, demonstram que este fertilizante orgânico, pode ser um substituto para o fertilizante químico sintético no cultivo sustentável de plantas medicinais, bem como, influencia na produção, teor e qualidade do óleo essencial, aumento de constituintes químicos, elevação do teor de macro e micronutrientes pelas culturas, como, no metabolismo vegetal (Esmailpour et al., 2017; Ganjali et al., 2017; Heidarpour et al., 2019; Hossaini et al., 2016).

Neste sentido, objetivou-se identificar, quantificar e analisar as características física, química, fitohormonal, teor de aminoácidos e comunidade microbiana de três formulações de vermicompostagem, com e sem inoculação de microrganismos eficientes, e comparar a influência dos vermicompostos na produção de biomassa seca e teor de óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

2 Material e Métodos

2.1 Preparo e ativação dos inóculos: Ambiental e comercial

Foi utilizado aproximadamente 700g de arroz sem sal preparados em água destilada. Após o cozimento, foi colocado em bandejas de plástico com perfurações no fundo a fim de evitar o acúmulo de água, e coberto com tela fina visando proteger o conteúdo de predadores ou ação de intempéries, como vento e chuva. O recipiente foi colocado em mata nativa dentro das dependências da Universidade Federal de lavras,

segundo os pontos (Figura 1), e a serapilheira que cobre o solo foi colocada sobre a bandeja, de modo a aproveitar a microbiota natural do ambiente. As bandejas foram distribuídas na mata em um raio de 20 metros, durante a primeira quinzena de agosto/2018 durante 15 dias.

Após esse período, os microrganismos presentes no arroz de coloração rosada, azulada, amarelada e alaranjada, seguiram para o processo de ativação, no qual foram colocados em um recipiente de 20 litros, seguido de homogeneização com 1 litro de caldo de cana-de-açúcar e água destilada até completar o volume total de 20 litros. Por um período de 20 dias, o recipiente foi armazenado fechado em local fresco e arejado, até apresentar coloração alaranjada com cheiro doce agradável. O preparo do inóculo ambiental foi realizado de acordo com o Caderno dos Microrganismos Eficientes (COUTINHO, 2011).

Figure 1. Localização dos pontos de coleta para obtenção do inóculo ambiental realizado na UFLA. Créditos: **Batista, J. R.**



Fonte: Da pesquisa elaborada por Batista, J. R.

O inóculo comercial foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Consistiu em uma solução obtida através da diluição do inóculo concentrado em água e melão de cana nas seguintes proporções: 10% de melão, 80% de água e 10% do inóculo comercial concentrado. Foi colocado parte da água no galão de 20 litros, adicionou-se o melão e depois de homogeneizado adicionado o inóculo concentrado, seguido da água para completar o volume. O galão com o inóculo foi acondicionado em local protegido do sol durante o período de uma semana.

Ambos inóculos, comercial e ambiental, foram inoculados durante o processo de montagem do experimento, no tempo 0, de maneira homogênea com a matéria prima nas células correspondentes. Foram adicionados 5 litros do respectivo inóculo com 15 litros de água, totalizando 20 litros em cada célula.

2.2 Formulação de vermicomposto

O vermicomposto foi produzido no Setor de Biodiesel da UFLA em duas etapas: compostagem para estabilização do material seguido de vermicompostagem. O processo de compostagem foi aplicado aos resíduos orgânicos do restaurante universitário e resíduos vegetais do paisagismo do campus, sem tratamento prévio, conduzido em blocos de alvenaria com volume de 1m³ (cada célula) (**Figura 2**).

Na fase de compostagem, foram utilizadas 3 tratamentos. O primeiro tratamento foi conduzido sem inoculação de microrganismos (V1). O segundo foi conduzido com inoculação de microrganismo ambiental - EM (V2) e o terceiro foi inoculado com microrganismos comerciais (Korin®) (V3) preparados de acordo com as recomendações do fabricante.

Figure 2. Representação gráfica das células de alvenaria para a compostagem e vermicompostagem, onde foram conduzidas o experimento.



Fonte: Passos, 2014.

Após 90 dias, com o material ainda na fase de compostagem, no início da fase de maturação, foi adicionado esterco de gado e minhoca vermelha da Califórnia (*Eisenia foetida*) em cada célula (três repetições por tratamento) para iniciar a fase de vermicompostagem, permanecendo por mais 60 dias em blocos de alvenaria para biotransformação e plena maturação do vermicomposto.

Após a biotransformação dos materiais, foram coletadas 10 amostras simples, que foram homogeneizadas, formando uma amostra composta por tratamento, e foram encaminhadas para o Laboratório Plantsphere no Equador, para realizar as análises física, química, fitohormonal, teor de aminoácidos e microbiana. Os vermicompostos no momento da coleta das amostras, sem o peneiramento, apresentavam as seguintes características: bio-oxidação e temperatura – estável; coloração - marrom escuro e odor: humificado (**Figura 3.**).

Figure 3. Registro do vermicomposto ao final do processo de bio-oxidação



Fonte: Da autora Pereira, 2018.

O restante do vermicomposto foi peneirado e embalado em sacos de microfibras, separados de acordo com os tratamentos/inoculações e enviados para a área de plantio do *O. vulgare* L.

2.4 Análises física, química, fitohormonal, aminoácidos e microbiana

As análises para quantificação e identificação das características física, química, fitohormonal, teor de aminoácidos e microbiana das três formulações de vermicompostagem, foram realizadas de acordo com a metodologia de análise proposta por Ogundele OM. (2013); Lictiman J. Conchello J. (2005); Valueur B. (2002) e Urzúa Hernández, et al., (2006), adotando os seguintes protocolos: Observação direta (DO); Colorimetria Citohistoquímica (CCHC); Análise de microplaca (AMP: MA, APD, NA, KB, KA); Microscopia N/CO; Microscopia infiltrada (CMI); Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), também conhecida como contraste de interferência de Nomarski (NIC); Reação Enzimática Microbiana (MER); Microscopia de Fluorescência (FM).

2.5 Experimento *in vivo*

Após a formulação dos três vermicompostos, o experimento foi conduzido em campo na área experimental do setor de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob a coordenada geográfica Lat. -21,223062 e Long. -44,972369. A excisata de *O. vulgare* L. foi depositada no herbário da ESAL/ UFLA, sob o registro nº. 22.156.

As mudas foram obtidas a partir de estacas apicais de plantas matrizes do Horto de Plantas Medicinais da UFLA e enraizadas em bandejas de polipropileno expandido de 128 células. Após 30 dias, com solo previamente analisado, as mudas foram transplantadas para o campo, e conduzidas em delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema de parcela subdividida, com cinco tratamentos, três repetições e dezoito plantas por parcela, no espaçamento de 0,25x 0,25 cm, em duas épocas de corte.

Os tratamentos foram compostos pela testemunha solo (T1), vermicomposto puro (V1) (T2), vermicomposto ambiental (V2) (T3) e vermicomposto comercial (V3) (T4), com aplicação de 6 L/m², respectivamente, e fertilizante químico - NPK (T5) que consistiu na aplicação de 80 g/m² do formulado 10-10-10.

2.6 Extração de óleo essencial

As hastes das plantas foram cortadas a 5 cm do solo após 95 dias de transplântio, quando as primeiras plantas iniciaram a fase de floração. Ocasionalmente posterior a colheita, obteve-se a biomassa fresca, e posterior, o material foi fracionado, alocado em sacos de papel kraft e levados à estufa de circulação forçada de ar a 30 °C até massa constante, obtendo assim a biomassa seca da parte aérea (g).

Para as extrações de óleo essencial (OE), a biomassa seca da parte aérea foi cortada em pequenos pedaços, pesada e colocada em um balão volumétrico de fundo redondo de 5 L. Em seguida, foi adicionada água deionizada ao balão até submergir o material vegetal, alocados sob a manta térmica e submetidos à hidrodestilação por 3h com aparelho tipo Clevenger, cujo procedimento foi repetido três vezes. Após a extração, o óleo essencial foi seco com Na²SO₄ anidro e acondicionados em potes de vidro que foram armazenados a uma temperatura inferior a 0 °C.

2.7 Análise estatística

Para comparar os resultados, os testes de homocedasticidade e normalidade foram previamente realizados pelo software ASSISTAT (SILVA, 2009). Em seguida, foi realizado a análise de variância dos dados, pelo teste F, utilizando o programa estatístico (SISVAR) e aplicado o teste de médias de Scott-Knott (FERREIRA, 2011) para biomassa seca da parte aérea e teor de óleo essencial.

A análise da caracterização dos três vermicompostos foram conduzidas por teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952), seguido do teste *post hoc* de Conover (Conover & Iman, 1979), com correção de Hommel (Hommel, 1988). A análise das comparações múltiplas a nível de significância 5 e 10% foi realizada pelo software R versão 3.6.3. E a análise dos componentes principais (PCA) pelo software R (R Core Team, 2019).

3 Resultados e Discussão

3.1 Análise de parâmetros químicos e físicos

Os resultados experimentais de pH, densidade (D), condutividade elétrica (CE), matéria orgânica (MO), relação carbono/nitrogênio (C/N), ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF), relação AH/AF, polissacarídeos (P), respiração (R), demanda química de oxigênio (DQO) e redução de açúcar (RA), indicadores químicos mensurados ao final do processo de vermicompostagem para as três formulações são apresentados na Tabela 1.

A variável pH, densidade, condutividade elétrica não apresentaram nenhuma variabilidade entre as observações. Já o teor de matéria orgânica (% de carbono), apresentou variabilidade em todos os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo possível inferir que há diferença estatística a 10% de significância entre as formulações. A relação (C/N) também apresentou variabilidade entre os níveis, porém não há diferença significativa a 10%. Portanto, pode-se considerar que os vermicompostos possuem níveis estatisticamente equivalentes para esta variável. Enquanto que para os parâmetros AH, AF, AH/AF, P, R, DQO e RA, todos os tratamentos apresentaram variabilidade.

Tabela 1 - Os resultados da análise dos parâmetros químicos avaliados em cada tratamento com três repetições (média \pm desvio padrão).

| Parâmetros | Vermicomposto (V1) | Vermicomposto Ambiental (V2) | Vermicomposto Comercial (V3) |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| pH | 7,1 \pm 0 | 7 \pm 0 | 6,7 \pm 0 |
| Densidade | 0,44 \pm 0 | 0,46 \pm 0 | 0,45 \pm 0,06 |
| Condut. Elétrica | 6,24 \pm 0 | 7,17 \pm 0 | 5,83 \pm 0,35 |
| Matéria Orgânica (%) | 28,67 \pm 3,06 | 31,33 \pm 4,04 | 28,67 \pm 1,53 |
| Relação C/N | 19,11 \pm 2,04 | 17,41 \pm 2,25 | 18 \pm 2,06 |
| Ácido Húmico (AH) | 11 \pm 1,67 | 15,43 \pm 3,01 | 13,43 \pm 1,58 |
| Ácido Fúlvico (AF) | 5,33 \pm 2,4 | 7,43 \pm 0,93 | 9,8 \pm 2,49 |
| Relação AH/AF | 2,25 \pm 0,72 | 2,09 \pm 0,45 | 1,41 \pm 0,27 |
| Polissacarídeos (mg) | 42,33 \pm 9,29 | 44 \pm 1,73 | 45 \pm 6,24 |
| Respiração mg g ⁻¹ | 540 \pm 85,44 | 586,67 \pm 151,77 | 546,67 \pm 87,37 |
| DQO mg g ⁻¹ | 1992,67 \pm 211,1 | 1736,67 \pm 650,1 | 2049,33 \pm 87,19 |
| Redução de Açúcar (%) | 88,33 \pm 3,51 | 94,33 \pm 6,03 | 92 \pm 7,21 |

A Tabela 2. apresenta a caracterização para macro e micronutrientes. Dentre os macronutrientes, apenas os teores de fósforo (P), potássio (K), nitrogênio (N) e enxofre (S) apresentaram variabilidade em todos os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis, no entanto, é possível inferir que há diferença estatística a 10% de significância entre as formulações de vermicompostagem para o teor de fósforo. Para os teores de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e sódio (Na), os vermicompostos não apresentaram nenhuma variabilidade nas observações.

Entretanto, é possível identificar diferença estatística entre o vermicomposto (V1) em relação ao vermicomposto ambiental (V2) e o vermicomposto comercial (V3), no tocante aos níveis de fósforo, cujo a maior mediana de fósforo foi observada no tratamento (V3). Dentre os micronutrientes, apenas os teores de ferro (Fe), zinco (Zn) e cádmio (Cd) apresentaram variabilidade em todos os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis. No entanto, somente o teor de cobre (Cu) difere estatisticamente entre as formulações de vermicompostagem. Para os outros micronutrientes não foi observado variabilidade entre os tratamentos, logo não é possível determinar equivalência estatística para as variáveis.

Tabela 2 - Os resultados da análise de macro e micronutrientes avaliados em cada tratamento com três repetições (média \pm desvio padrão).

| Parâmetros | Vermicomposto | Vermicomposto A | Vermicomposto C |
|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Fósforo (%) | 2,94 \pm 0,17 | 2,38 \pm 0,17 | 2,61 \pm 0,13 |
| Potássio (%) | 1,84 \pm 0,34 | 1,83 \pm 0,41 | 1,39 \pm 0,15 |
| Cálcio (%) | 7,3 \pm 0 | 8,8 \pm 0 | 6,53 \pm 0,49 |
| Magnésio (%) | 0,71 \pm 0 | 0,88 \pm 0 | 0,65 \pm 0,11 |
| Sódio (%) | 0,08 \pm 0 | 0,9 \pm 0 | 0,67 \pm 0,15 |
| Enxofre (%) | 0,4 \pm 0,12 | 0,25 \pm 0,1 | 0,33 \pm 0,19 |
| Nitrogênio Total (%) | 1,5 \pm 0 | 1,8 \pm 0 | 1,6 \pm 0,1 |
| Ferro/ppm | 1,1 \pm 0 | 1,8 \pm 0 | 1,3 \pm 0,17 |
| Cobre/ppm | 39,33 \pm 5,51 | 37,33 \pm 4,51 | 27,33 \pm 5,03 |
| Manganês/ppm | 241,33 \pm 33,83 | 206,33 \pm 45,32 | 257,33 \pm 39,53 |
| Zinco/ppm | 166 \pm 0 | 229 \pm 0 | 173,67 \pm 19,73 |
| Boro/ppm | 0,11 \pm 0,04 | 0,06 \pm 0,04 | 0,38 \pm 0,52 |
| Cádmio/ppm | 0,84 \pm 0,62 | 0,1 \pm 0,01 | 0,11 \pm 0 |
| Molibdênio (%) | 0,2 \pm 0,17 | 0,17 \pm 0,06 | 0,12 \pm 0,03 |
| Cobalto (%) | 0,1 \pm 0 | 0,1 \pm 0 | 0,1 \pm 0 |
| Silício/ppm | 11 \pm 1 | 10,33 \pm 2,89 | 9,83 \pm 1,89 |

3.2 Análise dos parâmetros biológicos

Os resultados obtidos para os teores de aminoácidos (triptofano, cisteína, tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido fólico e ácido nicotínico são apresentados na Tabela 3. Os aminoácidos quantificados nas formulações de vermicompostagem, apresentaram variabilidade em todos os tratamentos. Porém há diferença significativa a 5% apenas para o aminoácido triptofano, para as demais variáveis não foi evidenciado diferença entre os tratamentos.

Tabela 3 - Os resultados da análise de aminoácidos e fitohormônios avaliados em cada tratamento com três repetições (média \pm desvio padrão). (continua)

| Parâmetros | Vermicomposto | Vermicomposto A | Vermicomposto C |
|-------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Triptofano | 1,13 \pm 0,35 | 2,23 \pm 0,25 | 2,5 \pm 0,4 |
| Cisteína | 1,37 \pm 0,42 | 1,9 \pm 0,8 | 1,83 \pm 1,1 |
| Tiamina | 0,87 \pm 0,21 | 0,93 \pm 0,23 | 1,77 \pm 1,34 |
| Riboflavina | 6,67 \pm 3,51 | 8,67 \pm 2,89 | 12,67 \pm 6,81 |
| Piridoxina | 27 \pm 18,03 | 25,67 \pm 7,77 | 40 \pm 1,73 |
| Ácido Fólico | 2,77 \pm 3,68 | 1,13 \pm 0,78 | 0,78 \pm 0,38 |
| Ácido Nicotínico | 1,03 \pm 0,25 | 0,37 \pm 0,06 | 0,8 \pm 0,5 |
| Giberilina | 2,87 \pm 1,59 | 1,33 \pm 0,78 | 1,37 \pm 0,12 |
| Auxinas | 1,93 \pm 0,91 | 2,53 \pm 0,49 | 1,1 \pm 0,44 |
| Citocininas | 1,33 \pm 0,55 | 1,73 \pm 1,01 | 0,7 \pm 0,35 |

| | | | |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Zeatinas | 0,33 ± 0,32 | 1,83 ± 0,55 | 0,93 ± 0,21 |
| Brasinoildes | 0,4 ± 0,2 | 1,07 ± 0,06 | 1,03 ± 0,64 |

Enquanto que as medianas obtidas para os fitohormônios (giberilinas, auxina, citocinina, zeatinina e brassinosteróides) podem ser observados na tabela 3. verifica-se que os teores de fitohormônios quantificados nas formulações de vermicompostagem, apresentaram variabilidade em todos os tratamentos. Porém, apenas os teores de zeatinina e auxina possuem diferença significativa a 10%, para as demais variáveis não foi evidenciado diferença entre os tratamentos.

Por fim, o microbioma catalítico com a identificação e quantificação das 16 espécies de microrganismos, podem ser observados na tabela 4. Embora haja grande diversidade da comunidade microbiana, apenas o *Bacillus subtilis* e o *Trichoderma sp.* apresentaram diferença estatística significativa a 10% e 5% respectivamente, entre as formulações de vermicompostagem, bem como, a comunidade microbiana total, difere estatisticamente.

Tabela 4 - Os resultados da análise de aminoácidos e fitohormônios avaliados em cada tratamento com três repetições (média ± desvio padrão).

| Parâmetros | Vermicomposto | Vermicomposto A | Vermicomposto C |
|---------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| <i>Acinetobacter sp.</i> | 1,59 ± 0,91 | 2,35 ± 1,03 | 1,92 ± 0,36 |
| <i>Actinomyces sp.</i> | 1,51 ± 0,42 | 1,64 ± 0,68 | 2,01 ± 0,43 |
| <i>Azotobacter chroococcum</i> | 0,83 ± 0,33 | 1,5 ± 0,48 | 1,76 ± 0,44 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 0,91 ± 0,21 | 0,94 ± 0,28 | 2,16 ± 0,27 |
| <i>Bacillu subtilis</i> | 0,96 ± 0,86 | 1,51 ± 0,67 | 3,12 ± 0,14 |
| <i>Bradirhizobium japonicum</i> | 1,32 ± 0,66 | 1,92 ± 0,38 | 1,95 ± 0,96 |
| <i>Hipocra spp</i> | 1,3 ± 0,62 | 2,33 ± 1,45 | 1,64 ± 1,2 |
| <i>Humicola sp</i> | 1,36 ± 0,81 | 2,26 ± 1,22 | 2,55 ± 0,48 |
| <i>Micela sterilia</i> | 1,31 ± 0,32 | 2,1 ± 1 | 2,01 ± 0,83 |
| <i>Nitrosomonas sp.</i> | 2,14 ± 0,88 | 2,33 ± 0,67 | 1,47 ± 0,67 |
| <i>Nitrospira sp.</i> | 1,55 ± 0,5 | 1,95 ± 0,59 | 1,9 ± 1,13 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 2,18 ± 1,11 | 2,6 ± 0,52 | 2,77 ± 0,93 |
| <i>Streptomyces sp.</i> | 2,19 ± 0,74 | 2,16 ± 0,72 | 3,26 ± 0,94 |
| <i>Trichoderma hamatum</i> | 2,41 ± 1,07 | 2,15 ± 0,13 | 2,12 ± 1,6 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | 1,24 ± 0,38 | 1,59 ± 0,39 | 2,43 ± 0,2 |
| <i>Thiobacillus sp.</i> | 1,33 ± 0,46 | 1,98 ± 1,02 | 2,77 ± 1,05 |

De acordo com a IN n° 25 de 23/07/09 (BRASIL, 2009) “a qualidade dos fertilizantes orgânicos é tomada em relação aos valores declarados ou garantidos pelo

fabricante para os parâmetros: matéria orgânica, carbono orgânico, relação carbono/nitrogênio, capacidade de troca catiônica, capacidade de retenção de água, poder de neutralização, pH, ácidos húmicos, aminoácidos, umidade, condutividade elétrica e outros componentes garantidos ou declarados não previstos”.

Neste sentido, todos os parâmetros caracterizados para os três vermicompostos formulados nesta pesquisa, foram comparadas as especificações da IN nº 61 de 08/07/20; Art. 9 (BRASIL, 2020) (Tabela 5), que define vermicomposto como “produto resultante da digestão, pelas minhocas, da matéria orgânica proveniente de esterco, restos vegetais e outros resíduos orgânicos e aponta as garantias e especificações mínimas exigidas para o registro deste fertilizante orgânico composto. Ou seja, mesmo que para alguns parâmetros não tenha sido observada diferença estatística entre os tratamentos, as 3 formulações de vermicomposto estão acima do mínimo exigido por lei no que diz respeito aos parâmetros químicos, físicos e biológicos.

Tabela 5 - Garantias mínimas para os produtos com macronutrientes secundários e/ou micronutrientes para aplicação no solo, via foliar e hidroponia segundo a Art. 9 IN nº 61 de 08/07/20 (BRASIL, 2020) (continua)

| Parâmetros | Teor Total Mínimo de Aplicação no Solo | | | |
|---|--|---------------|-------------------------|-------------------------|
| | IN nº 61 | Vermicomposto | Vermicomposto ambiental | Vermicomposto comercial |
| Nitrogênio (N) | 1 | 1,5 | 1,8 | 1,6 |
| Fósforo(P ₂ O ₅) | 1 | 2,94 | 2,33 | 2,61 |
| Potássio (K ₂ O) | 1 | 1,83 | 1,82 | 1,39 |
| NPK | 5 | 6,27 | 5,95 | 5,6 |
| Cálcio (Ca) | 1 | 7,3 | 8,8 | 6,3 |
| Magnésio (Mg) | 1 | 0,71 | 0,88 | 0,65 |
| Enxofre (S) | 1 | 0,27 | 0,19 | 0,37 |
| Ca+Mg+S | 3 | 8,28 | 9,87 | 7,32 |
| Cloro (Cl) | 0,1 | - | - | - |
| Cobalto (Co) | 0,005 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Níquel (Ni) | 0,005 | <0,2 | <0,2 | <0,2 |
| Molibidênio (Mo) | 0,005 | 0,20 | 0,17 | 0,12 |
| | ----- % | -----ppm----- | | |
| **Manganês (Mn) | 0,02 | 241,33 | 206,33 | 257,33 |
| **Zinco (Zn) | 0,1 | 166 | 229 | 173,67 |
| **Boro (B) | 0,1 | 0,1 | 0,02 | 0,07 |
| Ferro (Fe) | 0,02 | 1,1 | 1,8 | 1,3 |
| **Cobre (Cu) | 0,02 | 39,33 | 37,33 | 27,33 |

| | | | | |
|---------------------------------|------|---------------|-------|-------|
| *** Cádmio (Cd)(mg/kg) (máximo) | 3 | 0,84 | 0,10 | 0,11 |
| Silício (Si) | 0.05 | 11,00 | 10,33 | 9,83 |
| | | ----- % ----- | | |
| Carbono orgânico | 15 | 28,67 | 31,33 | 28,60 |
| Relação C/N (máximo) | 20 | 19,11 | 17,41 | 18,00 |
| pH | 6 | 7,1 | 7,0 | 6,7 |
| Nitrogênio Total | 0,5 | 1,5 | 1,8 | 1,6 |
| CTC | - | - | - | - |
| * Aminoácidos livres | 5% | 40,83 | 40,9 | 60,35 |
| * Ácido húmico | 15% | 11,3 | 18,3 | 14,8 |
| * Ácido fúlvico | 3% | 3,8 | 8,2 | 9,3 |

* Quantidades mínimas para ser enquadrado como biofertilizantes; ** Tolerância de Boro (B), até 2 (duas) vezes o teor declarado; para Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Zinco (Zn), até 3 (três) vezes o teor declarado desses nutrientes; *** Limites máximos de contaminantes admitidos em fertilizantes orgânicos e condicionadores de solo (SDA N° 27, 05 DE JUNHO DE 2006, Alterada pela IN SDA n° 7, de 12/04/2016).

3.3 Dinâmica do pH, densidade e condutividade elétrica

Ao final dos processos de vermicompostagem em todos os tratamentos as proporções de pH estavam na faixa neutra, variando de 7,1, 7,0 e 6,7, respectivamente, acima do valor mínimo exigido pela legislação. E a densidade também não apresentou variabilidade entre os tratamentos, com mediana de 0,45 (kg/cm³). Durante os processos da vermicompostagem o substrato orgânico é fragmentado, aumentando consideravelmente a quantidade de partículas pequenas, especialmente aquelas menores de 5 mm, modificando a densidade aparente do material, como consequência da fragmentação das partículas pelo trato gastrointestinal das minhocas. Esta ação mecânica aumenta a relação superfície-volume das partículas dos agregados, aumentando assim a atividade microbiana sobre substrato orgânico (Elvira et al., 1998)

A condutividade elétrica (mSLm/cm) está associada ao conteúdo de teor de solutos dissolvido na massa de vermicompostagem bio-oxidada. As formulações apresentaram variabilidade nos teores com 6,24 mSLm/cm) para V1, na V2 com 7,17 mSLm/cm) e 5,83 mSLm/cm) para a formulação V3.

A condutividade elétrica está relacionada com a mineralização do material orgânico pelas minhocas, microrganismos e os níveis de sais solúveis (Gong et al., 2019). Para a caracterização da CE em esterco de gado vermicompostado por Balachandar et al., (2020) a CE apresentou média de 2,51 e 2,91 dS /m, valores menores ao encontro para

este experimento, enquanto que Ramnarain et al., (2017) observou média de 3.71 mS/cm e Marques et al., (2020) de 39.80 e 40.40 $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$.

A redução do pH próximo ao ponto neutro, na faixa de 6.5 e 7.8, é relatado por muitos pesquisadores utilizando diferentes tipos de resíduos orgânicos e proporções de esterco de gado no processo de vermicompostagem (Gong et al., 2019; Ramnarain et al., 2017). De acordo com Pramanik et al. (2007) o efeito combinado dos íons de carga oposta (amônio e grupos de ácidos húmicos) formados na bioxidação do material orgânico, atuam na regulação do pH para a neutralidade.

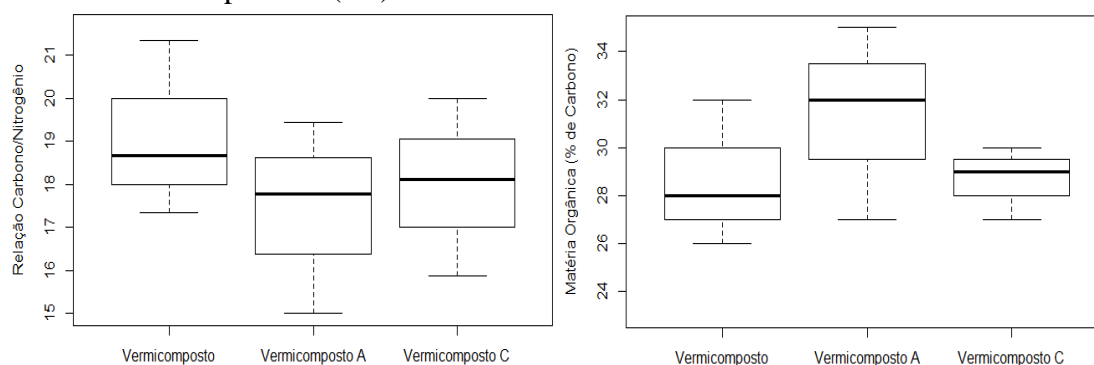
Portanto, o pH e a condutividade elétrica se encontram dentro dos limites agronômicos estipulados pela IN nº 61 de 08/07/20 (BRASIL, 2020).

3.4 Dinâmica da Matéria Orgânica e Relação Carbono/Nitrogênio

Teor de matéria orgânica (% de carbono) e relação carbono/nitrogênio (C/N) são variáveis altamente correlacionáveis quanto ao grau de maturação da vermicompostagem, processo de mineralização, contribuindo na elevação do teor de matéria orgânica do solo, fornecimento de nutrientes, bem como, um microclima propício para o desenvolvimento e multiplicação de microrganismos na rizosfera.

Alidadi et al., (2016) avaliando a reciclagem de resíduos orgânicos por vermicompostagem, em diferentes formulações, constatou relação C/N nas proporções de 14,01, 12,93, 16,61 e 28,16. O resultado corrobora com as proporções encontradas para este estudo, cuja a relação C/N para as três formulações, com e sem inoculação de microrganismos eficientes, apresentaram variação de 19,11 (V1), 17,41 (V2) e 18,00 (V3) (Figura 4).

Figura 4 - Teor de matéria orgânica e relação carbono/nitrogênio, de três formulações de vermicompostagem. Legenda: vermicomposto (V1), vermicomposto A (V2) e vermicomposto C (V3).



Fonte: Da autora (2020)

Verifica-se que o (V1) apresentou maior variabilidade na % de MO, com teores na faixa de 31% corroborando com Marques et al., (2020), que constataram 30.10 e 38.7% de matéria orgânica e relação C/N de 15/1 e 16/1, e, com Cotta et al., (2015) avaliando a vermicompostagem de resíduos vegetais + esterco, evidenciaram relação C/N de 16/1 e MO de 37.8%, entretanto na pesquisa realizada por Ramnarain et al., (2017), os valores relatados foram abaixo dos artigos supracitados, com % de MO de 18.53% e relação C/N de 13:1.

O teor de matéria orgânica a ser adicionado ao solo através da vermicompostagem é um fator de grande importância e relevância mundial. Estima-se que a elevação dos teores de matéria orgânica do solo reflete na restauração, reestruturação e manutenção da vida do solo, contribuindo na atividade do macro e meso fauna, atividade microbiana, ciclagem de nutrientes, preservação e manutenção do bioecossistema, fundamental para alcançar sistemas agroalimentares sustentáveis e segurança alimentar (FAO, 2020).

Como reflexo da adição de matéria orgânica, os solos apresentam melhor estruturação dos agregados, elevação da capacidade de troca catiônica (CTC) devido ao aumento das cargas negativas na superfície dos colóides e maior efeito tampão, redução da densidade aparente, aumento da disponibilidade de fósforo, bem como no fornecimento de enxofre (CARON et al., 2015). Além disso, a reestruturação reflete em maior porosidade, que influi em boa aeração, oxigenação, retenção de água no solo, menor compactação, e, conseqüentemente, menor taxa de erosão e escoamento superficial.

A relação C/N abaixo de 20, a mesma tem sido utilizada como indicador de maturidade de compostos e vermicompostos (Marques et al. 2020). No entanto, no que tange a nutrição mineral no cultivo agrícola, a relação C/N se correlaciona a época/tempo de fornecimento de nutrientes para a solução do solo, através do processo de mineralização, que é a transformação do nutriente na fase orgânica, para a fase mineral, de forma que o mesmo esteja prontamente assimilável pelo sistema radicular das culturas.

Neste sentido, quando a relação C/N está acima de 20 - 25:1, os microrganismos presentes no solo, tendem a imobilizar as moléculas de N para decompor as moléculas de C, e este nutriente fica indisponível temporariamente para as plantas, o que pode afetar o crescimento e acarretar em estresse abiótico das culturas de interesse. Do contrário, quando a relação está abaixo de 20 - 25:1, o processo de decomposição e mineralização é mais acelerado, e os nutrientes, se não absorvidos ou adsorvidos, podem ser facilmente lixiviados para camadas mais profundas do perfil do solo, de forma que as espécies

vegetais com sistemas radiculares fasciculados, menos desenvolvidos, não os absorva, culminando em deficiência nutricional.

Segundo Ndegwa et al., (2000) a relação C/N ideal para vermicompostagem é de 25/1, embora possa ser considerada adequada entre 20/1 e 25/1 (LOURENÇO, 2010), a IN nº 61 de 08/07/20 (BRASIL, 2020) recomenda que a relação C/N deve ser no máximo 20, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa para as formulações de vermicompostagem.

De acordo com Atiyeh et al., (2001), quando a humificação do vermicomposto é acelerada, tal fator reflete em menor relação C/N que é inversamente proporcional a elevação de nutrientes minerais (P, K e N) devido a mineralização da MO pelas minhocas. De modo geral, os teores da relação C/N estão dentro do limite máximo exigido para fertilizante orgânico composto classe A (Brasil 2020), apontando que este fertilizante em estudo, pode ser passível de comercialização.

3.5 Dinâmica do ácido húmico, ácido fúlvico e relação ácido húmico e fúlvico

O material orgânico bio-oxidado através das minhocas e da ação dos microrganismos, formam as substâncias húmicas, que são compostos orgânicos condensados que diferem dos biopolímeros por sua estrutura macromolecular e elevada persistência no solo (Fischer, 2017). As substâncias húmicas contêm uma parte hidrofílica, os ácidos fúlvicos, e outra hidrofóbica, o ácido húmico (AH) (Drosos, 2017), agregados organizados em compostos orgânicos de baixo (AF) e alto (AH) peso molecular (Kawahigashi, 2005).

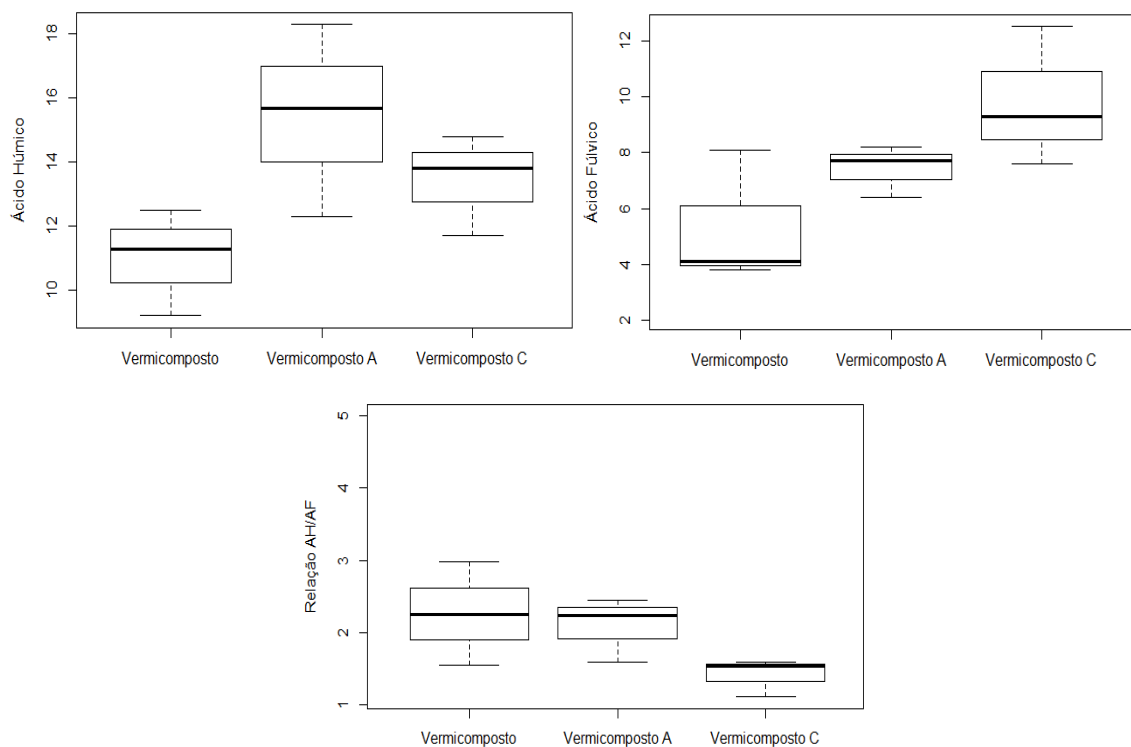
Mesmo não sendo observado diferença estatística significativa para os parâmetros AH e AF (Figura 5), observa-se variabilidade entre os tratamentos, entretanto, para a relação AH/AF verifica-se diferença estatística significativa a $p < 0.006$. Sendo assim, é possível inferir que o vermicomposto A (V2) embora apresente maior variabilidade para ácido húmico, a relação AH/AF não diferiu do vermicomposto (V1). Já para o vermicomposto C (V3), verifica-se maior variabilidade para o ácido fúlvico, porém quanto a relação AH/AF o mesmo encontra-se com relação abaixo dos demais tratamentos.

A inoculação de microrganismo ambiental ao vermicomposto A (V2) contribuiu para a maior mediana de ácido húmico, com 15.43%, em relação aos demais vermicompostos com 11 e 13 %, V1 e V3 respectivamente. De acordo com Dominguez

e Edwards, (2004) o processo de humificação do material orgânico ocorre pela fragmentação e redução do tamanho da partícula e elevação da atividade microbiana dentro do intestino, facilitando a humificação da matéria orgânica pelo muco da minhoca.

Sabe-se que a atuação das minhocas ocorre em simbiose aos microrganismos presentes na massa a ser bio-oxidada, neste sentido, a inoculação pode ter contribuído para a elevação da atividade dos microrganismos sobre a massa a ser vermicompostada.

Figura 5 - Dinâmica do ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) e relação AH/HF de três formulações de vermicompostagem. Legenda: vermicomposto (V1), vermicomposto A (V2) e vermicomposto C (V3).



Fonte: Da autora (2020)

Corroborando com este estudo, Hervas et al., (1989) avaliando seis formulações de vermicompostagem encontraram teores de substâncias húmicas variando de 3.6% em resíduos sólidos municipais a 17.2% com estrume de vaca, Cotta et al., (2015) encontraram valores abaixo ao relatado nesta pesquisa com 6%. Os teores de substâncias húmicas em vermicompostos tem sido associado aos efeitos benéficos no cultivo de plantas, quanto ao alongamento e formação de raízes laterais, melhoria da estrutura microbiana do solo e auxiliam na nodulação de raízes, bem como na colonização micorrízica (Maji et al., 2017). Estudos comparando a aplicação da vermicompostagem e a mesma quantidade de ácido húmico e fúlvico de forma isolada, verificaram efeitos igualados entre vermicompostagem e o produto específico isolado (Ievinsh et al., 2017).

O ácido húmico e fúlvico são moléculas importantes que podem influenciar direta ou indiretamente no metabolismo das plantas, transporte de íons, na atividade respiratória, conteúdo de clorofila, síntese de ácidos nucleicos e a atividade de várias enzimas e etapas da fisiologia vegetal, como nas mudanças da via bioquímica do metabolismo primário e secundário (Canellas et al., 2014; Kwiatkowska-Malina, 2018; Nardi et al., 2017).

Além disso, em estudo de revisão realizado por Pereira et al., (2019) apontam quem as substâncias húmicas desempenham ação indireta sobre a química e dinâmica microbiana da rizosfera (Canellas e Olivares, 2014), alterando a interação solo-planta-microbiota (Canellas e Olivares, 2017) em relação a assimilação de macro e micro nutrientes em função do aumento da permeabilidade da membrana plasmática pela ação das substâncias húmicas (Da Silva et al., 2014).

Outro fator de grande relevância, é que muitas pesquisas com vermicompostagem são realizadas para o isolamento das moléculas de ácido húmico e fúlvico, para a comercialização como bioestimulante, na elicitação de espécies vegetais, ao invés da potencialização produtiva deste fertilizante orgânico, que além reciclar os resíduos sólidos, pode retornar ao solo, estimulando a produção vegetal de diversas espécies.

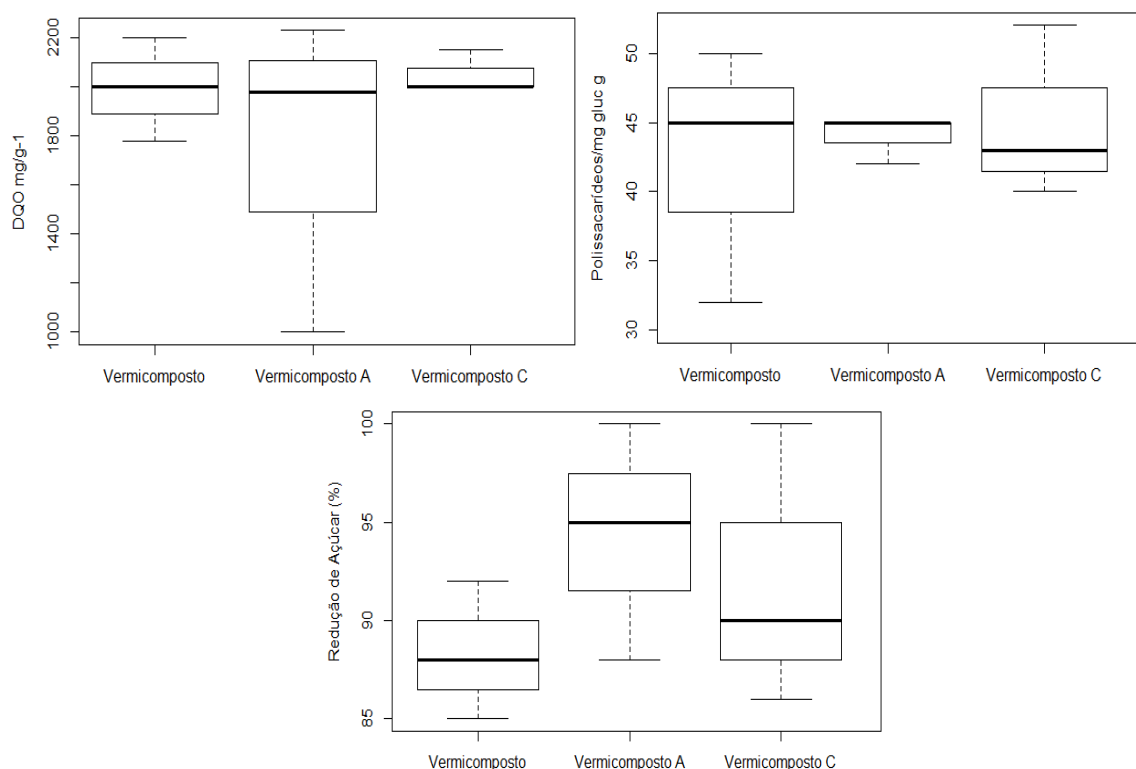
3.6 Dinâmica dos polissacarídeos, respiração, demanda bioquímica de oxigênio (DQO) e redução de açúcar

A taxa de respiração, de redução do açúcar e a demanda bioquímica de oxigênio, (Figura 6), estão relacionadas com a atividade microbiana na decomposição do material orgânico, e influencia no tempo gasto para a maturação final do produto, bem como a sua estabilização (Aira e Dominguez, 2010). Existe uma relação entre a taxa de respiração na humificação e transformação do nitrogênio, indicando alta atividade de nitrificação e desnitrificação, bem como a DQO se correlaciona a redução de açúcar, gerando energia para que os microrganismos transformem o material orgânico (Cotta et al., 2015; Hait e Tare, 2011). A taxa de respiração dos vermicompostos ao final da maturação variaram de 540 mg g⁻¹ a 586 mg g⁻¹, a menor variabilidade na demanda bioquímica de oxigênio foi observada para o vermicomposto A, com 1736,66 mg g⁻¹ e maior variabilidade para o vermicomposto C 2048,33 mg g⁻¹.

A concentração de DQO também é um parâmetro para avaliar a maturação do produto final, porém não se correlaciona apenas a estabilização do processo da vermicompostagem, pois a demanda bioquímica de oxigênio (DQO) também é utilizada

para estimar a carga mássica degradável que pode ser convertida em biogás (Gasch et al., 2013). A produção e biogás através do reaproveitamento de resíduos sólidos, de origem alimentar, industrial e agropecuária, com foco na produção de energias sustentáveis renováveis, tem ganhado grande destaque nos últimos anos a nível mundial.

Figura 6 - Dinâmica dos polissacarídeos, respiração, demanda química de oxigênio (DQO) e redução de açúcar de três formulações de vermicompostagem. Legenda: vermicomposto (V1), vermicomposto A (V2) e vermicomposto C (V3).



Fonte: Da autora (2020)

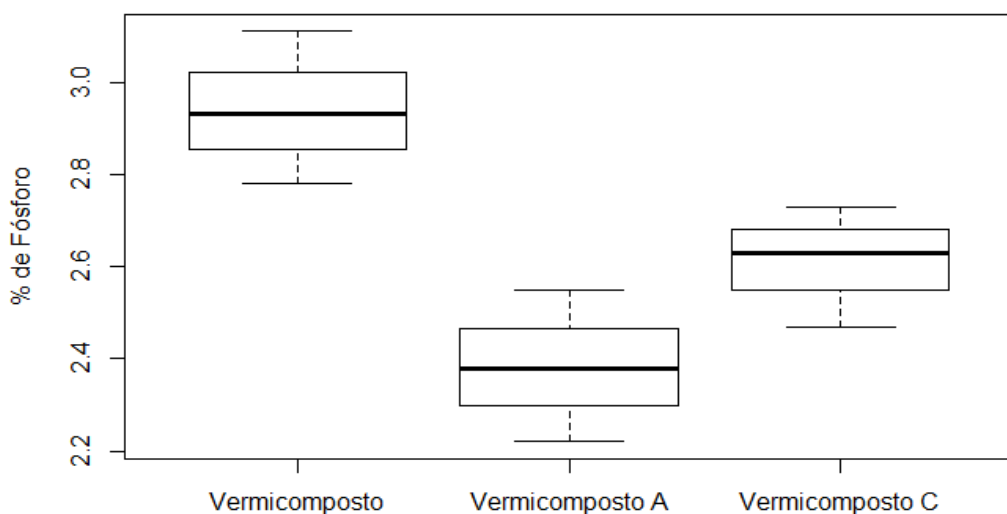
3.7 Dinâmica de macro e micronutrientes

O potencial de liberação de nutrientes ao solo através da adição de resíduos orgânicos, sejam como condicionadores de solo ou fertilizantes orgânicos, para a recuperação de solos degradados ou para a nutrição vegetal, é uma promissora tecnologia social, de baixo custo e viável aos agricultores familiares (Pereira et al., 2021). Dentre os macronutrientes o teor de fósforo apresentou tendência de aumento e foi observado diferença estatística a $p < 0.05$ (Figura 7). O vermicomposto (V1) apresentou maior variabilidade no teor de fósforo quando comparado as formulações (V2) e (V3), com mediana de 3%, seguido de V3 e V2, com 2.6 e 2.3 % respectivamente.

Em função da atividade da enzima fosfatase no trato gastrointestinal das minhocas, pode ocorrer o aumento do teor de fósforo em virtude da mineralização pelas bactérias e enzimas presentes no processo de bio-oxidação e maturação (Raphael e Velmourougane, 2011). No presente trabalho, a redução no teor de fósforo observada para os tratamentos com adição de microrganismos ambientais (V2) e microrganismo comercial (V3), se deve ao fato de que, com a elevação da comunidade microbiana, à massa orgânica, refletiu em imobilização do P, e maior consumo de energia para a decomposição do carbono.

Ao contrário do que se imagina, os microrganismos não consomem apenas o nitrogênio para realizar a humificação do material orgânico, estudos retratam que a relação carbono/fósforo, influencia no processo de mineralização do P (Maluf et al., 2015) e que ao utilizarem o P no metabolismo microbiano pode ocorrer a imobilização em detrimento da mineralização dos íons ortofosfato, ambos processos ocorrem de forma simultânea, e influenciam na maior ou menor liberação de fósforo (Rosseto e Tsai).

Figura 7 – Dinâmica do teor de fósforo (%) para as três formulações de vermicompostagem. Legenda: vermicomposto (V1), vermicomposto A (V2) e vermicomposto C (V3).



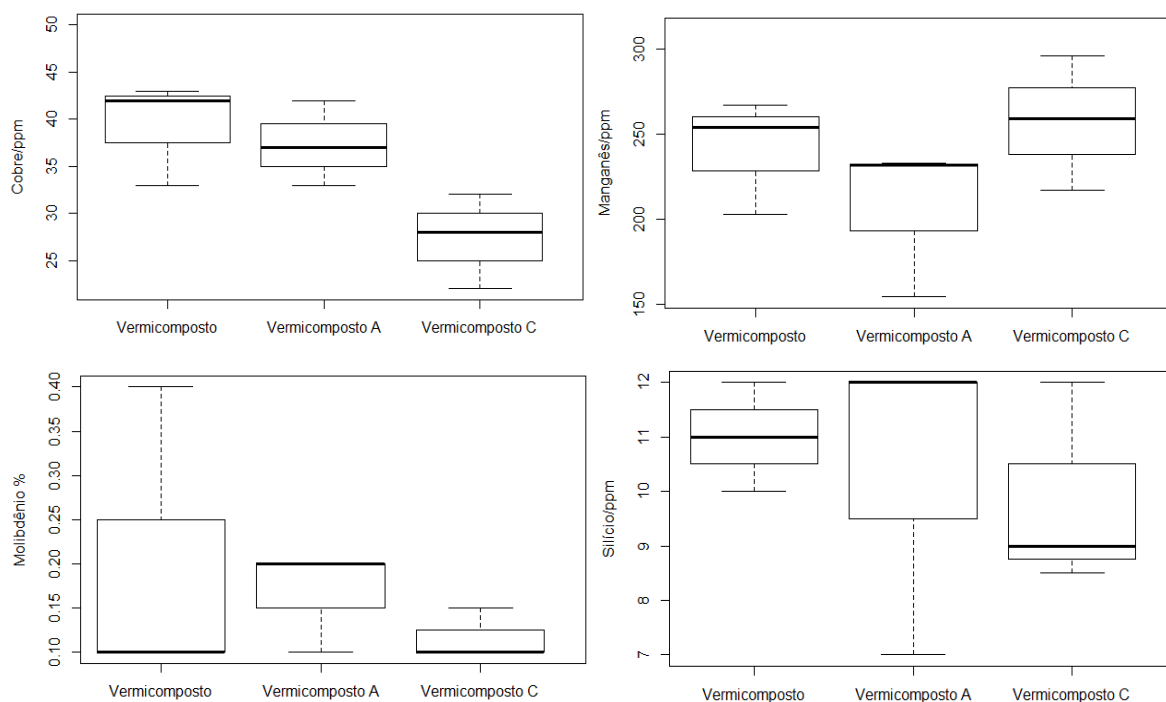
Fonte: Da autora (2020)

No entanto para os demais macronutrientes, mesmo que não tenha sido possível constatar diferença estatística entre as formulações de vermicompostagem, todos os tratamentos apresentaram teores de nutrientes acima da exigência mínima descrita pela legislação brasileira na IN nº 61 de 08/07/20 (BRASIL, 2020) (Tabela 6.). Os teores de potássio e nitrogênio, embora não tenham diferido nos tratamentos, apresentaram teores

em média de 1,68 % e 1,6%. Enquanto que os teores de cálcio foram em média 7,54%, magnésio de 0,75%, sódio 0,5% e enxofre 0,3%.

Dentre os micronutrientes apenas os teores de cobre, ferro, zinco e cádmio apresentaram variabilidade em todos os tratamentos. Os outros micronutrientes não apresentam variabilidade, independente da formulação de vermicompostagem. Para os teores de manganês, o tratamento (V3) apresenta maior variabilidade. Já para o silício e molibdênio, a maior variabilidade é observada para o (V2), e, para o cobre é possível inferir que há diferença estatística entre os tratamentos, onde (V3) apresenta os menores teores em comparação a (V1) com maior concentração (Figura 8).

Figura 8 - Dinâmica do teor de cobre (ppm), manganês (ppm), silício (ppm) e molibdênio (%) para as três formulações de vermicompostagem. Legenda: vermicomposto (V1), vermicomposto A (V2) e vermicomposto C (V3).



Fonte: Da autora (2020)

Sabe-se que a aplicação de vermicompostagem ao solo pode resultar em efeitos sobre a nutrição mineral, fitotoxicidade e fornecimento de elementos minerais as espécies cultivadas de forma lenta e gradual, que resulta na proteção dos nutrientes quanto a lixiviação e ou percolação. E mesmo que alguns metais sejam imobilizados pela ação dos microrganismos, a remobilização dos elementos pode ocorrer devido a alteração do potencial redox do solo, pH e presença de substância húmicas que influenciam na fertilidade dos solos (Levinsh, 2020). De modo em geral, resultados similares quanto a

caracterização de macro e micronutrientes, com uso de diferentes resíduos orgânicos corroboram com esta pesquisa (Marques et al. 2020; Usmani et al., 2019; Fernández-Gómez et al., 2012).

A fertilidade é geralmente avaliada pela análise dos macros e micronutrientes, relação C/N e da capacidade de troca catiônica (CTC) (Kiehl, 1985). Cujas cargas negativas, responsáveis pelo aumento da CTC, estão presentes nos grupos funcionais carboxílicos (-COOH), fenólicos (-OH), álcoois (-OH) e metoxílicos (-OCH₃) dos ácidos orgânicos presentes nas substâncias húmicas, teor de matéria orgânica e dependem do pH do meio (Abreu Jr. et al., 2001).

Portanto, embora as três formulações apresentem ótima característica química e possam ser aplicadas na forma de condicionador de solo ou fertilizante orgânico composto, conforme a legislação brasileira, a exclusiva mensuração elementar dos nutrientes presentes nas formulações de vermicompostagem (Figura 8), não são fatores isolados que irão refletir ou convergir em maior ou menor liberação para a solução do solo, e conseqüentemente, absorção, imobilização ou lixiviação destes elementos, pelo contrário, deve ser analisada em conjunto, observando outros parâmetros que estão diretamente correlacionados a fertilidade do solo, como a presença de microorganismos, fitohormônios, substâncias húmicas, dentre outros.

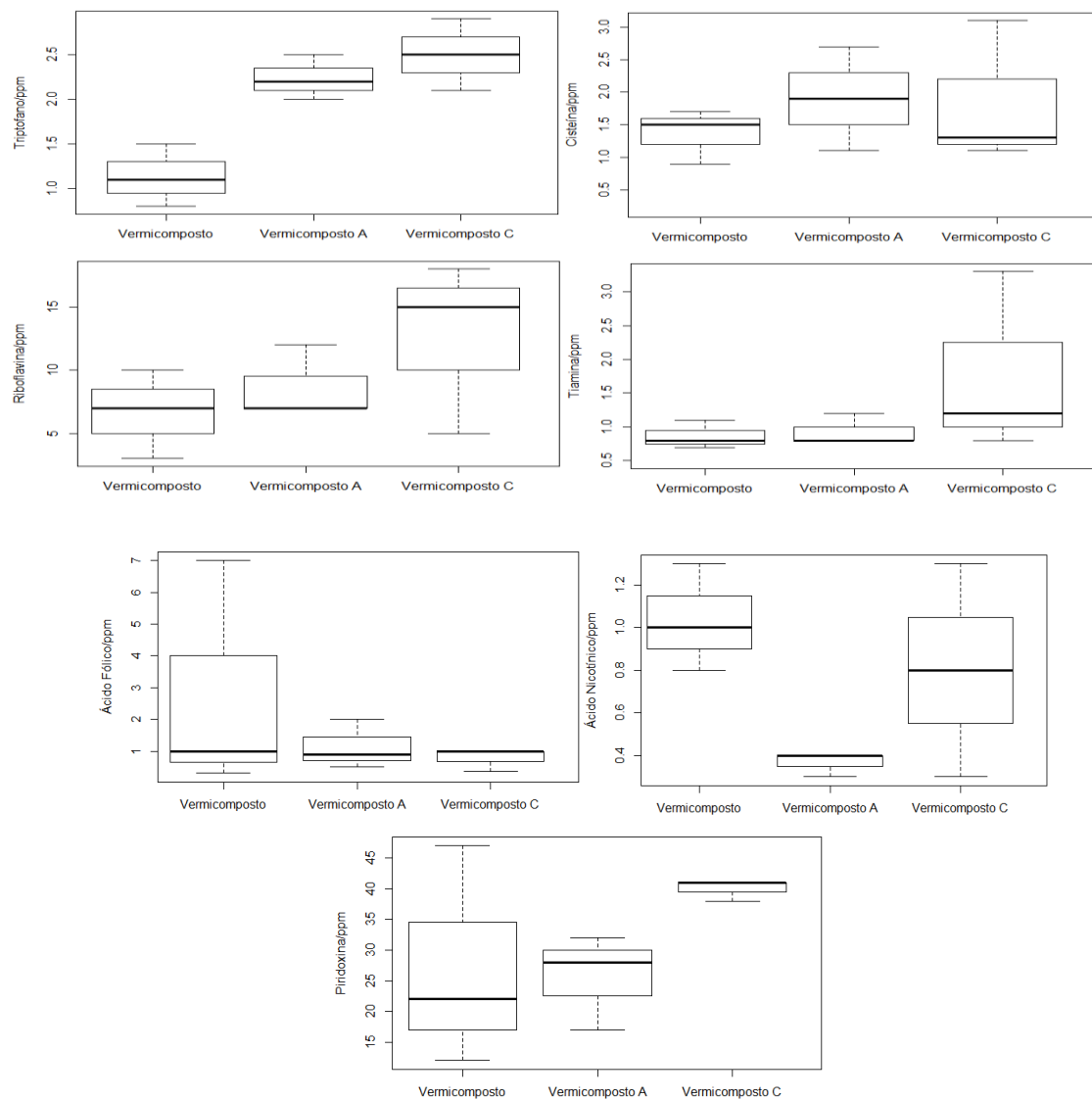
3.8 Dinâmica dos teores de aminoácidos

Os aminoácidos quantificados nas formulações de vermicompostagem, apresentaram variabilidade em todos os tratamentos (Figura 9.). Verifica-se maior variabilidade de triptofano (ppm) nas formulações V2 e V3, com diferença estatística a <0.05 . Para a cisteína as medianas do V3 concentraram-se no terceiro quartil com variabilidade similar ao V2.

Para a tiamina (ppm), a riboflavina (ppm) e a piridoxina (ppm) o V3 apresenta maior variabilidade em relação às demais formulações. Para o ácido fólico embora o V1 demonstre maior variabilidade, a mediana entre os tratamentos foi similar. Já para o teor de ácido nicotínico (ppm), o V1 teve a maior variabilidade, acima de 0.8 ppm e o V2 a menor, com teores abaixo de 0.4 (ppm). Várias são as hipóteses quanto aos efeitos dos aminoácidos no desenvolvimento das plantas. Castro e Carvalho, (2014) citam que as principais funções seriam: a síntese de proteínas; atuar como composto intermediário dos hormônios vegetais endógenos; e, efeito complexante em nutrientes e outros agroquímicos.

Embora seja difícil isolar o efeito dos aminoácidos quando os mesmos estão presentes em formulações que contém macro e micronutrientes, dentre outras substâncias, bem como, são escassos os trabalhos científicos que elucidem e quantifiquem seus teores no vermicomposto. Entretanto, Castro e Carvalho, (2014), ressaltam que os aminoácidos podem agir em processos morfofisiológicos do vegetal como precursores de hormônios endógenos ou enzimas, como o triptofano que é conhecido como precursor do ácido indolilacético e auxina. E que estudos sob condições tropicais quanto a influencia dos aminoácidos no desenvolvimento vegetal, se faz necessário.

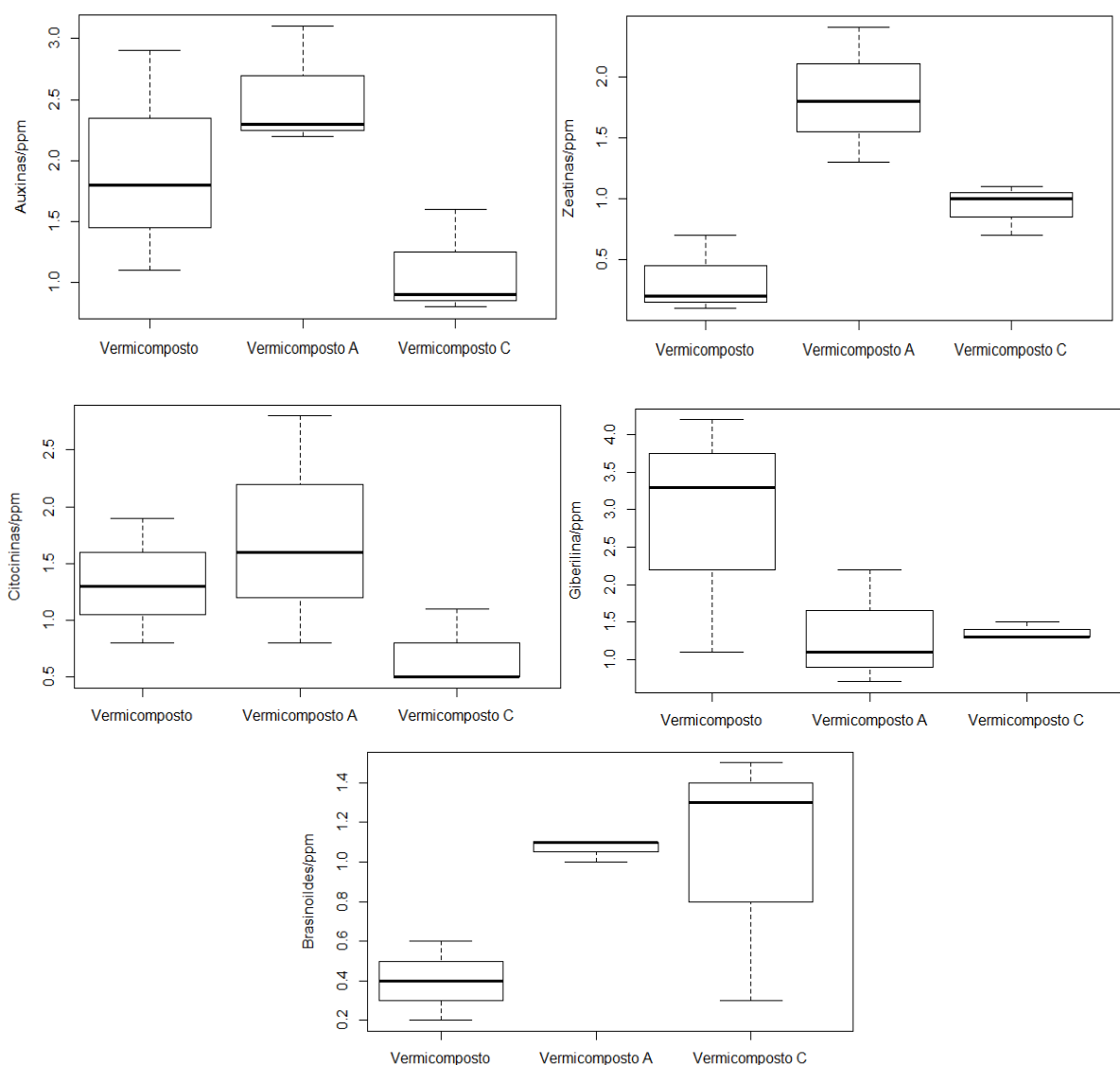
Figura 9 - Dinâmica dos teores de aminoácidos (ppm) para as três formulações de vermicompostagem. Legenda: vermicomposto (V1), vermicomposto A (V2) e vermicomposto C (V3).



Fonte: Da autora

3.9 Dinâmica para os teores de fitohormônios

Apenas os teores de zeatinina (ppm) e auxina (ppm) possuem diferença significativa (Figura 10). De modo em geral o vermicomposto A (V2) a qual foi inoculado microrganismos eficientes da mata ciliar, apresentou os maiores teores de auxina e zeatinina. Para o vermicomposto (V1) verifica-se maior variabilidade no teor de auxina em relação ao vermicomposto C (V2) com inoculação comercial de microrganismos. Enquanto que para a zeatinina (ppm) o formulado (V3) possui maiores teores que o (V1). Figura 10 - Dinâmica dos teores de fitohormônios (ppm) para as três formulações de vermicompostagem. Legenda: vermicomposto (V1), vermicomposto A (V2) e vermicomposto C (V3).



Fonte: Da autora

Independente de não haver diferença estatística entre as três formulações de vermicompostagem para este parâmetro, a quantificação e caracterização dos fitohormônios é de grande importância para compreensão da influência que o vermicomposto pode exercer na promoção do crescimento de plantas. Os fitohormônios são responsáveis por influenciar diversas funções fisiológicas e vitais das plantas, e em diversos estudos são citados, porém são escassos os estudos que quantificaram a identificação e análise dos grupos de hormônios presentes na vermicompostagem.

Os teores de citocinina (ppm), giberilina (ppm) e brassinosteróides (ppm) tiveram grande variabilidade entre as formulações, evidenciando que para brassinosteróides o (V1) apresenta menor variabilidade, abaixo de 0.6 (ppm) comparado a V2 e V3. No entanto a maior variabilidade de giberilina (ppm) é observada para o V1, com teores acima de 2.0 (ppm) e para os teores de citocinina, V3 possui a menor variabilidade, abaixo de 1.0 (ppm).

Zhang et al., (2015) analisando o teor de fitohormônios por duas técnicas de extração em vermicompostagem de resíduos orgânicos, como vegetais, cascas de frutas e aguapés, com as espécies de minhoca *Perionyx excavatus* e *Eisenia foetida*, com pH 7.4, 0.39 S m^{-1} de condutividade elétrica, total de carbono e nitrogênio de 24.72% e 1.50%, com relação C/N de 11:1, identificaram os seguintes grupos de fitohormônios: Auxina: ácido indolbutírico 0.72% e indolacético 0.09% e ácido naftoxiacético 1.02%; Ácido abscísico 0.53%; Citocinina: N⁵benzyladenine 0.21%, Zeatinina 2.07%, Isopentenyladenosine 0.65%. Os teores encontrados para a zeatinina corroboram com os identificados neste estudo para as três formulações (V1, V2 e V3), porém os demais fitohormônios estão acima das porcentagens identificadas por Zhang et al., (2015).

Adeyemi et al., (2015) avaliando três lixiviados de vermicompostagem identificaram entre 0.55 – 0.77 ppmol/ml de ácido indol-3-acético, um total de 18 tipos de giberilinas consistindo em formas biologicamente ativas e precursores biossintéticos, além de teores de brassinosteróides de 1 – 5 fg/ml. Os fitohormônios impactam no metabolismo das plantas atuando como regulador de crescimento e papel vital da estimulação de mecanismo de resposta da planta a estresse biótico e abióticos (Egamberdieva et al., 2017).

A modulação dos níveis de fitohormônios pode ser associado a reguladores microbianos (Shahzad et al., 2016) que são responsáveis pela síntese de compostos biologicamente ativos como os grupos de hormônios vegetais auxina, citocinina,

giberilinas, zeatinina, , brassinosteróides, dentre outros, que desempenham papel no crescimento, nutrição e desenvolvimento das plantas (Egamberdieva et al., 2017)

Em diversos estudos realizados com isolados bacterianos, os pesquisadores observaram que o *Bacillus*, *Azospirillum* e *Pseudomonas*, produziram citocinina e que estimularam o desenvolvimento das raízes das plantas (Naz et al. 2009), espécies como *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Acetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Azospirillum sp.* foram encontrados entre cepas produtoras de giberelina (Bottini et al., 2004), e que espécies de actinobacterias, actinomicetos e *Streptomyces* produzem giberilinas (Shutsrirung et al., 2013; Vijayabharathi et al., 2016).

Estudos também verificaram que o *Enterobacter* foi capaz de produzir auxina e melhorar o crescimento do milho em solo contaminado com Cd (Ahmad et al., 2016), bem como espécies de *Azospirillum* podem liberar zeatinina (citocinina), fitohormônios responsável pela expressão de genes na senescência de tecidos e órgãos, inibindo efeito fisiológico degenerativo e aumento na longevidade celular (Santos et al., 2017)) por estar envolvido na regulação da biossíntese de óxido nítrico que está relacionado a senescência e defesa das plantas (Ni Tun et al., 2008).

Enquanto que os brassinosteróides atuam na resistência ao estresse, diferenciação do xilema, atividade antioxidante, alongamento das raízes, expansão celular, na eficiência do fotossistema II e trocas gasosas (LIMA e LOBATO, 2017; WEI e LI, 2016, Wu et al., 2018). Pesquisas apontam que existe interação entre brassinosteróides e auxinas, na modulação e expressão de genes envolvidos nos mesmos processos fisiológicos (Nemhauser et al., 2004). No entanto, dentre os principais hormônios constituintes dos bioestimulantes comerciais estão as auxinas, giberelinas e citocininas (Vasconcelos, 2016).

De modo geral a auxina atua na promoção do crescimento, desenvolvimento e divisão celular (Asgher et al., 2015), já a citocinina está envolvida na manutenção, diferenciação celular e prevenção da senescência, importantes na redução dos efeitos ocasionados pelo estresse abióticos (Hu et al., 2013). Enquanto que a giberilina tem papel vital no crescimento lateral de raízes, aumento da absorção de água pela planta e redução da resistência estomática sob condições de salinidade (Ahmad, 2010).

Neste sentido, mediante os vários estudos, observa-se uma correlação entre a quantificação de fitohormônios e alguns gêneros de microrganismos (anexo 1), e que os fitohormônios caracterizados nos vermicompostos (V1, V2 e V3) podem contribuir na

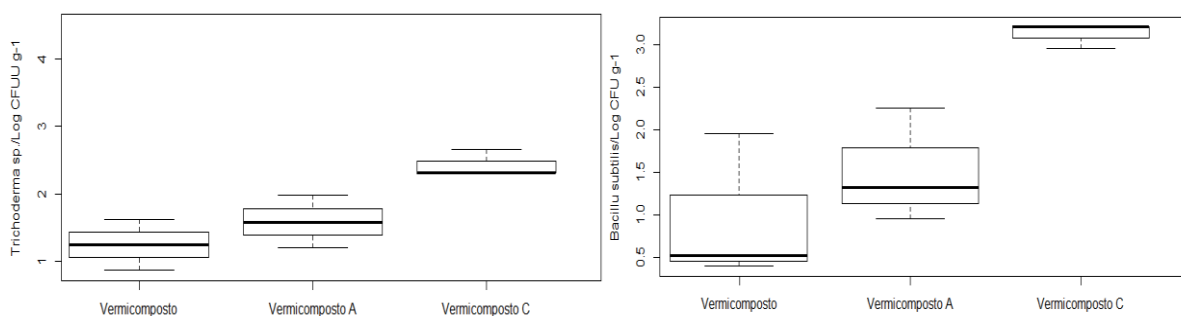
promoção do crescimento de espécies vegetais, além de desempenharem um papel importante na mitigação dos estresses abióticos que possam ocorrer.

3.10 Caracterização do Microbioma

A diversidade de microrganismos totais ($\log \text{CFU g}^{-1}$) quantificados nas três formulações de vermicomposto, através do biograma catalítico, expressa o potencial da tecnologia social vermicompostagem, no reaproveitamento de resíduos sólidos (Tabela 4). Foram identificadas 16 espécies de microrganismos, entre fungos e bactérias, que atuam na restauração e melhoria das características física e química do solo, potencializam a comunidade microbiana na rizosfera, promovem o crescimento de plantas, atuam na supressão de microrganismos fitopatógenos (Ceritoglu et al., 2018; Sulaiman e Mohamad, 2020), dentre outras características de extrema importância para o avanço da agricultura sustentável.

Para o grupo identificado e quantificado, apenas a população bacteriana de *Bacillus subtilis* ($\log \text{CFU g}^{-1}$) e do fungo do gênero *Trichoderma sp.* ($\log \text{CFU g}^{-1}$) apresentaram diferença estatística significativa a $p < 0.06$ (Figura 11). O vermicomposto (V3) apresentou maior variabilidade na população de *Bacillus* e *Trichoderma sp.* que as demais formulações. O vermicomposto A (V2) possui população intermediária para ambos, enquanto que o vermicomposto (V1) apresenta a menor variabilidade.

Figura 11 - Caracterização e quantificação da comunidade bacteriana de *Bacillus subtilis* ($\log \text{CFU g}^{-1}$) e fungo *Trichoderma sp.* ($\log \text{CFU g}^{-1}$) nas três formulações de vermicompostagem. Legenda: vermicomposto (V1), vermicomposto A (V2) e vermicomposto C (V3).



Fonte: Da autora

Os resultados apontam que a inoculação de microrganismos eficientes coletados na mata ciliar e de inoculante comercial, para as formulações de vermicomposto V2 e V3,

em comparação ao processo de vermicompostagem sem inoculação (V1), promoveu o aumento da comunidade microbiana total, constatando população de 24.12, 31.31 e 35.81log CFU g⁻¹, para (V1), (V2) e (V3), respectivamente.

De acordo com Dominguez et al., (2010) o ambiente intestinal das minhocas influencia no aumento da diversidade microbiana do vermicomposto. Em pesquisas realizadas por Fernandez-Gómez et al., (2015) analisando a comunidade bacteriana presentes nos diferentes vermicompostos em estudo, puderam identificar diversos táxons, que, em comparação aos identificados para esta pesquisa, destaca-se os gêneros *Acinetobacter sp.*, *Actinomyces sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Streptomyces sp.*.

A comunidade microbiana do intestino das minhocas é potencialmente ativa e pode digerir uma ampla variedade de materiais orgânicos e polissacarídeos, incluindo celulose, açúcares, quitina, lignina e amido (Vivas et al. 2009). Além disso, abriga diversos microrganismos decompositores e fixadores de nutrientes que são excretados em forma de caprólitos, junto com diversos nutrientes e microrganismos, como os *Nitrobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, solubilizadores de fosfato e actinomicetos (Suhane 2007).

Os gêneros identificados na caracterização microbioana, podem apresentar diferentes funções e contribuir de diversas formas para a melhoria da qualidade do solo, no crescimento de plantas e na supressão de fitopatógenos (Ceritoglu et al., 2018; Sulaiman e Mohamad, 2020). Embora somente a comunidade bacteriana de *Bacillus* e fungos *Trichoderma* tenham apresentado diferença estatística em relação as formulações de vermicomposto (Tabela 4), para todos os tratamentos é constatado grande riqueza microbiana nas formulações. Corroborando com esse estudo, Pathma e Sakthivel (2013) relataram diferentes cepas de bactérias no vermicomposto, com potente capacidade antagônica e biofertilizante, pertencentes a diferentes gêneros, como *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Rhodococcus* e *Stenotrophomonas* do vermicomposto produzido por *Eisenia foetida*.

Dentre os 16 gêneros identificados, a actinobacterias *Streptomyces spp.* é relatada por estar envolvida na bioestabilização de diferentes materiais orgânicos quando processados por *E. fétida*, bem como no biocontrole de patógenos de solo (Fernandez-Gómez et al., (2015). Farh et al., (2017) constataram que os gêneros de *Bacillus subtilis*, e *Pseudomonas fluorescens*, contribuem no crescimento e desenvolvimento das plantas através da produção de quelatos de ferro, que é um mineral importante na síntese de

clorofila, mantendo a estrutura e função do cloroplasto, para o funcionamento de várias enzimas, como os citocromos no transporte de elétrons e atividade fotossintética.

As bactérias *Azospirillum sp.*, *Bradyrhizobium sp.* e *Azotobacter chroococcum* auxiliam na captação e assimilação de NH_4 e NO_3 e produzem enzimas nitrogenases, refletindo na fixação e fornecimento de nitrogênio para as espécies vegetais (Misra et al. 2017). Outros gêneros de bactérias de vida livre fixadores de N_2 como a *Nitrospira sp.* e *Nitrossomonas sp.* também são extremamente importantes para o ciclo do nitrogênio, atuando nos processos de amonificação e nitrificação.

Os fungos filamentosos *Humicola sp.* e *Hipocra sp.* do gênero *Trichoderma* contribuem na decomposição da matéria orgânica e atividade enzimática na formação das substâncias húmicas. Além disso, os fungos do gênero *Trichoderma sp.* e as bactérias *Enterobacter sp.* são capazes de solubilizar fosfatos, produzindo ácidos orgânicos que diminuem o pH ou quelam os íons minerais, liberando P, pela secreção de fosfatases e fitases (Misra et al. 2017; Gupta et al. 2011).

O gênero *Trichoderma sp.* têm sido relatado em estudos quanto a sua capacidade de supressão de nematoides e doenças fitopatogênicas de solo. Bem como o *Bacillus subtilis* é antagonico aos nematóides e aumenta o crescimento das plantas (Wei et al. 2014). O gênero *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas* também são relatados quanto a melhoria dos processos de osmorregulação na resistência e tolerância a seca e a salinidade.

Além disso, segundo Pathma e Sakthivel (2013) cerca de 49% de bactérias isoladas do vermicomposto de *E. foetida*, com grande maioria pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentam forte potencial antagonista a fungos fitopatogênicos, como *Bipolaris oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, *Cylindrocladium floridanum*, *C. scoparium*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*. Segundo Khan et al. (2017), o *Bacillus megaterium* alivia o estresse de níquel (Ni) pela atividade enzimática antioxidante aumentada da ascorbato peroxidase, catalase, peroxidase, superóxido dismutase, aumento da produção de flavonóides, fenóis e prolina.

Sendo assim, é consenso por muitos pesquisadores, que a vermicompostagem é rica em comunidade de microrganismos benéficos ao crescimento das plantas, por contribuir não somente com a nutrição mineral através da solubilização de fosfato mineral e fixação de nitrogênio, como também pelo aumento da atividade microbiana no solo, secreção de fitohormônios, produção de enzimas e sideróforos, influenciando na resistência sistêmica a fitopatógenos, estresse abiótico e biótico (Pereira et al., 2019).

Por conseguinte, pesquisas com foco na compreensão da diversidade microbiana de fertilizantes orgânicos como os vermicompostos, serão pré-requisitos no futuro para melhor compreender a influência no metabolismo primário e secundários das plantas, sua influência no crescimento e desenvolvimento, bem como a interação vermicompostagem – solo – planta, na recuperação e restauração de solos degradados para o avanço dos sistemas agroalimentares sustentáveis na produção de alimentos e soberania alimentar pelos países (FAO, 2020).

3.11 Influência da aplicação dos vermicompostos na produção de *Origanum vulgare* L.

A aplicação dos manejos nutricionais (vermicomposto e NPK) e a época de corte apresentaram interação significativa a $p < 0.01$ (Tabela 6). Para todos os tratamentos aplicados em campo, verifica-se que o segundo corte apresentou maior produção de biomassa seca da parte aérea (g/m^2) e teor (%) de óleo essencial (OE). O Orégano é considerado uma planta perene em consequência deste fator, espera-se maior produtividade no segundo corte em relação ao primeiro.

Tabela 6. Produção de fitomassa seca (g/m^2) (FS) da parte aérea e teor de óleo essencial (%) influenciados pela aplicação de vermicompostagem em comparação com as testemunhas (solo e NPK), em duas épocas de corte.

| Tratamentos | Fitomassa seca | | Teor de Óleo Essencial | |
|----------------------|----------------|-----------|------------------------|----------|
| | ----- g ----- | | ----- % ----- | |
| | 1 corte | 2 corte | 1 corte | 2 corte |
| Solo (T1) | 26.66 aA | 147.50 aB | 0.208 aA | 0.278 aB |
| Vermicomposto (T2) | 35.00 aA | 192.00 bB | 0.375 cA | 0.270 aB |
| Vermicomposto A (T3) | 43.00 aA | 232.50 cB | 0.228 aA | 0.425 bB |
| Vermicomposto C (T4) | 33,00 aA | 261.66 dB | 0.327 bA | 0.303 aB |
| NPK (T5) | 71.66 bA | 253.33 dB | 0.508 dA | 0.360 bB |

Tratamentos seguidos de letras iguais, sendo minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem significativamente pelo teste de médias Scoot-Knoot a $p < 0.01\%$.

No entanto, o fator de relevância para este estudo é a influência do vermicomposto na produção de orégano quanto a aplicação de três formulações de vermicompostagem em comparação as testemunhas (solo e fertilizante químico), em duas épocas de corte.

Neste sentido, observa-se que no primeiro corte o maior teor de biomassa seca da parte aérea foi observado para a testemunha (NPK), já o teor de OE, maiores porcentagens podem ser observadas para a aplicação de NPK (T5), seguido de vermicomposto (T2) e vermicomposto C (T4), com 0.50, 0.37 e 0.32%, respectivamente. Porém para o segundo

corte o maior teor de OE foi verificado na aplicação de vermicomposto A (T3) e NPK (T5), com 0.42 e 0.36% respectivamente. Constatando, que o vermicomposto com inoculação de microrganismos eficientes ambientais, pode ser aplicado em substituição ao NPK, na produção de *Origanum vulgare* L.

Para o primeiro corte a maior produção de biomassa seca e teor de óleo essencial para aplicação de NPK (T5) se deve ao fato de que fertilizantes químicos sintéticos são altamente solúveis e liberam com maior rapidez nutrientes para a solução do solo, de forma que a cultura do orégano foi responsiva ao incremento nutricional, refletindo em maiores porcentagens. No entanto, para o segundo corte, o maior teor de OE (%) constatado para aplicação do vermicomposto com inoculação de microrganismos coletados na mata (3), se deve ao fato que os fertilizantes orgânicos têm como característica a liberação lenta e gradual dos nutrientes para a solução do solo.

Além disso, o vermicomposto A atua não só como fertilizante, mas como um condicionar de solo, ao incrementar o teor de matéria orgânica, fornecendo substâncias húmicas, aminoácidos, fitohormônios, bem como favoreceu a atividade microbiológica do solo, pela elevada comunidade presente em sua formulação, que pode ser atribuído a inoculação com microrganismos eficientes da mata nativa local, de mesma região edafoclimática, a qual o *O. vulgare* foi cultivado em campo.

Sendo assim, as diferenças entre o primeiro e o segundo corte do *O. vulgare* (Tabela), pode ser explicado pela característica do manejo nutricional, ou seja, o NPK (T5) quando aplicado único e exclusivamente ao solo, esteve prontamente disponível, sendo que parte foi absorvida e outra pode ter sido lixiviada. Enquanto que o vermicomposto A (T3) forneceu não apenas macro e micronutrientes para as plantas, como o incremento no teor de matéria orgânica do solo, possibilitou a adsorção dos nutrientes mineralizados, o que resulta em menores perdas por lixiviação, bem como, a liberação lenta e gradual de nutrientes, favoreceu o incremento de biomassa e teor de óleo essencial.

Para além do efeito nutricional atribuído ao fornecimento de macro e micronutrientes, estudos apontam que a aplicação de insumos ao solo ricos em fitohormônios, substâncias húmicas e microorganismos, desempenham papel de bioestimulantes vegetais, e influenciam diretamente no desenvolvimento vegetal. Sendo que em plantas medicinais, é possível verificar alterações na produção de óleo essencial e perfil fitoquímico das espécies (Pereira et al., 2019).

Portanto, o fertilizante orgânico pode ser um substituto para o fertilizante sintético no cultivo sustentável de plantas medicinais, bem como, influencia na produção, teor e qualidade do óleo essencial, aumento de constituintes químicos de interesse e elevação do teor de macro e micronutrientes pelas culturas (Esmailpour et al., 2017; Ganjali et al., 2017; Heidarpour et al., 2019; Hossaini et al., 2016).

4 Correlação estatística da caracterização dos vermicompostos

Verifica-se para o vermicomposto (V1) e vermicomposto A (V2) uma alta associação positiva entre *Actinomyces* sp. e ácido húmico com $P > 0.05$ e que o vermicomposto C (V3) apresenta associação negativa entre estas variáveis (**Anexo 1**). Para o vermicomposto com inoculação ambiental (V2) a correlação foi significativa, ou seja, a presença de *Actinomyces* sp. influencia no aumento do teor de ácido húmico. A inoculação também influenciou positivamente a associação entre *Nitrossomonas* sp. e o teor de giberilinas e auxina, com força contrária para citocinina e zeatinas.

Quanto a associação de microrganismos e fitohormônios para o vermicomposto C (V3), verifica-se associações positivas, porém com menor força, sendo que apenas para brassinosteroides, há associação forte e positiva com *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*. Enquanto que o vermicomposto (V1) apresenta correlação fortemente positiva entre os teores de zeatinina e auxina com a população de *Bacillus subtilis*.

Para os teores de macro e micronutrientes é constatado que o *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Azotobacter chroococcum* estão correlacionados ao teor de potássio e ferro e a bactéria *Nitrospira* sp. ao teor de nitrogênio para o vermicomposto (V3). Enquanto que o teor de fósforo para (V1) tem associação forte e positiva com *Actinomyces* sp e *Azotobacter chroococcum*, para a espécie de *Pseudomonas fluorescens* verifica-se correlação negativa, ou seja, a sua presença reduz os teores de fósforo para esta formulação. Já a bactéria *Nitrossomonas* sp. é altamente correlacionada ao teor de enxofre no (V2).

Em relação ao metal pesado cádmio, a presença de *Actinomyces* sp e *Azotobacter chroococcum* são altamente correlacionais negativamente ao teor de cádmio, ou seja, a presença destas bactérias pela inoculação de microrganismos ambientais no vermicomposto (V2), pode reduzir a presença de metais tóxicos. Estas mesmas bactérias

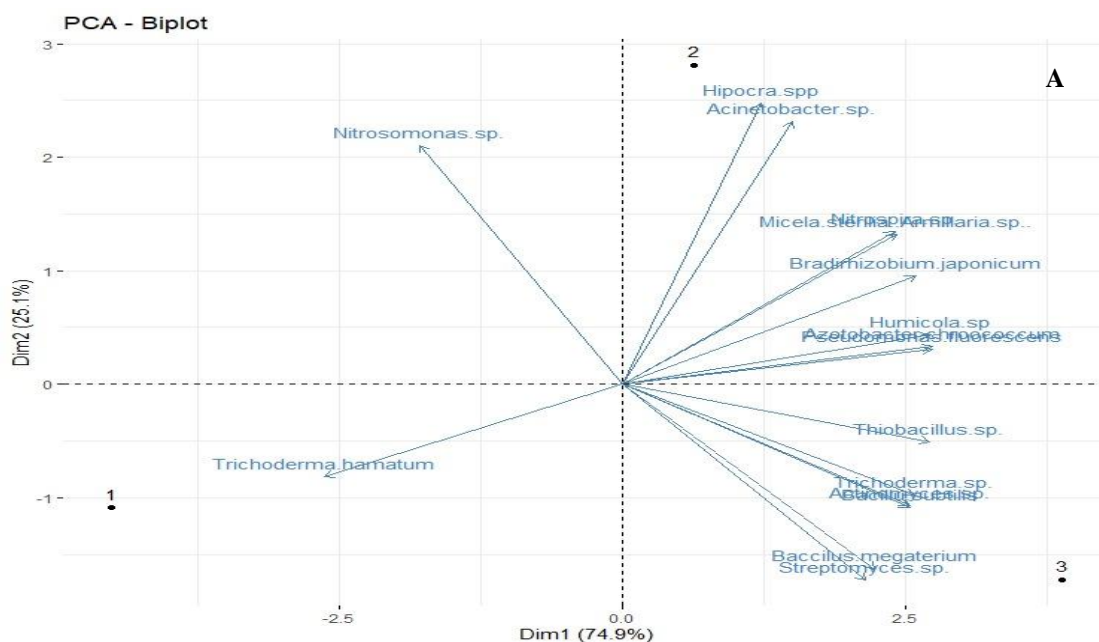
para o vermicomposto (V1) estão fortemente associadas positivamente para o teor de silício, que confere resistência as plantas ao ataque de fitopatógenos.

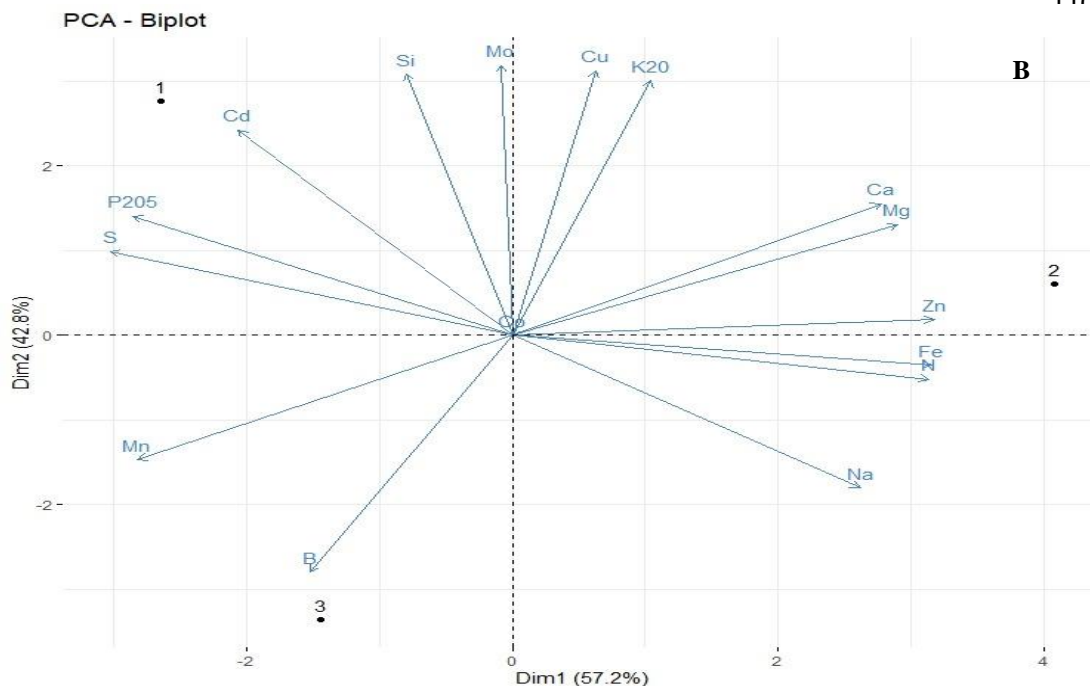
De modo em geral, independente da formulação do vermicomposto as bactérias *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* apresentam grande influência sobre os parâmetros avaliados.

5 Análise dos componentes principais

A análise dos componentes principais foi realizada para explicar a relação entre as três formulações de vermicompostagem quanto a quantificação da comunidade microbiana. Segundo o critério de Kaiser, que considera apenas o uso dos componentes que apresentam autovalor maior que um, os dois componentes principais (PC1 e PC2) podem ser usados (Figura 12). Esses dois componentes juntos explicam 100% da variação total, sendo adequado para explicar a relação entre as formulações de vermicompostagem e microrganismos.

Figura 12 -Análise dos componentes principais da análise microbiana (A) e química (B) e das três formulações de vermicompostagem. 1: vermicomposto (V1); 2: vermicomposto A (V2); 3: vermicomposto C (V3). (continua)





Fonte: Da autora

O primeiro componente principal (PC1 - Figura 12A) explica 74,89% do total da variação com fortes carregamentos positivos (> 0.7) para todos os microrganismos com exceção de *Nitrossomonas sp.* com carregamento negativo moderado (< -0.5) e *Trichoderma hamatum*, com carregamento negativo forte (< -0.7). Sendo observado maiores concentrações de *Hipocra spp.*, *Acinobacter sp.*, *Humicola sp.*, *Nitrospira sp.*, *Micela sp.*, *Bradrhizobium japonicum*, *Azotobacter chroococcum* e *Pseudomonas fluorescens* no vermicomposto A (V2), com inoculação de microrganismo eficiente da mata nativa.

Para o vermicomposto com inoculação comercial (V3), foi observado maior presença de *Streptomyces sp.*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Triobacillus sp.*, *Trichoderma sp.* e *Actinomyces sp.* Quando a vermicompostagem (V1) não foi inoculada por nenhum método, seja comercial ou ambiental, foi observado menor diversidade microbiana na sua composição, com possível maior população do gênero *Trichoderma hamatum*.

Para explicar a relação entre as formulações de vermicompostagem e os teores de macronutrientes e micronutrientes (**Figura 12B**), verifica-se que os dois componentes juntos explicam 100% da variação total, sendo que o primeiro componente principal (PC1) explica 57,22% do total da variação, com fortes carregamentos positivos (> 0.7) para todos os teores de nitrogênio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e zinco, bem como, carregamento negativo moderado (< -0.5) para boro, silício, molibidênio e cádmio, e, carregamento negativo forte (< -0.7) para enxofre, fósforo e manganês.

Quanto ao comportamento dos teores de macro e micronutrientes em relação as formulações, verifica-se que o (V1) apresentou maior composição dos nutrientes S, P₂O₅, Cd, Si e Mo. No entanto, quando o vermicomposto A (V2) foi inoculado com microrganismos eficientes, sobressaiu os nutrientes Ca, Mg, Zn, K₂O e Cu, e por fim, o vermicomposto com inoculação comercial (V3), apresenta concentrações de Mn e B mais evidentes.

3.3. Considerações Finais

1. O processo de vermicompostagem potencializa os teores de macro e micronutrientes, fitohormônios, aminoácidos, substâncias húmicas e atividade microbiana, independente da formulação;
2. Todas as formulações de vermicomposto se enquadram as exigências mínimas estipuladas pela legislação brasileira para o registro de fertilizante orgânico composto classe A;
3. A inoculação de microrganismos eficientes potencializa a comunidade microbiana do vermicomposto;
4. A diversidade microbiana dos vermicompostos podem influenciar no crescimento vegetal, supressão de fitopatógenos e minimizar ou reduzir os efeitos dos estresses bióticos e abióticos na produção vegetal;
5. A vermicompostagem é uma ferramenta potencial no reaproveitamento de resíduos alimentares a agropecuários e deve ser considerada uma prática fundamental no planejamento dos sistemas agroalimentares sustentáveis;
6. O vermicomposto com inoculação de microrganismo eficiente da mata nativa pode ser aplicado em substituição ao fertilizante químico na produção de biomassa seca e teor de óleo essencial de *Origanum vulgare L.*;
7. Por fim, a vermicompostagem e inoculação de microrganismos ambientais é uma ferramenta estratégica para a autonomia produtiva de agricultores familiares e tradicionais;

Financiamento

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) para fins financeiros apoio à execução da obra.

Anexo 1.

Coefficientes de correlação ilustrando a força de associação entre os microrganismos e os parâmetros de fitohormônios, substâncias húmicas, macro e micronutrientes em formulações de vermicompostagem. V1: vermicomposto; V2: vermicomposto A; V3 vermicomposto C.

| Microorganismo | Giberilina | | | Auxinas | | | Citocininas | | | Zeatinas | | | Brasinoídes | | |
|---------------------------------|---------------|---------------|-------|---------|-----------|---------------|-------------|-------|------------|---------------|-------|---------------|---------------|------------|------------|
| | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 |
| <i>Actinomyces.sp.</i> | -0,99* | -0,25 | 0,376 | 0,008 | -0,09 | 0,701 | 0,944 | 0,586 | 0,614 | -0,23 | 0,534 | 0,928 | 0,791 | 0,872 | -0,48 |
| <i>Azotobacter.chroococcum</i> | -0,97 | -0,69 | 0,485 | -0,07 | -0,79 | -1* | 0,916 | 0,368 | -1* | -0,31 | 0,425 | -0,29 | 0,836 | -0,88 | 0,985 |
| <i>Bacillus.megaterium</i> | 0,701 | 0,684 | 0,461 | -0,82 | 0,791 | -1* | -0,82 | -0,37 | -1* | -0,65 | -0,42 | -0,32 | 0,032 | 0,882 | 0,98 |
| <i>Bacillu.subtilis</i> | 0,163 | -0,52 | 0,499 | 0,948 | -0,64 | -0,99* | 0,021 | 0,162 | -1* | 0,997* | 0,224 | -0,28 | -0,83 | -0,96 | 0,988 |
| <i>Nitrosomonas.sp.</i> | -0,88 | 0,988* | -0,63 | 0,608 | 1* | 0,962 | 0,952 | -0,86 | 0,987 | 0,402 | -0,89 | 0,118 | 0,263 | 0,408 | -1* |
| <i>Nitrospira.sp.</i> | -0,45 | 0,622 | -0,58 | 0,952 | 0,738 | -0,51 | 0,609 | -0,29 | -0,41 | 0,852 | -0,35 | -0,99* | -0,33 | 0,918 | 0,265 |
| <i>Pseudomonas.fluorescens</i> | 0,77 | -0,26 | -0,9 | 0,509 | -0,41 | -0,04 | -0,64 | -0,11 | 0,075 | 0,699 | -0,05 | -0,94 | -0,99* | -1* | -0,23 |
| <i>Bradirhizobium.japonicum</i> | 0,264 | -0,62 | -0,68 | 0,911 | -0,48 | 0,944 | -0,08 | 0,863 | 0,976 | 0,983 | 0,83 | 0,061 | -0,88 | 0,6 | -1* |

*Coeficientes significativos a 10% pelo teste de Pearson.

| Microorganismo | Fósforo | | | Potássio | | | Cálcio | Magnésio | Sódio | Enxofre | | | Nitrogênio Total |
|---------------------------------|----------------|--------|--------|----------|--------|---------------|--------|----------|--------|---------|---------------|--------|------------------|
| | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 | V3 | V3 | V3 | V1 | V2 | V3 | V3 |
| <i>Actinomyces.sp.</i> | 0,822 | -0,473 | 0,006 | -0,694 | 0,806 | -0,614 | 0,280 | 0,83 | 0,981 | 0,673 | -0,036 | -0,042 | -0,789 |
| <i>Azotobacter.chroococcum</i> | 0,864 | -0,487 | -0,782 | -0,748 | 0,065 | 1,000* | 0,571 | -0,956 | -0,767 | 0,728 | -0,823 | -0,751 | 0,018 |
| <i>Bacillus.megaterium</i> | -0,020 | 0,486 | -0,765 | -0,177 | -0,063 | 0,999* | 0,549 | -0,963 | -0,784 | 0,205 | 0,821 | -0,733 | 0,044 |
| <i>Bacillu.subtilis</i> | -0,796 | -0,291 | -0,792 | 0,900 | -0,148 | 1,000* | 0,584 | -0,951 | -0,757 | -0,912 | -0,683 | -0,762 | 0,001 |
| <i>Nitrosomonas.sp.</i> | 0,313 | 0,920 | 0,881 | -0,120 | -0,663 | -0,987 | -0,709 | 0,887 | 0,640 | 0,092 | 0,999* | 0,857 | 0,162 |
| <i>Nitrospira.sp.</i> | -0,284 | 0,413 | 0,230 | 0,467 | 0,018 | 0,411 | -0,498 | -0,675 | -0,908 | -0,492 | 0,773 | 0,276 | 0,911 |
| <i>Pseudomonas.fluorescens</i> | -0,998* | -0,018 | 0,668 | 0,966 | -0,413 | -0,075 | -0,853 | -0,239 | -0,596 | -0,958 | -0,457 | 0,703 | 0,997* |
| <i>Bradirhizobium.japonicum</i> | -0,854 | -0,789 | 0,907 | 0,940 | 0,976 | -0,976 | -0,748 | 0,859 | 0,594 | -0,949 | -0,437 | 0,885 | 0,219 |

*Coeficientes significativos a 10% pelo teste de Pearson.

| Microorganismo | Ferro/ppm | | | Cobre/ppm | | | Manganês/ppm | | | Zinco/ppm | | | Boro/ppm | | | Cádmio/ppm | | | Molibdênio(%) | | | Silício/ppm | | |
|---------------------------------|---------------|---------------|-------|-----------|---------------|-----------|---------------|---------------|-------|-----------|-------|---------------|-----------|---------------|---------------|------------|-----------|-----------|---------------|----|----|-------------|--|--|
| | V3 | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 | V3 | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 | | |
| <i>Actinomyces.sp.</i> | -0,614 | 0,293 | 0,544 | 0,023 | 0,449 | 0,867 | 0,811 | 0,999* | -0,01 | 0,415 | 0,349 | -0,99* | -0,01 | -0,38 | -0,86 | 0,376 | 1 | -0,01 | 0,713 | | | | | |
| <i>Azotobacter.chroococcum</i> | 1* | 0,367 | 0,415 | -0,79 | 0,378 | -0,89 | -0,05 | -0,6 | -0,09 | 0,543 | 0,51 | -1* | 0,85 | -0,45 | 0,032 | 0,485 | 1 | 0,85 | -0,99* | | | | | |
| <i>Bacillus.megaterium</i> | 0,999* | 0,603 | -0,41 | -0,78 | -0,99 | 0,888 | -0,08 | -0,62 | -0,81 | -0,54 | 0,487 | 0,472 | -0,85 | -0,53 | -0,03 | 0,461 | 0 | -0,85 | -1 | | | | | |
| <i>Bacillu.subtilis</i> | 1* | -1* | 0,212 | -0,8 | 0,711 | -0,97 | -0,04 | -0,59 | 0,953 | 0,352 | 0,524 | 0,435 | 0,718 | 0,997* | 0,243 | 0,499 | -1 | 0,718 | -0,99* | | | | | |
| <i>Nitrosomonas.sp.</i> | -0,987 | -0,34 | -0,89 | 0,889 | 0,896 | 0,418 | -0,13 | 0,446 | 0,596 | -0,94 | -0,66 | -0,71 | -1 | 0,255 | 0,587 | -0,63 | 0 | -1 | 0,957 | | | | | |
| <i>Nitrospira.sp.</i> | 0,411 | -0,82 | -0,34 | 0,213 | 0,989* | 0,922 | -0,93 | -0,98 | 0,947 | -0,47 | -0,56 | -0,18 | -0,8 | 0,76 | -0,12 | -0,58 | -0 | -0,8 | -0,53 | | | | | |
| <i>Pseudomonas.fluorescens</i> | -0,075 | -0,74 | -0,06 | 0,655 | 0,076 | -1 | -0,99* | -0,77 | 0,522 | 0,083 | -0,89 | 0,919 | 0,501 | 0,801 | 0,499 | -0,9 | -1 | 0,501 | -0,06 | | | | | |
| <i>Bradirhizobium.japonicum</i> | -0,976 | -0,99* | 0,837 | 0,914 | 0,635 | 0,591 | -0,18 | 0,394 | 0,917 | 0,748 | -0,7 | 0,525 | 0,392 | 1* | -0,99* | -0,68 | -1 | 0,392 | 0,938 | | | | | |

*Coeficientes significativos a 10% pelo teste de Pearson.

3.4. Referencial teórico

Adesemoye, A. O.; Obini, M.; Ugoji, E. O. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 423–426, 2008.

Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., and Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 161–175. doi: 10.3109/07388550903524243

Aira, Manuel; Monroy, Fernando; Domínguez, Jorge. *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae) modifies the structure and physiological capabilities of microbial communities improving carbon mineralization during vermicomposting of pig manure. *Microbial Ecology*, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 662–671, 2007.

Alidadi, Hossein et al. Waste recycling by vermicomposting: Maturity and quality assessment via dehydrogenase enzyme activity, lignin, water soluble carbon, nitrogen, phosphorous and other indicators. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], v. 182, p. 134–140, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.025>>

Arancon, N. Q. et al. Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. *Pedobiologia*, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 297–306, 2005.

Arancon, N. Q. et al. Influences of vermicomposts, produced by earthworms and microorganisms from cattle manure, food waste and paper waste, on the germination, growth and flowering of petunias in the greenhouse. *Applied Soil Ecology*, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 91–99, 2008.

Asgher, M., Khan, M. I. R., Anjum, N. A., and Khan, N. A. (2015). Minimising toxicity of cadmium in plants-role of plant growth regulators. *Protoplasma* 252, 399–413. doi: 10.1007/s00709-014-0710-4

Atiyeh, R. M. et al. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: Effects on physicochemical properties and plant growth. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 11–20, 2001.

Atiyeh, R.M., Dominguez, J., Subler, S., Edwards, C.A., 2000b. Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*) and the effects on seedling growth. *Pedobiologia* 44, 709–724

Atiyeh, R.M., M, Edwards, C.A., Subler, S., Metzger, J.D., 2001. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical properties and plant growth. *Bioresource Technology* 78, 11–20

Awasthi, S.K., Wong, J.W.C., Li, J., Wang, Q., Zhang, Z., Kumar, S., Awasthi, M.K., 2018. Evaluation of microbial dynamics during post-consumption food waste composting. *Bioresour. Technol.* 251, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.040>

Aynehband, A., Gorooei, A., Moezzi, A.A., 2017. ScienceDirect ScienceDirect ScienceDirect ScienceDirect ScienceDirect Vermicompost : Eco-Friendly Technology for Crop Residue Vermicompost: An September Technology for Crop Residue ScienceDirect ScienceDirect Vermicompost: An Eco-Friendly . Energy Procedia 141, 667–671. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.11.090>

Banik P, Pramanik P, Ghosh GK, Ghosal PK (2007).Changes in organic-C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under liming and microbial inoculants. Bioresource Technology, 98(13): 2485–2494.

Canellas, L. P.; Olivares, F. L. 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, (1), 1.

Canellas, L. P.; Olivares, F. L. 2017. Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. Plant and Soil, (417), 403-413. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3267-0>

Canellas, L. P. et al. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. Chemosphere, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 457–466, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.018>

Canellas, L.P.; Olivares, F.L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, v.1, p.1-11, 2014.

Caron, V.;Pereira, J.;Camargo, P. 2015. Soil Conditioners: Humic And Fulvic Acids. Produtor Rural, (58), 46

Ceritoğlu, M., Sahin, S. Erman, M. Effects of Vermicompost on Plant Growth and Soil Structure. J Agr Food Sci, (2018) 32 (3), 607-6515.

Cotta, J.A.O.; Carvalho, N.L.C.; Brum, T.S.; Rezende, M.O.O. Composting versus vermicomposting: comparison of techniques using vegetal waste, cattle manure and sawdust. Engenharia Sanitária e Ambiental, v.20, n.1, p.65-78, 2015.

Coutinho A. M. Notebook of efficient microorganisms (EM). Practical instructions on the ecological and social use of EM, 2011.

Da Silva, M., Edinger, C. MÜLLER, D. Q., Jahno, V. D.. Evaluation of the vermicomposting of *Acacia mearnsii* De Wild bark bagasse with bovine manure. Journal of Cleaner Production, [s. l.], v. 264, p. 121632, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121632>

Dominguez, J., Aira, M., Gomez-Brandon, M., 2010. Vermicomposting: earthworms enhance 536 the work of microbes. In: Insam H, Franke-Whittle H, Goberna M (eds) Microbes at work: 537 from wastes to resources. Springer, Berlin, 93–114.

Dominguez, J., Aira, M., Gomez-Brandon, M., 2010. Vermicomposting: earthworms enhance 536 the work of microbes. In: Insam H, Franke-Whittle H, Goberna M (eds) Microbes at work: 537 from wastes to resources. Springer, Berlin, 93–114

Drosos, M.; Nebbioso, A.; Mazzei, P.; Vinci, G.; Spaccini, R.; Piccolo, A. 2017. A molecular zoom into soil Humeome by a direct sequential chemical fractionation of soil. *Science of the Total Environment*, (586), 807-816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.059>

Edwards, C.A., Fletcher, K.E., 1988. Interactions between earthworms and micro-organisms in organic-matter breakdown. *Agric. Ecosystems Environ.* 24, 235±247

Egamberdieva, D. et al. Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 8, n. OCT, p. 1–14, 2017. doi: 10.3389 / fmicb.2017.02104

Elvira, C., Sampedro, L., Benítez, E., Nogales, R., 1998. Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: a pilot-scale study. *Bioresour. Technol.* 63, 205–211.

Esmailpour, B. et al. Effect of Vermicompost and Spent Mushroom Compost on the Nutrient and Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1283–1292, 2017.

Fernández-Gómez, MJ, Nogales, R., Insam, H., Romero, E., & Goberna, M. (2012). Uso de DGGE e COMPOCHIP para investigar comunidades bacterianas de vários vermicompostos produzidos a partir de diferentes resíduos em condições diferentes. *Science of The Total Environment*, 414, 664–671. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.045

Ferreira, D.F. 2011 Sisvar: a computer statistical analysis system. *Science and Agrotechnology*. 35(6): 1042.

Fishcer, T. 2017. Humic supramolecular structures have polar surfaces and unpolar cores in native soil. *Chemosphere*, (183), 437- 443. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.125>

Gasch, C.; Hildebrandt, I.; Rebbe, F.; Roske, I. (2013) Enzymatic monitoring and control of a two-phase batch digester leaching system with integrated anaerobic filter. *Energy, Sustainability and Society*, v. 3, n. 1, p. 10.

Ganjali, Amin; Kaykhail, M. Investigating the Essential Oil Composition of *Rosmarinus officinalis* Before and After Fertilizing with Vermicompost. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1413–1417, 2017.

Ganjali, A. and Kaykhail, M. 2017. Investigating the Essential Oil Composition of *Rosmarinus officinalis* Before and After Fertilizing with Vermicompost. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*. 20(5): 1413-1417.

Gupta R, Garg VK (2008) Stabilization of primary sludge during vermicomposting. *J Hazard Mater* 153(3):1023–1030. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.055>

Gupta, S.; Kaushal, R.; Sood, G. 2018. Impact of Plant Growth–Promoting Rhizobacteria on Vegetable Crop Production. *International Journal of Vegetable Science*, (24), 289-300. <https://doi.org/10.1080/19315260.2017.1407984>

Hait S, Tare V. Vermistabilization of primary sewage sludge. *Bioresour Technol.* 2011;102:2812–20.

Heidarpour, O., Esmailpour, B., Soltani, A.-A. and Khorramdel, S. 2019. Effect of Vermicompost on Essential Oil Composition of (*Satureja hortensis* L.) Under Water Stress Condition. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* v. 5026, 22(2): 484-492

Hervas, L. et al. Chemical and physico-chemical characterization of vermicomposts and their humic acid fractions. *Science of the Total Environment*, The, [s. l.], v. 81–82, n. C, p. 543–550, 1989.

Hervas, L., Mazuelos, C., Senesi, N., & Saiz-Jimenez, C. (1989). Caracterização química e físico-química de vermicompostos e suas frações de ácidos húmicos. *Science of The Total Environment*, 81-82, 543-550. doi: 10.1016 / 0048-9697 (89) 90162-9

Hossaini, S. M. et al. Effect of Vermicompost and Planting Pattern on Oil Production in *Satureja sahendica* L. under Competition with Pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 606–615, 2016.

Hu, Y. F., Zhou, G., Na, X. F., Yang, L., Nan, W. B., Liu, X., et al. (2013). Cadmium interferes with maintenance of auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings. *J. Plant Physiol.* 170, 965–975. doi: 10.1016/j.jplph.2013.02.008

Ievinsh G, Andersone-Ozola U, Zeipina S (2020) Comparison of efficiency of compost and vermicompost as soil amendments for organic production of four herb species. *Biol AgricHortic* [under review]

Ievinsh G, Vikmane M, Ķirse A, Karlsons A (2017) Effect of vermicompost extract and vermicompost-derived humic acids on seed germination and growth of industrial hemp. *ProcLatv Acad Sci B* 71:286–292

Kawahigashi, M.; Sumida, H.; Yamamoto, K. 2005. Size and shape of soil humic acids estimated by viscosity and molecular weight. *Journal of Colloid and Interface Science*, (284), 463-469. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.023>

Kiehl, E.J. Fertilizantes orgânicos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1985. 492p.

Kowalchuk, G.A., Naoumenko, Z.S., Derikx, P.J.L., Felske, A., Stephen, J.R., Arkhipchenko, I.A., 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 396–403.

Kumar, R., Verma, D., Singh, B.L., Kumar, U., 2010. Bioresource Technology Composting of sugar-cane waste by-products through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Bioresour. Technol.* 101, 6707–6711. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.111>

Kwiatkowska-Malina, J. 2018. Functions of organic matter in polluted soils: The effect of organic amendments on phytoavailability of heavy metals. *Applied Soil Ecology*, (123), 542-545. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.021>

Lima J.V.; Lobato A. K. S. Brassinosteroids improve photosystem II efficiency, gas exchange, antioxidant enzymes and growth of cowpea plants exposed to water deficit. *Physiol Mol Biol Plants*, [s.l.], v. 23, n. 1, p.59-72, jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-016-0410-y>.

López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M., Moreno, J., 2015. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresour. Technol.* 175, 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.123>

Lv, B., Zhang, D., Chen, Q., Cui, Y., 2019. Effects of earthworms on nitrogen transformation and the correspond genes (amoA and nirS) in vermicomposting of sewage sludge and rice straw. *Bioresour. Technol.* 287, 121428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121428>

Maji, D. et al. Humic acid rich vermicompost promotes plant growth by improving microbial community structure of soil as well as root nodulation and mycorrhizal colonization in the roots of *Pisum sativum*. *Applied Soil Ecology*, [s. l.], v. 110, p. 97–108, 2017. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.10.008>>

Mishra S, Wang K, Sipes BS, Tian M (2017) Suppression of root-knot nematode by vermicompost tea prepared from different curing ages of vermicompost. *Plant Dis* 101(5):734–737

Nardi, S.; Ertani, A.; Francioso, O. 2017. Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, (180), 5-13. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>

Nakasaki, K., Hirai, H., Mimoto, H., Quyen, T.N.M., Koyama, M., Takeda, K., 2019. Succession of microbial community during vigorous organic matter degradation in the primary fermentation stage of food waste composting. *Sci. Total Environ.* 671, 1237–1244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.341>

Naz I, Ahmad H, Khokhar SN, Khan K, Shah AH (2016) Impact of zinc solubilizing bacteria on zinc contents of wheat. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 16:449–454

Ndegwa PM, Thompson SA (2000). Effects of C-to-N ratio on vermicomposting of biosolids. *Bioresource Technology*, 75(1): 7-12.

Nemhauser, J.L.; Mockler, T.C.; Chor, J. 2004. Interdependency of brassinosteroid and auxin signalin in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 2: 258-268.

Nemhauser, J.L.; Mockler, T.C.; Chor, J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signalin in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*, San Francisco, v. 2, n. 9, p. 258-268, 2004.

Oswalde A (2011) Optimization of plant mineral nutrition revisited: the roles of plant requirements, nutrient interactions, and soil properties in fertilization management. *Environ Exp Biol* 9:1–8

Pathma, J., Raman, G., & Sakthivel, N. (2019). Microbioma do solo rizosférico e vermicomposto e suas aplicações na fertilidade do solo, manejo de pragas e patógenos para agricultura sustentável. *Soil Fertility Management for Sustainable Development*, 189-210. doi: 10.1007 / 978-981-13-5904-0_9

Pereira, M. M. A., Morais, L. C., Martins, A. D., Luz, J. M. Q., Pasqual, M. Oliveira, R. C. Dória, J. Challenges of organic agriculture for the production of composts and vermicompost for the production of medicinal plants- A socioeconomic demand. *Biosci. J.*, v. 36, 1, p. 71-82, 2020. <http://dx.doi.org/BJ-v36n0a2020-53565>

Pereira, M. M. A. et al. Humic Substances and Efficient Microorganisms: Elicitation of Medicinal Plants—A Review. *Journal of Agricultural Science*, v. 11, n. 7, p. 268, 2019.

Pramanik, P. et al. Changes in organic - C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under liming and microbial inoculants. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 98, n. 13, p. 2485–2494, 2007.

Ramrain, Y. I., Ansari, A. A., Ori, L. Vermicomposting of different organic materials using the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 23–36, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40093-018-0225-7>>

Ramnarain, YI, Ansari, AA, & Ori, L. (2018). Vermicompostagem de diferentes materiais orgânicos utilizando a minhoca epigéia *Eisenia foetida*. *Jornal Internacional de Reciclagem de Resíduos Orgânicos na Agricultura*, 8 (1), 23-36. doi: 10.1007 / s40093-018-0225-7

Santos, J. P.; Borges, T. S.; Silva, N. T.; Alcantara, E.; Rezende, R. M.; Freitas, A. S. Efeito de bioestimulante no desenvolvimento do feijoeiro. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 15, n. 1, p. 815-824, 2017.

Silva L., L.; Olivares, F. L.; Rodrigues, O., R.; Vega, M. R. G.; Aguiar, N. O.; Canellas, L. P. 2014. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, (1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0023-z>

Silva, F.A.S.E. and Azevedo, C.A.V. 2009. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: *WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE*, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Singh, A., Sharma, S., 2002. Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting 85, 107–111.

Song, U., Lee, E.J., 2010. Environmental and economical assessment of sewage sludge compost application on soil and plants in a landfill. *Resour. Conserv. Recycl.* 54, 1109–1116. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2010.03.005>

Shrimal P, Khan TI (2017). Studies on the effects of vermicompost on growth parameters and chlorophyll content of bengal gram (*Cicer arietinum* L.) var. RSG-896. *IOSR Journal of Environmental Science*, 11(5): 12-16.

Suhane RK (2007) Vermicompost. Publication of Rajendra Agriculture University, Pusa, p 88

Suthar, S., 2009. Vermicomposting of vegetable-market solid waste using *Eisenia fetida*: Impact of bulking material on earthworm growth and decomposition rate. *Ecol. Eng.* 35, 914–920. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.019>

Sulaiman, C. I.S. e Mohamad, A. (2020). O uso de vermiwash e extrato de vermicomposto em doenças de plantas e controle de pragas. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*, 187–201. doi: 10.1016 / b978-0-12-819304-4.00016-6

Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S. M., et al. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiol. Biochem.* 106, 236–243. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.006

Shutsrirung, A., Chromkaew, Y., Pathom-Aree, W., Choonluchanon, S., and Boonkerd, N. (2013). Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. *Soil Sci. Plant Nutr.* 59, 322–330. doi: 10.1080/00380768.2013.776935

Tun, NN, Livaja, M., Kieber, JJ, & Scherer, GFE (2008). Biossíntese de óxido nítrico (NO) induzida por zeatina em *Arabidopsis thaliana* mutantes da biossíntese de NO e de genes de sinalização de dois componentes. *New Phytologist*, 178 (3), 515-531. doi: 10.1111 / j.1469-8137.2008.02383.x

Usmani, Z., Kumar, V., Gupta, P., Gupta, G., Rani, R., & Chandra, A. (2019). Enhanced soil fertility, plant growth promotion and microbial enzymatic activities of vermicomposted fly ash. *Scientific Reports*, 9 (1): 1- 16. doi: 10.1038 / s41598-019-46821-5

Vasconcelos, A. C. P. Bioestimulantes contendo silício e micronutrientes aplicados via foliar em arroz de sequeiro. 120 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

Velmourougane, K.R.K., 2011. Chemical and microbiological changes during vermicomposting of coffee pulp using exotic (*Eudrilus eugeniae*) and native earthworm (*Perionyx ceylanesis*) species 497–507. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9422-4>

Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Benitez, E., 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresour. Technol.* 100, 1319–1326

Vijayabharathi, R., Sathya, A., and Gopalakrishnan, S. (2016). “A Renaissance in plant growth-promoting and biocontrol agents by endophytes” in *Microbial Inoculants in*

Sustainable Agricultural Productivity, eds D. P. Singh, H. B. Singh, and R. Prabha (New Delhi: Springer), 37–61. doi: 10.1007/978-81-322-2647-5_3

Wei, Z.; LI, J. Brassinosteroids Regulate Root Growth, Development, and Symbiosis. *Molecular Plant*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.86-100, jan. 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.003>.

Wu, X. et al. Brassinosteroids protect photosynthesis and antioxidant system of eggplant seedlings from high-temperature stress. *Acta Physiol. Plant.* [s.l.], v. 36, n. 2, p.251-261, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-013-1406-7>.

Zhang, H. et al. Analysis of phytohormones in vermicompost using a novel combinative sample preparation strategy of ultrasound-assisted extraction and solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, [s. l.], v. 139, p. 189–197, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.052>

Zhang,H., Tan. S. N., Teo, C. H., Yew,Y. R., Ge, L., Chen, X., Yong, J. W. H., 2015. Analysis of phytohormones in vermicomposts using a novel combinative sample preparation strategy of ultrasound-assisted extraction and solid-phase extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*. 139, 189-197.

Artigo 4

Métodos de inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) influenciam o crescimento de *Origanum vulgare* L. e a produção de óleo essencial

(Artigo estruturado nas normas da *Journal of Essential Oil Bearing Plants*)

Resumo: Objetivou-se avaliar diferentes métodos de inoculação e origem de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PRPG) nas características agrônomicas e produção de óleo essencial (OE) de *Origanum vulgare* L. (orégano) em duas épocas de corte. O experimento foi desenvolvido em campo e os tratamentos foram: testemunha sem inoculante (T1); Inoculante ambiental (T2), coletados em mata ciliar; Inoculante comercial (T3); *Bacillus subtilis* imobilizado (encapsulado) (T4) e *Bacillus subtilis* suspenso (líquido) (T5). Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos nas características agrônomicas e no rendimento de óleo essencial de orégano. A inoculação de *Bacillus subtilis* encapsulado (T4) apresentou maior rendimento de OE, com 0,0226 g OE plant⁻¹ no primeiro e 0,0752 g OE plant⁻¹ no segundo corte, seguido pela inoculação de microorganismos ambientais (T2), com rendimento de 0,0113 e 0,0481 (g OE plant⁻¹) no primeiro e segundo corte, respectivamente. Conclui-se que o método de inoculação e a origem das PRPG interferem no crescimento e rendimento do OE de orégano. O *Bacillus* inoculado pelo método encapsulado (T4) apresentou maior eficácia e qualidade. O inoculante de origem ambiental (T2), se mostrou uma ferramenta agroecológica importante e viável para agricultura familiar. A vermicompostagem mostrou-se um ótimo veículo para inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas.

Palavras chaves: *Bacillus subtilis*; microrganismo eficiente; microrganismo ambiental; EM; alginato de cálcio;

1 Introdução

Devido ao uso massivo de fertilizantes químicos sintéticos na agricultura, que poluem o ambiente e levam ao esgotamento dos recursos não renováveis, bem como o uso excessivo de combustíveis fósseis na produção, transporte e aplicação em escala, na produção de alimentos, diversos são os esforços mundiais para a formulação e validação de tecnologias sociais e tradicionais, para o cultivo/produção sustentável de alimentos e medicamentos, como a produção de plantas medicinais (Pereira et al., 2021; Esmailpour et al. 2017; Lazzari e Souza, 2017).

Neste sentido, em contrapartida aos fertilizantes químicos sintéticos, o uso de vermicompostagem e a aplicação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PRPG) têm aumentado a cada ano, por ser uma alternativa viável, de baixo custo, baixo impacto e renovável, porém ainda requer formulações específicas quanto ao uso e métodos de inoculação (Bashan et al. 2014; Malusá e Vassilev, 2014; Owen et al. 2015).

A inoculação de microrganismos endofíticos está expandindo em função da potencial ação como biocontrole de doenças fitopatogênicas, promoção de crescimento em plantas, alteração das vias metabólicas relacionadas à produção de metabólitos secundários, bem como mecanismos de alteração fenotípica e fisiológica em espécies vegetais (Pereira et al. 2019; Desaleng, 2017; Bashan, 2014).

Estudos realizados por Mohammad, et al. (2012); Fatma, et al. (2008); Rai, et al. (2017); Kwiatkowski, (2015); Ghilavizadeh et al., (2013); Akhani, et al. (2012); Tahami, et al. (2017); Bharti, et al. (2016) com aplicação de PRPG em condição de campo, constataram que a inoculação contribui para o aumento da biossíntese, absorção de nutrientes, crescimento das plantas, tolerância ao estresse abiótico, alteração no perfil fitoquímico, aumento da produção de metabólitos secundários, como cumarinas, alcaloides, fenilpropanoides e aumento no rendimento de óleos essenciais que são moléculas de interesse biológico e farmacológico, e, embora a aplicação *in vitro* para plantas medicinais seja a mais estudada, experimentos *in vivo*, em condição de campo que se aproxime da realidade do produtor rural é de extrema importância social e econômica (Pereira, 2019).

Os inoculantes (PRPG) aplicados ao solo necessitam de um veículo condutor e, nos últimos anos, o vermicomposto tem demonstrado ser um ótimo veículo inoculante para aplicação de bactérias ao solo (Kalra et al. 2010), devido ao seu potencial de substituição dos substratos tradicionalmente usados para inoculação de PRPG, como a turfa ou perlita

(Bolechowski et al., 2011), por ser uma alternativa para a substituição do adubo químico sintético no manejo nutricional (Shirin Nikou et al. 2019; Ganjali et al. 2017), por aumentar a diversidade microbiana na rizosfera (Owen et al. 2015) pela ação combinada das bactérias nativas do solo, com as presentes no vermicomposto, que pode também ser potencializado com a aplicação de inoculantes microbianos (Yada et al. 2020).

Os estudos quanto ao método de inoculação e a origem das rizobactérias promotoras de crescimento estão mais avançados para as espécies leguminosas fixadoras de nitrogênio, como é o caso da inoculação de *Bradyrhizobium* em soja, seja através do solo ou semente, na forma sólida, líquida ou turfosa (Ronsani et al., 2013; 2016), bem como pela aplicação de *Azospirillum brasiliensis* em espécies gramíneas, como milho, feijão, braquiária.

Entretanto, a utilização de PRPG inoculadas ao cultivo de espécies medicinais tem crescido exponencialmente em função dos benefícios quanto a influência na produção de óleos essenciais, crescimento, biomassa, biossíntese de metabólitos secundários, que são produtos de grande interesse farmacológico, biológico e industrial (Pereira et al. 2019; Olivares et al. 2017; Canellas et al. 2015; Bhattacharyya et al. 2012). E, atualmente, a crescente preocupação com a reciclagem dos resíduos industriais e agroalimentares, pelas crescentes quantidades de resíduos produzidos nos grandes centros, leva à necessidade de estabelecer estratégias para a sua gestão e reaproveitamento, sendo a vermicompostagem uma excelente tecnologia social para esta finalidade.

Neste sentido, de acordo com Bashan et al. (2014), os inoculantes microbianos para serem eficazes precisam apresentar características básicas como: promover o crescimento bacteriano; as células bacterianas precisam permanecer viáveis por um determinado tempo; e garantia da liberação da população bacteriana. Dentre os estudos realizados por Vassilev et al., (2015) e Reetha et al. (2014), o método mais eficaz para a introdução bacteriana no solo é o encapsulamento das células bacterianas em matrizes de gel hidrolisáveis, como é o caso do alginato, verificando redução da eficácia através da inoculação por suspensão, na forma líquida.

Para uma escala comercial de produção de alimentos ou plantas medicinais, os inoculantes precisam oferecer formas adequadas de sobrevivência para as bactérias a serem disponibilizadas para as culturas, pois é o método de inoculação, origem da PRPG e o veículo de aplicação que definem o potencial da inoculação (Owen et al., 2015; Denardin, 2006).

Outras características também afetam a viabilidade da comunidade microbiana, como tempo de armazenamento, embalagem, estirpes, condições adequadas como temperatura e umidade, data de fabricação, sendo todos esses fatores determinantes, que podem acarretar no estresse das células bacterianas (Aguilera et al. 2017), e são estes fatores que afetam o sucesso do produto comercial, configurando um grande desafio para a indústria e cooperativas de produção de inoculantes.

São escassos os estudos referentes ao método de inoculação e origem das PRPG, veículo de aplicação, além do desempenho, eficácia e viabilidade dos inoculantes (Owen et al. 2015), principalmente quando se trata da aplicação no cultivo de espécies medicinais. A partir deste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes métodos de inoculação e origem de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PRPG), nas características agrônômicas, na composição química e no rendimento de óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em duas épocas de corte.

2 Material e Métodos

O experimento foi realizado em campo. Antes do plantio de *O. vulgare* L., os três vermicompostos foram formulados e os microrganismos inoculados sendo as rizobactérias (PRPG), microrganismos (ambiental) e o comercial (Korin). Desta forma, o material e os métodos serão descritos em etapas para compreender a formulação do vermicomposto e sua aplicação no cultivo.

2.1 Formulação da vermicompostagem e inoculação dos microorganismos eficientes

O vermicomposto foi produzido no setor de Biodiesel da UFLA em duas etapas: compostagem para estabilização do material seguido de vermicompostagem. O processo de compostagem foi aplicado aos resíduos orgânicos do restaurante universitário e resíduos vegetais do paisagismo do campus, sem tratamento prévio, conduzido em blocos de alvenaria com volume de 1m³ (cada célula)

Na fase de compostagem, foram utilizadas 3 células. Uma célula foi conduzida sem inoculação de microrganismos (V1). A segunda célula foi conduzida com inoculação de microrganismo ambiental - EM (V2), capturado na mata nativa do campus da UFLA em oito pontos de acordo com a metodologia proposta por Countinho (2011). A terceira

célula foi inoculada com microrganismos comerciais (Korin) (V3) preparados de acordo com as recomendações do fabricante.

Após 90 dias, com o material ainda na fase de compostagem, no início da fase de maturação, foi adicionado esterco de gado e minhoca vermelha da Califórnia (*Eisenia fétida*) em cada célula para iniciar a fase de vermicompostagem do material compostado, permanecendo por mais 60 dias em blocos de alvenaria para biotransformação e plena maturação do vermicomposto.

Após a biotransformação dos materiais, foram coletadas 10 amostras simples, que foram homogeneizadas, formando uma amostra composta por tratamento, e foram encaminhadas para o Laboratório Plantsphere no Equador, para realizar a análise química. Os vermicompostos no momento da coleta das amostras, sem o peneiramento, apresentavam as seguintes características: bio-oxidação e temperatura – estável; coloração - marrom escuro e odor: humificado.

Em sequência a estabilização, os vermicompostos foram acondicionados em sacos de microfibra, respeitando as inoculações e encaminhado para a área de plantio. No campo, o vermicomposto puro (sem inoculação V1) foi separado, fracionado e utilizado como veículo para a inoculação de rizobactérias *Bacillus subtilis*, população de 10^9 UFC, em dois métodos, na forma imobilizada (inerte em cápsulas de alginato) (T4) e suspensa (líquido) (T5). Perfazendo por fim cinco tratamentos aplicados em campo (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos aplicados no experiment de campo

| Tratamento | Código |
|--|---------------|
| Solo (controle) | T1 |
| Inoculante ambiental | T2 |
| Inoculante comercial | T3 |
| Inoculante de <i>Bacillus subtilis</i> imobilizado (encapsulado) | T4 |
| Inoculante <i>Bacillus subtilis</i> suspenso (líquido) | T5 |

As características físico-químicas das três formulações de vermicompostagem foram realizadas de acordo com a metodologia do Laboratório Plantsphere no Equador, sob a responsabilidade do Phd. Carlos Falconi Borja, e seus valores podem ser evidenciados na tabela 2.

Tabela 2. Análise das características química dos macronutrients and micronutrients dos veículos inoculantes vermicomposto puro (V1), vermicomposto ambiental (V2) e vermicomposto comercial (V3).

| Características Físico-Químicas | | | | | | | |
|---------------------------------|-----|---------|-------------|------------------------|--------------------------|-----------|--|
| | pH | Density | Elect. Cap. | mSL m cm ⁻¹ | Org. M. % (Total Carbon) | C/N Ratio | |
| V1 | 7,1 | 0,44 | 6,24 | | 28,67 | 19,11 | |
| V2 | 7,0 | 0,46 | 7,17 | | 31,33 | 17,41 | |
| V3 | 6,7 | 0,45 | 5,83 | | 28,67 | 18,00 | |

| Macronutrientes | | | | | | | |
|-----------------|------|------|------|------|-----|------|---------|
| -----%----- | | | | | | | |
| | P | K | Ca | Mg | Na | S | Total N |
| V1 | 2,94 | 1,83 | 7,30 | 0,71 | 0,1 | 0,40 | 1,5 |
| V2 | 2,38 | 1,82 | 8,80 | 0,88 | 0,9 | 0,25 | 1,8 |
| V3 | 2,61 | 1,39 | 6,53 | 0,65 | 0,7 | 0,33 | 1,6 |

| Micronutrientes | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----|-------|--------|--------|------|------|-----|-------|
| -----mg L ⁻¹ ----- | | | | | | | | |
| | Fe | Cu | Mn | Zn | B | Mo | Co | Si |
| V1 | 1,1 | 39,33 | 241,33 | 166 | 0,11 | 0,20 | 0,1 | 11,00 |
| V2 | 1,8 | 37,33 | 206,33 | 229 | 0,06 | 0,17 | 0,1 | 10,33 |
| V3 | 1,3 | 27,33 | 257,33 | 173,67 | 0,38 | 0,12 | 0,1 | 9,83 |

2.1.1 Imobilização e suspensão de *Bacillus subtilis*

A amostra de *Bacillus subtilis* foi inoculada em placa de Petri em meio sólido preparado com 5 g L⁻¹ de peptona, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura e 15 g L⁻¹ de ágar, contendo bactérias a uma densidade populacional de aproximadamente 10¹ UFC/ml. Na seqüência, foi preparado o caldo de nutrientes (5 g L⁻¹ peptona, 3 g L⁻¹ de extrato de carne e 5 g L⁻¹ NaCl) e realizada a suspensão seriada, dividida em 4 recipientes, até atingir a quantidade e população necessário para a inoculação em campo de 10⁹ UFC.

Para imobilização (encapsulamento), a solução de suspensão de bactérias de *Bacillus subtilis* com uma densidade populacional de aproximadamente 10⁹ UFC foi misturada em solução de alginato de sódio a uma concentração de 1%. Após a mistura, a solução do composto foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,1 M, resultando assim em esferas com inóculo microbiano encapsulado. As esferas foram lavadas com água destilada com auxílio de uma peneira e armazenadas.

2.1.2 Condução em Campo

Após a formulação dos três vermicompostos, o experimento foi conduzido em campo na área experimental do setor de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob a coordenada geográfica Lat. -21,223062 e Long. -

44,972369. A excisata de *O. vulgare* L. foi depositada no herbário da ESAL/ UFLA, sob o registro n°. 22.156.

As mudas foram obtidas a partir de estacas apicais de plantas matrizes do Horto de Plantas Medicinais da UFLA e enraizadas em bandejas de polipropileno expandido de 128 células. Após 30 dias, com solo previamente analisado (Tabela 3), as mudas foram transplantadas para o campo, e conduzidas em delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema de parcela subdividida, com cinco tratamentos, três repetições e dezoito plantas por parcela, no espaçamento de 0,25x 0,25 cm, em duas épocas de corte.

Table 3. Análise química do solo usado no experimento

| K | P | S | Zn | Fe | Mn |
|-----------------------------------|------------------|------------------|---------------------------------|-------|------|
| -----mg dm ⁻³ ----- | | | | | |
| 2.55 | 0.47 | 3.06 | 0.47 | 29.89 | 0.47 |
| Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | Al ³⁺ | P-Rem | O.M. | pH |
| -----cmolc dm ⁻³ ----- | | | -----dag kg ⁻¹ ----- | | |
| 0.27 | 0.10 | 0.04 | 14.97 | 0.73 | 5.4 |
| H+Al | SB | CEC | M | V | Cu |
| -----cmolc dm ⁻³ ----- | | | -----%----- | | |
| 1.54 | 0.38 | 1.92 | 9.52 | 19.61 | 1.41 |
| ----- | | | | | |
| B (%) | | | | | |
| 0.01 | | | | | |

O.M.: soil organic matter; SB: sum of bases; m: aluminum saturation index; V: base saturation index; CEC: cation exchange capacity at ph 7.0; P-Rem: remaining phosphorus.

4.1.4. Comprimento da planta e pigmentos fotossintetizantes

A variável comprimento da planta foi avaliada a cada 15 dias com auxílio de fita métrica, 15 dias após o transplântio no primeiro ciclo e 15 dias após a brotação no segundo ciclo. No final de cada ciclo, antes da época de corte, as folhas frescas foram coletadas para realizar a análise de pigmentos fotossintetizantes.

Os pigmentos fotossintetizantes foram extraídos e analisados com base no método descrito por Scopel et al. (2011). As folhas frescas ($\pm 0,050$ g) de orégano foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de acetona 80% para extração de pigmentos fotossintéticos. Os tubos de ensaio foram envoltos por papel alumínio a fim de se evitar o contato da amostra com a luz e impedir a degradação dos pigmentos. Após 24 horas em geladeira à ± 4 °C, mensurou-se a absorvidade das amostras em espectrofotômetro Elisa Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) nos comprimentos de onda 470, 645, 652 e 663 nm.

Para a determinação dos teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides foram utilizadas equações propostas por Lichtenthaler e Wellburn (1983) e Zhang et al. (2009). As leituras dos comprimentos de onda foram realizadas em triplicada, utilizando-se 3 repetições por tratamento. A análise foi realizada por meio do programa Skanit Software 5.0 for Microplate Readers RE versão 5.0.0.42.

$$\text{Clorofila a 649} = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Clorofila b 665} = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoides 480} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times Ca - 53,78 \times Cb) / 220$$

$$\text{Clorofila Total} = (\text{Clorofila a 649} + \text{Clorofila b 665})$$

2.1.3 Biomassa fresca e seca

As hastes das plantas foram cortados a 5 cm do solo após 95 dias de plantio, quando as primeiras plantas iniciaram a fase de floração. Após o corte as plantas foram pesadas para obtenção da biomassa fresca da parte aérea, em ambas as estações, verão (primeiro corte) e outono (segundo corte). No primeiro e segundo corte foram colhidos, respectivamente, 3,7 e 7,5 kg de biomassa fresca no total, variando as quantidades de acordo com cada tratamento. Ocasionalmente, o material foi fracionado, alocado em sacos de papel kraft e levado a uma estufa de circulação forçada de ar a 30 °C até massa constante, onde foi pesado novamente para obtenção da biomassa seca da parte aérea.

2.1.4 Extração de óleo essencial

As hastes das plantas foram cortadas a 5 cm do solo após 95 dias de plantio, quando as primeiras plantas iniciaram a fase de floração. Procedimento realizado no primeiro e no segundo corte, para obtenção da biomassa fresca, cuja as quantidades variaram de acordo com cada tratamento. Ocasionalmente posterior a colheita, o material foi fracionado, alocado em sacos de papel kraft e levados à estufa de circulação forçada de ar a 30 °C até massa constante, obtendo assim a biomassa seca da parte aérea (g).

Para as extrações de óleo essencial (OE), a biomassa seca da parte aérea foi cortada em pequenos pedaços, pesada e colocada em um balão volumétrico de fundo redondo de 5 L. Em seguida, foi adicionada água deionizada ao balão até submergir o material vegetal, alocados sob a manta térmica e submetidos à hidrodestilação por 3h com aparelho tipo Clevenger, cujo procedimento foi repetido três vezes. Após a extração, o

óleo essencial foi seco com Na₂SO₄ anidro e acondicionados em potes de vidro que foram armazenados a uma temperatura inferior a 0 °C.

2.1.5 Cromatografia gasosa - análise de espectrometria de massa

A análise de cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) foi realizada em um equipamento Shimadzu GC-MS QP2010, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno), com fase estacionária RTX®-5MS (filme de 0,25 µm espessura). O gás de arraste foi o hélio, com fluxo de 1,0 mL / minuto. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, com varredura de 45 a 400 (m/z), e 1 µL da solução de óleo preparada, utilizando acetona como solvente, foi injetado na concentração de 10 mg / L, utilizando uma razão de 1:20, a temperatura inicial da coluna foi de 60 °C com programação para aumentar 2 °C por minuto até atingir a temperatura de 200 °C, e 5 °C por minuto até atingir a temperatura máxima de 250 °C. Como padrão externo, foi utilizada uma mistura de alcanos lineares (C9-C17). A porcentagem relativa de cada composto foi calculada usando a razão entre a área de cada pico e a área total de todos os constituintes da amostra.

Os índices aritméticos foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$AI_{(X)} = 100_{Pz} + 100 \left[\frac{\{RT_{(X)} - RT_{(Pz)}\}}{\{RT_{(Pz+1)} - RT_{(Pz)}\}} \right]$$

Onde: X: composto de interesse; Pz: número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção antes do tempo de retenção do composto X; RT (x): tempo de retenção do composto X; RT (Pz): é o tempo de retenção do composto de Pz; RT (Pz + 1): tempo de retenção de hidrocarbonetos com tempo de retenção após o tempo de retenção do composto X.

2.1.6 Análise estatística

Para comparar os resultados, os testes de homocedasticidade e normalidade foram previamente realizados pelo software ASSISTAT (SILVA, 2009). Em seguida, foi realizado a análise de variância dos dados, pelo teste F, utilizando o programa estatístico (SISVAR) e aplicado o teste de médias de Scott-Knott (FERREIRA, 2011). E a análise dos componentes principais (PCA) pelo software R (R Core Team, 2019).

3 Resultados

3.1 Características agronômicas: Análise de crescimento

O comprimento médio das plantas (PL) registrado para cada tratamento durante um período de 90 dias, com intervalos de 15 dias entre as avaliações, para as duas épocas de corte, não apresentou interação significativa com o método de inoculação (**Tabela 4**). Em média, o comprimento das plantas variou entre 7,29 cm e 10,42 cm, em tratamentos sem inoculação de PRPG (solo T1) e com inoculação de *Bacillus* imobilizado (T4). No entanto, comparando as duas épocas de corte, no verão e no outono, verifica-se diferença significativa no comprimento das plantas que, de modo em geral, com exceção da testemunha (T1), as plantas tiveram maior comprimento médio quando o corte foi realizado no outono, variando de 9,25 cm e 14,89 cm, com diferença de 2 a 4 cm de uma época de corte para a outra.

Para a produção de biomassa fresca (FB) não houve diferença estatística quanto ao método de inoculação de PRPG no cultivo de *O. vulgare* L., porém verifica-se diferenças significativas quanto a época de corte. O maior incremento na produção pode ser evidenciado para a inoculação de vermicompost inoculated with *Bacillus subtilis* immobilized (T4) in the summer (337,50 g/m²) e (430,00 g/m²) no autumn em relação a testemunha soil (T1) com (57,50 g/m²) e (260,00 g/m²), respectivamente.

A produção de biomassa seca da parte aérea (DB) (Tabela 4) foi significativamente afetada pelos métodos de inoculação de rizobactérias e época de corte da parte aérea, apresentando interação significativa quanto aos fatores avaliados, ou seja, os fatores atuam de forma dependente na variável resposta. Sendo constatado maior acúmulo de biomassa seca (DB) para vermicompost inoculated with *Bacillus subtilis* immobilized (T4), com produção de (84,00 g/m²) no verão e (285,00 g/m²) no outono.

De modo em geral o corte realizado no outono promoveu incremento na produção de biomassa seca da parte aérea de *O. vulgare* L em relação a biomassa seca produzida no verão. Porém, avaliando os métodos de inoculação para o corte realizado no verão, observa-se que a inoculação com *Bacillus subtilis* induziu maior produção de DB, com melhores resultados quando aplicado na forma imobilizada (84,00 g/m²), seguida pela inoculação na forma líquida (62,66 g/m²).

Quando o corte foi realizado no outono, verifica-se que todos os métodos de inoculação promoveram incremento na produção de (DB) comparado à testemunha (T1), porém quando o *Bacillus subtilis* foi inoculado na forma líquida (T5), mesmo com o

aumento superior a 200% em relação ao corte no verão, este método de inoculação para o corte realizado no outono foi inferior aos métodos inoculação ambiental (T2), inoculante comercial (T3) e inoculação de *Bacillus subtilis* na forma suspensa (T4). De modo geral é possível inferir que a inoculação de *Bacillus subtilis* pelo método imobilizado (capsule) (T4) promoveu a maior produção de biomassa fresca e seca da parte aérea.

Tabela 4. Atributos de crescimento: comprimento médio (cm) (PL), biomassa fresca (g/m²) (FB) e biomassa seca (g/m²) (DB) da parte aérea, influenciados pelo método de inoculação de PRPG em duas épocas de corte, no verão e no outono.

| Tratamento | Biomassa Fresca | | | | Biomassa Seca | | | | Comprimento | | | |
|------------|------------------|----|--------|----|---------------|----|--------|----|-------------|----|--------|----|
| | g/m ² | | | | | | | | cm | | | |
| | Verão | | Outono | | Verão | | Outono | | Verão | | Outono | |
| T1 | 57.50 | aA | 260.00 | aB | 26.66 | aA | 147.50 | aB | 7.290 | aA | 9.258 | aB |
| T2 | 130.00 | bA | 351.66 | bB | 43.33 | aA | 232.50 | cB | 9.566 | aA | 13.626 | bB |
| T3 | 155.00 | bA | 355.00 | bB | 33.33 | aA | 261.66 | dB | 8.498 | aA | 12.284 | bB |
| T4 | 337.50 | cA | 430.00 | cB | 84.00 | cA | 285.00 | eB | 10.424 | aA | 14.891 | bB |
| T5 | 182.50 | bA | 303.33 | bB | 62.66 | bA | 168.33 | bB | 9.624 | aA | 14.051 | bB |

Tratamentos seguidos de letras iguais, sendo minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem significativamente pelo teste de médias Scott-Knoot a $p < 0.05\%$. Legenda: Tratamentos: T1 - Solo; T2 - vermicompostagem com inoculante ambiental; T3 - vermicompostagem com inoculante comercial; T4 - vermicomposto + inoculante imobilizado de *Bacillus subtilis* (cápsula); T5 - vermicomposto + inoculante suspenso de *Bacillus subtilis* (líquido).



Figura 1. Plantas de *Origanum vulgare* L. cultivadas sob a influência de diferentes métodos de inoculação e origem de PRPG no corte do outono

3.2 Análise de pigmentos fotossintetizantes

Em aspecto geral, apenas a inoculação de *Bacillus* pelo método (suspenso) (T5), não apresentou diferença significativa na produção de pigmentos fotossintéticos em relação a testemunha solo (T1). Os demais tratamentos, embora apresentem diferença nos

teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides, em relação a (T1), não apresentam diferença estatística entre si (Tabela 5). Quanto a época de corte, os maiores teores para todas as características foram observados quando o corte foi realizado no verão.

A diferença no teor de pigmentos fotossintetizantes em função da época de corte, pode ser relacionada com o período a qual as espécies foram conduzidas em campo. O crescimento e desenvolvimento do orégano para o (corte 1) foi na estação do verão, época de maior fotoperíodo e incidência solar, em comparação ao outono, e como o orégano é uma espécie do mediterrâneo, a maior incidência de radiação neste período, pode ter influenciado as maiores taxas fotossintéticas (Nikou et al., 2019).

A clorofila “a” é o pigmento mais utilizado na fase fotoquímica, porém a clorofila *b* e os carotenoides, pigmentos acessórios, também auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia para os centros de reação nos fotossistemas, para efetivação da fotossíntese (Streit, 2005; Kraus, 2006). No entanto, as estruturas químicas destes pigmentos são consideradas instáveis e facilmente degradadas quando expostas a fatores ambientais adversos.

Abd El-Hadi et al. (2009) através da inoculação de cepas ambientais de *Azospirillum lipoferum* ou/e *Azotobacter chroococcum*, aplicadas pelo método suspenso, observaram maiores teores de clorofila no primeiro corte em relação ao segundo, e que a inoculação de PRPG promoveu maior teor de pigmentos fotossintetizantes em comparação a testemunha.

Corrêa et al., (2010) avaliaram a influência da fertilização orgânica no cultivo de *O. vulgare* e observaram maior clorofila *a*, *b* e clorofila total em plantas fertilizadas organicamente do que no controle (sem fertilização). Vafadar (2014) estudando bactérias promotoras de crescimento em plantas em sinergia a fungos micorrízicos em *Stevia rebaudiana*, também constataram influência dos tratamentos no conteúdo de clorofila. Bem como Mohsen et al. (2016), constatou diferença nos teores de clorofila (*a* e *b*) e carotenóides para *Calendula officinalis* L.

Tabela 5. Average of chlorophylls *a*, *b*, total and carotenoids of the species *O. vulgare* L. grown under the influence of métodos de inoculação de PRPG

| Inoculante | Clorofila a | | Clorofila b | | Clorofila total | | Carotenóides | |
|------------|---|---------|--------------------|---------|------------------------|---------|--------------|---------|
| | ----- mg g ⁻¹ folha fresca ----- | | | | | | | |
| | Verão | Outono | Verão | Outono | Verão | Outono | Verão | Outono |
| T1 | 0.13 | aA 0.06 | aA 0.08 | aA 0.01 | aA 0.08 | aA 0.04 | aA 0.13 | aA 0.01 |
| T2 | 0.38 | bB 0.03 | aA 0.17 | bB 0.02 | aA 0.18 | bB 0.04 | aA 0.23 | bB 0.02 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|
| T3 | 0.39 | bB | 0.02 | aA | 0.18 | bB | 0.02 | aA | 0.21 | bB | 0.06 | aA | 0.30 | bB | 0.01 | aA |
| T4 | 0.33 | bB | 0.03 | aA | 0.13 | bB | 0.02 | aA | 0.17 | bB | 0.06 | aA | 0.38 | bB | 0.02 | aA |
| T5 | 0.23 | aB | 0.04 | aA | 0.08 | aA | 0.01 | aA | 0.11 | aA | 0.06 | aA | 0.19 | aB | 0.02 | aA |

Tratamentos seguidos de letras iguais, sendo minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem significativamente pelo teste de médias Scoot-Knoot a $p < 0.05\%$.

3.3 Análise do rendimento de óleo essencial

A Figura 2, mostra que o rendimento (g de EO planta⁻¹) de óleo essencial (EO) de *O. vulgare* L quando submetido a diferentes métodos de inoculação de PRPG em duas épocas de corte, apresentam interação e diferença estatística significativa.

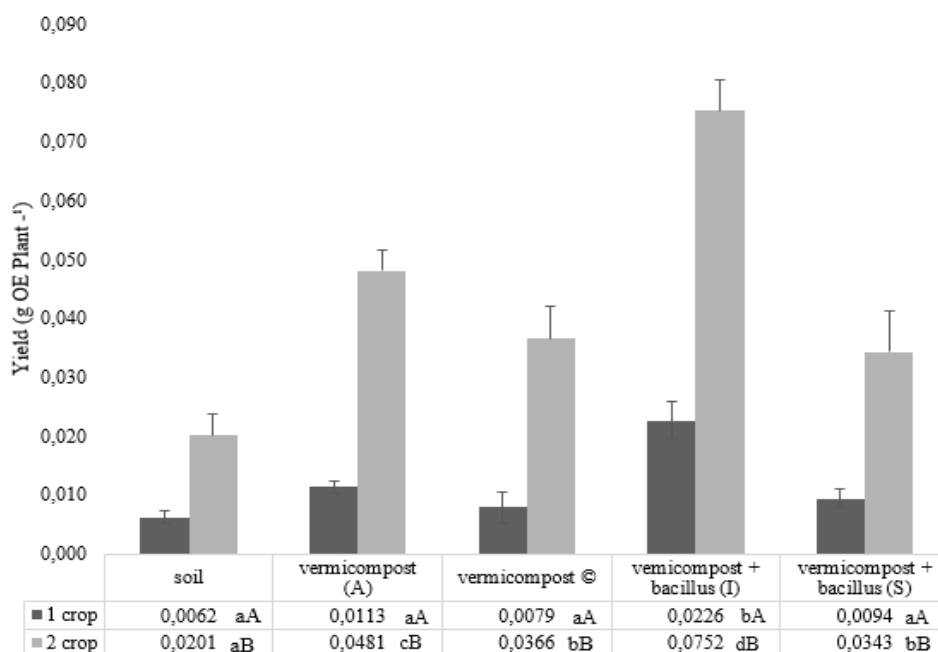


Figure 2. Rendimento (g / planta¹) de óleo essencial de *Origanum vulgare* L. no primeiro corte (verão) e segundo corte (outono). submetidas a diferentes manejos nutricionais no campo. quanto à forma e origem de aplicação de microrganismos promotores de crescimento.

O maior rendimento de óleo essencial (OE) foi obtido quando o *Origanum vulgare* L. foi submetido a aplicação do vermicomposto inoculado com *Bacillus subtilis* imobilizado (T4), com rendimentos de 0,0226 (g OE plant⁻¹) e 0,0752 (g OE plant⁻¹) no primeiro e segundo corte, respectivamente. Para a aplicação de vermicomposto inoculado com microrganismos ambientais (T2), o rendimento de OE aumentou no segundo corte, em relação ao primeiro de 0,0113 (g OE plant⁻¹) para 0,0481 (g OE plant⁻¹). Verifica-se

em relação a testemunha soil (T1) que o método de inoculação com aplicação de vermicompostagem inoculado com microrganismos, potencializou o rendimento de óleo essencial do orégano.

Neste sentido, já se tem vários estudos que apontam como o rendimento de óleo essencial podem ser influenciados pelas características edafoclimáticas, como clima, altitude, manejo nutricional, sazonalidade, fatores bióticos e abióticos (Luz et al., 2014; Paulus et al., 2013). No entanto, o foco de análise desta pesquisa foi a avaliação do rendimento do óleo essencial quanto ao método de inoculação e origem de PRPG o veículo de aplicação do inoculante, se de forma líquida ou sólida, bem como a origem do microrganismo, seja o isolado de *Bacillus subtilis*; a comunidade microbiana coletada na mata ciliar e uma formulação comercial de microrganismos promotores de crescimento, em relação a testemunha solo.

Existe diferença significativa no rendimento de óleo essencial (OE), variando de 16% a 34% em relação aos métodos de inoculação de PRGP, com aumentos na produção que variam de 50% a 70%, em função do método de inoculação e origem da PRPG. Para aplicação do inoculante *Bacillus subtilis* (bacillus), é observado que o microrganismo imobilizado em cápsulas de alginato (T4), na forma inerte, é mais eficaz para a produção de OE com produção de 34% e 39% (1º e 2º corte), em relação ao suspenso (T5), com produção de 16% de OE. O que contribuiu para o aumento de 50% no rendimento de OE de um método de inoculação para o outro, independente da época de corte.

Em relação a origem do microrganismo, se de forma comercial (T3) ou ambiental (T2), através da coleta na mata ciliar, o inoculante ambiental proporcionou maior rendimento de OE com produção de 0,0113 (g OE plant⁻¹) e 0,0481 (g OE plant⁻¹) (T2) e 0,0079 (g OE plant⁻¹) e 0,0366 (g OE plant⁻¹) (T3), no primeiro e segundo corte, respectivamente, ficando seu rendimento abaixo somente da aplicação do inoculante *Bacillus subtilis* imobilizado (T4). O conhecimento quanto as formas de aplicação e a origem dos microrganismos promotores de crescimento em plantas medicinais, é de fundamental importância, pois influenciam significativamente na resposta da cultura quanto a produção de óleo essencial.

Neste sentido, um dos menores rendimentos de óleo essencial foi evidenciado na aplicação do inoculante comercial (T3), que pode ser explicado em função da redução da população microbiana presente no produto envasado. Embora o mesmo seja ativado para o uso de acordo com as prescrições do fabricante, pressupondo a reativação dos microrganismo e posterior multiplicação, verifica-se baixa eficiência do inoculante

comercial, que pode ser em função da formulação, acondicionamento, dentre outros fatores ambientais que podem afetar a qualidade e eficácia do produto comercial.

Para o inoculante ambiental (T2), cuja origem se deu pela coleta dos microrganismos na mata ciliar, verifica-se eficiência no rendimento de OE, este fator pode ser relacionado com a diversidade da comunidade microbiológica coletada, multiplicada e reaplicada através do veículo de inoculação vermicomposto. Estudos constataam que a captura de microrganismos ambientais é uma ferramenta potencial para agricultura familiar, melhorando a qualidade do substrato orgânico a ser utilizado para o cultivo de espécies vegetais.

Em relação à inoculação do *Bacillus subtilis* pelo método suspenso (líquida) (T5) e imobilizado (encapsulado) (T4), verifica-se que quando o microrganismo é imobilizado em cápsulas de alginato, o material inerte possibilita uma liberação mais lenta e gradual da rizobactéria, e como ela possui endósporos, estruturas de resistência para a colonização da rizosfera, sua população pode ter aumentado gradativamente em função da liberação/dissolução lenta do material envolto ao microrganismo. Bem como, a presença de matéria orgânica no solo, a partir da aplicação do vermicomposto puro (V3) também rico em *Bacillus*, assegura um ambiente propício para a vida/atividade dos microrganismos presentes no solo, no vermicomposto e potencializados a partir da inoculação do *Bacillus*.

Em contrapartida, para a forma suspensa (T5), o rendimento do OE é inferior ao imobilizado (T4). Porém, não se sabe ao certo se este fator se deve a “lixiviação” dos microrganismos ao longo do perfil do solo, assim como ocorre para os nutrientes, o que acarreta em redução da população na rizosfera ou se devido ao local de aplicação, pois como os microrganismos apresentam baixa mobilidade no solo, o método de aplicação pode estar dificultando a colonização da rizosfera pela bactéria.

4 Análise das Componentes Principais (PCA)

4.1 Constituintes Majoritários

A análise de componentes principais foi realizada para explicar a relação entre os diferentes métodos de inoculação de microrganismos promotores de crescimento (PRPG), em duas estações de corte (verão e outono) e os constituintes majoritários do óleo essencial de orégano.

Segundo o critério de Kaiser, que considera apenas o uso dos componentes que apresentam um autovalor maior que um, apenas os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) foram utilizados (Tabela 6). Pois esses dois componentes juntos explicam

80,09% da variação total, sendo adequado para explicar a relação entre os métodos de inoculação e os constituintes majoritários nas duas épocas de corte.

O primeiro componente principal (PC1 - Figura 3) explica 51,24% da variância total com fortes carregamentos positivos ($> 0,7$) no Sabinene, Terpinene, e gama-Terpineno, carga negativa forte ($< -0,7$) no hidrato de trans-Sabinene, e carga negativa moderada ($< -0,5$) em Carvacrol. Maiores concentrações de Sabinene, Terpinene, e gama-Terpineno foram observados no óleo essencial (OE) de orégano sem tratamento (T1) e no OE de orégano tratados com vermicomposto com inoculante comercial (T3) ou com vermicomposto inoculado com *Bacillus subtilis* imobilizado (T4) no verão. Maiores concentrações de hidrato de trans-Sabinene e Carvacrol foram observadas no OE de plantas de orégano tratadas com vermicomposto inoculado com *Bacillus subtilis* imobilizado (T4) no outono e com vermicomposto com a aplicação de *Bacillus subtilis* na forma suspensa (T5) no verão.

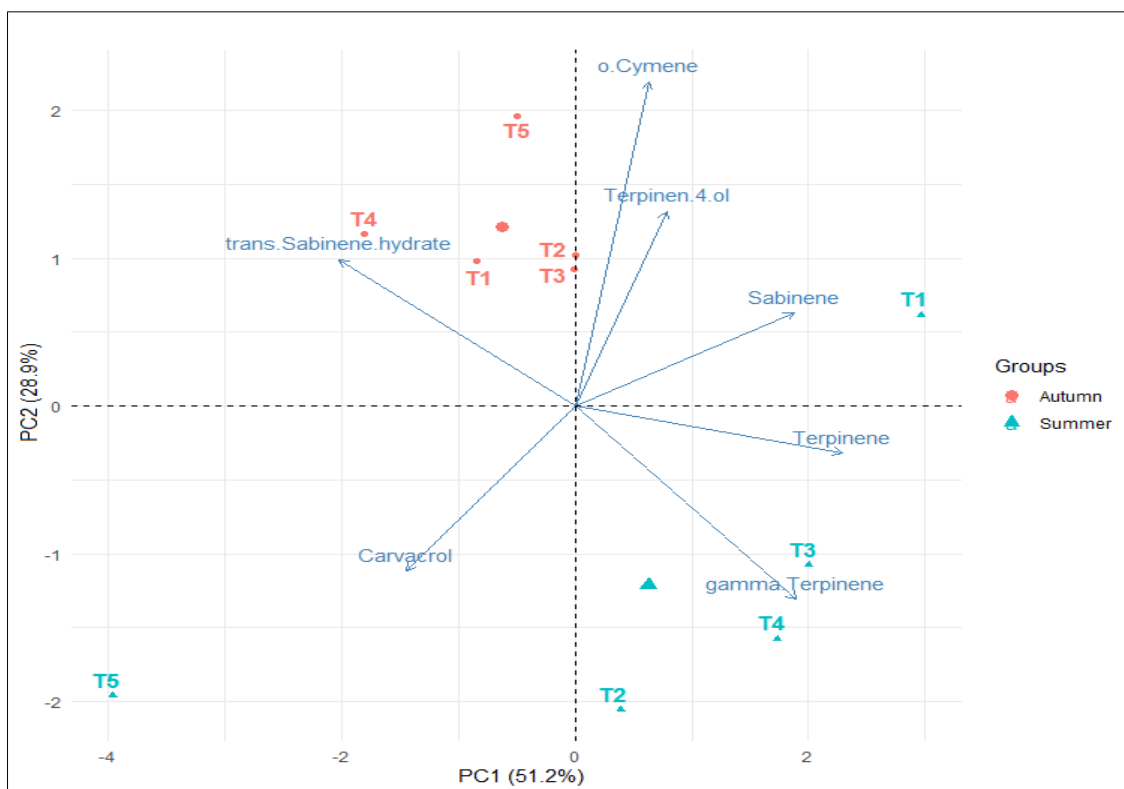


Figura 3. Biplot dos dois primeiros componentes principais PC1 e PC2 com os tratamentos agrupados de acordo com a época de corte (verão e outono). Tratamentos: T1 - Solo; T2 - vermicompostagem com inoculante ambiental; T3 - vermicompostagem com inoculante comercial; T4 - vermicomposto + inoculante imobilizado de *Bacillus subtilis* (cápsula); T5 - vermicomposto + inoculante suspenso de *Bacillus subtilis* (líquido).

O segundo componente principal (PC2) explica 28,85% da variância total com um forte carregamento positivo ($> 0,7$) em *o*-Cymene, carga positiva moderada ($> 0,5$) em Terpinen-4-ol, e carga negativa moderada ($< -0,5$) em gama-Terpineno. Maiores concentrações de *o*-Cymene foram observadas no óleo essencial (OE) de plantas de orégano em vermicomposto com a aplicação de *Bacillus subtilis* na forma suspensa (T5) no outono. Maiores concentrações de Terpinen-4-ol foram observadas em todos os tratamentos no outono. Maiores concentrações de gama-Terpineno foram observadas no OE de plantas de orégano tratadas com vermicomposto com inoculante comercial (T3) ou com vermicomposto inoculado com *Bacillus subtilis* imobilizado (T4) no verão.

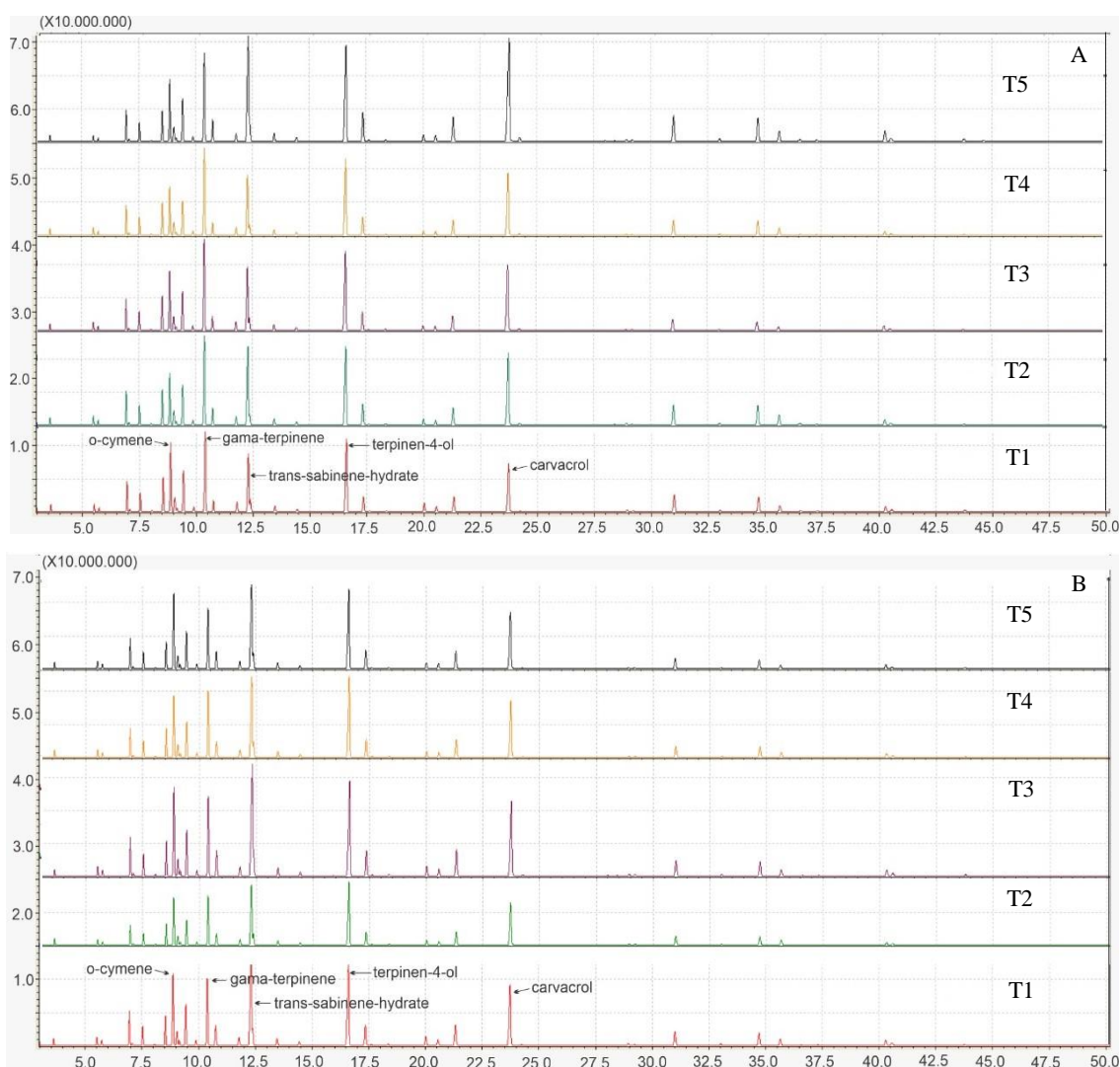


Figure 4. Cromatograma do perfil fitoquímico do óleo essencial em *Origanum vulgare* L. no primeiro corte A (verão) e segundo corte B (outono), submetido a diferentes métodos de inoculação de PRPG.

5 Discussão

5.1 Métodos de inoculação e origem das PRPG

Estudos quanto ao método de inoculação e origem de das rizobactérias promotoras de crescimento (PRPG) está mais avançada para as espécies leguminosas fixadoras de nitrogênio. Em estudos realizados por Ronsani et al., (2013), as diferenças quanto a nodulação do sistema radicular por *Bradyrhizobium* está relacionado ao método de inoculação (líquida ou turfosa), a qual constataram que a inoculação turfosa por não ser tão volátil como a líquida, pode aumentar a estabilidade de permanência da bactéria no solo, devido a proteção das bactérias oferecidas pelo inoculante, contribuindo para a sustentação da viabilidade bacteriana.

O método de inoculação no sulco de semeadura, proporcionou produtividade superior a inoculação tradicional nas sementes este resultado contribui para a compreensão quanto a localização para a aplicação dos inoculantes em relação a eficiência de colonização e atividade simbiótica planta – microrganismo. A inoculação na semeadura (sulco de plantio), também contribui para o manejo e plantio, bem como, a melhor resposta das plantas ao inoculante se dá quando as bactérias estão espacialmente próximas ao sistema radicular, nas primeiras semanas de desenvolvimento (Hirsch et al., 2003; Schuh et al., 2005).

De acordo com Bashan et al. (2014) os inoculantes para serem eficazes precisam apresentar características básicas como: promover o crescimento bacteriano; as células precisam permanecer viáveis por um determinado tempo; e garantir a liberação da população bacteriana. Dentre os estudos realizados por Vassilev et al., (2015); Reetha et al., (2014), o método mais eficaz para a introdução bacteriana no solo é o encapsulamento das células bacterianas em matrizes de gel hidrolisáveis, como é o caso do alginato de sódio/cálcio, que pode aumentar a taxa de sobrevivência e manutenção das células viáveis, devido a sua degradação lenta no ambiente, acarretando em liberação lenta das bactérias sem causar estresse ao ecossistema.

O alginato utilizado no encapsulamento de *Bacillus subtilis* no método de inoculação (T4), são gomas naturais, não tóxicas, compostas de extrato de algas marinhas, que é um copolímero de a-L-guluronate e a-D-mannuronate capaz de formar géis estáveis biodegradáveis, formado por polissacarídeos (Schuh, 2005; Papageorgiou, 2006). E por hidratarem-se facilmente são muito utilizados na indústria para a imobilização de células na forma de esferas.

Sendo assim, quando utilizados na imobilização de microrganismos a serem aplicados na forma inerte, oferecem várias vantagens quanto a proteção do microrganismo a ser liberado na rizosfera da planta. Carvalho, (2005) estudando a esporulação e fisiologia do *Bacillus subtilis*, observou que a presença de meios contendo fontes de carbono como glucose, favorecem a produção de compostos bioativos por *B. subtilis*. Os fatores supracitados acima podem ser correlacionados a eficiência de inoculação do *Bacillus* encapsulado (T4) que influenciou de forma significativa para o aumento na produção de biomassa seca e no rendimento de OE de orégano.

Outro fator observado, é que quando as bactérias não estão protegidas por biopolímeros, por exemplo, quando são aplicadas ao solo na forma líquida, em função da não proteção oferecida pelo encapsulamento das células bacterianas, pode ocorrer predação da microfauna do solo, onde as bactérias podem competir com a microflora nativa para se adaptar e suportar a predação, ou seja, o bioinoculante (alginato) fornece um microambiente adequado, combinado a proteção física para a introdução da bactéria (PRPG) no solo (Reetha et al., 2014; Bashan, 2014), contribuindo no desenvolvimento da planta e resultando em maior rendimento de óleo essencial (Figura 1.).

Tal fator pode ser comparado ao uso recorrente de turfa como veículo inoculante comercial para a cultura da soja, já que ela oferece proteção a bactéria contra o ressecamento e favorece a multiplicação e sobrevivência do rizóbio (Denardin, 2006). Para a eficácia da aplicação de inoculantes comerciais, outras características que afetam a viabilidade da comunidade microbiana devem ser consideradas, como: o tempo de armazenamento, embalagem, estirpes, condições adequadas como temperatura e umidade, data de fabricação, todos fatores determinantes, que podem acarretar no estresse das células bacterianas (Aguilera et al., 2017).

Quanto ao método de inoculação comercial (T3) em Orégano, o rendimento de OE foi 14% menor, em relação ao inoculante ambiental (T2), esta diferença pode ser em função da redução da taxa de colonização e população microbiana presente no produto comercial, corroborando com as pesquisas realizadas por (Corkidi et al., 2004, Tarbell; Koske, 2007; Wiseman et al., 2009; Antunes et al., 2012; Laditi et al., 2012; Hale, 2012) que não constatarem efeitos significativos para inoculantes comerciais de microrganismos (rizobactérias, fungos arbusculares) disponíveis no mercado, seja realizando testes de campo ou em meios autoclavados. O estado físico do inoculante, o método de aplicação e a característica, quanto ao número viável de células microbianas,

é o que permite a maior eficiência e sobrevivência das células bacterianas, sendo um dos fatores limitantes para a maximização de utilização desta tecnologia.

Existe uma complementariedade da aplicação de microrganismos promotores de crescimento de plantas a comunidades já presentes no solo ou substrato, como a vermicompostagem. No entanto, a planta seleciona os tipos de microrganismos presentes na diversidade rizosférica, através dos exsudatos como aminoácidos, esteróis, ácidos orgânicos (Misra et al., 2019; Wang et al., 2018). E de acordo com Kalra et al., (2010) a adição de vermicomposto ao solo, pode aumentar a população de microrganismos na rizosfera, como foi observado para a população de *Rhizobium* e *Bacillus*, bem como o vermicomposto pode ser um ótimo veículo inoculante para aplicação de bactérias ao solo.

De acordo com Andrade, (2004), “a diferença quanto a origem dos microrganismos no sentido de preferência maior ou menor, pode ser em função da dinâmica interativa entre planta e microrganismo”, ou seja, existe uma competição entre a diversidade de microrganismos do sistema, onde a planta pode emitir sinais específicos favoráveis a colonização. Esta interação planta – microrganismo, se dá na ordem estrutural, fisiológica e bioquímica e algumas rizobactérias podem apresentar maior êxito de colonização do que outras, em função das estruturas de resistência, que permite a sobrevivência, colonização e multiplicação mútua e simbiótica, como exemplo o *Bacillus subtilis* (Hirata e Andrade Filho, 2011)

Neste sentido, Tahami et al. (2017) investigando as características agronômicas e o rendimento do óleo essencial de *Ocimum basilicum L.* através do método de inoculação via sementes com nitroxin (*Azotobacter sp* e *Azospirillum sp*), Biophosphorus (*Bacillus sp* e *Pseudomonas*), a mistura de nitroxin + biophosphorus, ambos produtos comerciais, constataram diferenças na altura, índice de área foliar, biomassa fresca, seca, teor e rendimento de óleo essencial, quando as sementes foram inoculadas com PRPG em comparação ao controle (sem inoculação).

Além disso, observaram maiores rendimentos de óleo essencial no segundo corte em comparação ao primeiro, que pode ser em função da liberação lenta de nutrientes para a solução do solo pelas PRPG, que através da solubilização do fósforo, fixação do nitrogênio atmosférico e ciclagem de nutrientes, bem como, pela síntese de enzimas, liberação de fitohormônios como auxina, citocinina e giberilina, influenciam as diferentes fases do crescimento e desenvolvimento da planta (Pereira et al., 2019).

Abd El-Hadi et al. (2009) no Egito, avaliando o efeito da inoculação com cepas locais isolados de amostras do solo, pelo método de suspensão, constataram que as

bactérias *Azospirillum lipoferum* ou/e *Azotobacter chroococcum*, quando aplicadas na presença de fertilizante orgânico, influenciam no crescimento, biomassa seca, teor de clorofila e produção de óleo essencial de três espécies de *Mentha*: *Mentha viridis* L., *Japanese mint Mentha arvensis* L. e *Peppermint Mentha piperita* L. nas duas estações de corte. E Aseri et al., (2008) para o cultivo de *Punica granatum* L., também constataram efeitos positivos quanto ao uso de cepas nativas.

5.2. Características agronômicas, rendimento e perfil do óleo essencial de *O. vulgare* L.

Origanum vulgare L. é a espécie mais variável do gênero *Origanum*, caracterizado por uma grande diversidade na morfologia e composição química (Tucker & Maciarello, 1994 em Matos). Para esta pesquisa quanto aos diferentes métodos de inoculação de PRPG, os compostos químicos majoritários identificados no óleo essencial, foram basicamente: sabinene, terpinene, γ -Terpinene, trans-Sabinene hydrate, o-Cymene and Carvacrol.

Segundo Croccon et al., (2010) a maioria dos acessos de *O. vulgare*, possuem componentes monoterpênicos, como trans-sabineno-hidrato, p-cimeno, sabineno, cis- e trans-b-ocimeno e timol, corroborando com os constituintes majoritários identificados para os OE (Figura 3). De acordo com Grevsen et al. e Baranauskiene et al. (2019) os constituintes do óleo essencial de orégano grego apresentaram variações consideráveis em suas composições quantitativas relacionadas à ontogênese da cultura e os componentes predominantes foram o carvacrol, timol, p-cimeno e γ -terpineno.

Os dois principais compostos identificados por Fikry et al., (2019) em estudo realizado no Egito, foram terpinen-4-ol (38,35%) e hidrato de trans-sabineno (10,06%). Já para estudos realizados no Brasil por Pradebon Brondani et al. (2018) foram identificados além do timol (21,95%) e carvacrol (4,71%) que são os monoterpênicos fenólicos, o α -terpineno (5,91%), p-cimeno (1,13%), γ -terpineno (2,43%) e limoneno. Luz et al., (2016) identificaram o myrcene, orto-cymene, γ -terpinene e carvacrol como os constituintes majoritários, e o 4-terpineol em menores quantidade. Já Corrêa et al., (2010) constataram que os constituintes majoritários foram o hidrato de trans-sabineno, hidrato de cis-sabineno, terpinen-4-ol, α -terpineol e timol, ambos estudos com adubação orgânica ou inoculação de PRPG.

Algumas espécies de *O. vulgare* podem ter como marcadoras os maiores conteúdos de carvacrol ou timol, no entanto, esta afirmação não se aplica a espécie de orégano em estudo, pois observa-se que embora o carvacrol tenha sido identificado como constituinte majoritário, ele não pode ser considerado o marcador da espécie, uma vez que as percentagens dos constituintes majoritários são variáveis e em quantidades similares (Figura 3). Neste sentido, os resultados corroboram com De Mastro et al., (2004) cuja avaliação agrônômica e tecnológica de biótipos de orégano, não foi possível identificar uma detecção clara de um quimiotipo específico.

De modo em geral, todas as pesquisas apontam que o perfil fitoquímico das espécies de Orégano podem variar em função da origem do acesso, estágio de maturação, manejo cultural, aspectos ambientais e edáficos, método e época de colheita, bem como o solvente utilizado na análise (Fikry et al., 2019; Luz et al., 2016; Pradebon Brondani et al. 2018; Corrêa et al., 2010).

Estudos quando a influência da data de colheita nos rendimentos e na qualidade de *O. vulgare spp* realizado por Król et al., (2019), constataram variações na composição química de seus óleos essenciais durante a ontogênese, período este que há um grande número de transformações manifestadas na variabilidade de processos e mudanças morfológicas. Bem como, o perfil ou o conteúdo do OE, são influenciados pelas condições ambientais, sendo necessários estudos quanto a melhor época de colheita, para garantir a mais alta qualidade e rendimento produtivo.

Como o óleo essencial é produzido nos tricomas glandulares situados na parte aérea das plantas, que consistem em um agrupamento de células secretoras coberto por uma cavidade de armazenamento subcuticular onde o óleo essencial se acumula dentro das células secretoras (Crocoll et al., 2010), é possível inferir que o aumento no teor de biomassa seca em função dos tratamentos, influenciou positivamente o incremento do rendimento de óleo essencial.

6 Conclusões

- Conclui-se que o *Bacillus* inoculado pelo método encapsulado (T4) em comparação ao método suspenso (T5) apresenta maior eficácia e qualidade da inoculação;
- O *Bacillus* inoculado pelo método encapsulado (T4) aumentou a produção de biomassa seca e rendimento do óleo essencial de *O. vulgare* L;

- A época de corte influencia as características agronômicas e rendimento de óleo essencial;
- O inoculante de origem ambiental (T2) coletados na mata ciliar, é uma ferramenta agroecológica importante e viável para agricultura familiar;
- A vermicompostagem é um ótimo veículo para inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas;

Financiamento

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) para fins financeiros apoio à execução da obra.

Referencial teórico

Aguilera. B., Mazzetto. E., Walter. J., Alvarez. R., Karajallo. J.C., 2017. Doses and Form of Application of Inoculant and Its Effect on Soy Culture. *Varia Sci. Agrárias* 5. 19–31.

Antunes. P., Koch. A., Dunfield. K., Hart. M., Downing. A., Rillig. M., Klironomos. J., 2009. Influence of commercial inoculation with *Glomus intraradices* on the structure and functioning of an AM fungal community from an agricultural site. *Plant Soil* 317. 257–266. *s of inoculations on the structure of resident communities ... Mycorrhiza* 14:111–117. *doi:10.1007/s00572-003-0244-7*.

Bashan. Y., de-Bashan. L.E., Prabhu. S.R., Hernandez. J.P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil* 378. 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

Bhattacharyya. P. N.; JHA. D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28 (4). 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

Canellas. L. P., Olivares. F. L., Aguiar. N. O., Jones. D. L., Nebbioso. A., Mazzei. P., & Piccolo. A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 196. 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>

Carvalho. André Lacerda Ulysses de. Oliveira. Fábio Henrique Portella Corrêa de. Mariano. Rosa de Lima Ramos. Gouveia. Ester Ribeiro. & Souto-Maior. Ana Maria. (2010). Crescimento, esporulação e produção de compostos bioativos por *Bacillus*

- subtilis R14. Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia . 53 (3). 643-652. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000300020>
- Corkidi, L., Allen, E.B., Merhaut, D., Allen, M.F., Downer, J., Bohn, J., Evans, M., 2004. Assessing the infectivity of commercial mycorrhizal inoculants in plant nursery conditions. *J. Environ. Hortic.* 22. 149–154. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-22.3.149>
- Denardin, N.D., 2006. Aplicação de inoculantes define sucesso da nodulação. *Visão Agrícola USP/ESALQ* 35–37.
- Esmailpour, B. et al. (2017). Effect of Vermicompost and Spent Mushroom Compost on the Nutrient and Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants.* 20(5). 1283-1292. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1396931>
- Etalo, D.W., Jeon, J.S., Raaijmakers, J.M., 2018. Modulation of plant chemistry by beneficial root microbiota. *Nat. Prod. Rep.* 35. 398–409. <https://doi.org/10.1039/c7np00057j>
- Ganjali, A.; Kaykhail, M. (2017). Investigating the Essential Oil Composition of *Rosmarinus officinalis* Before and After Fertilizing with Vermicompost. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants.* 20 (5). 1413-1417. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1383189>
- Hahn, Leandro. Sá. Enilson Luiz Saccol de. Osório Filho. Benjamin Dias. Machado. Rafael Goulart. Damasceno. Raquel Garibaldi. & Giongo. Adriana. (2016). Rhizobial Inoculation. Alone or Coinoculated with *Azospirillum brasilense*. Promotes Growth of Wetland Rice. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.* 40. e0160006. Epub October 24, 2016. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20160006>
- Hale, E., 2012. Production Comparisons of BioVam inoculated vs. Non-inoculated Spinach Plantings [Homepage of Hale Research & Environmental Consulting]. [Online]. Available: http://www.tandjenterprises.com/biovam_spinach_trial.
- Kalra, A., Chandra, M., Awasthi, A., Singh, A.K., Khanuja, S.P.S., 2010. Natural compounds enhancing growth and survival of rhizobial inoculants in vermicompost-based formulations. *Biol. Fertil. Soils* 46. 521–524. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0443-2>
- Laditi, M.A., Nwoke, O.C., Jemo, M., Abaidoo, R.C., Ogunjobi, A.A., 2012. Evaluation of microbial inoculants as biofertilizers for the improvement of growth and yield of soybean and maize crops in savanna soils. *Afr. J. Agric. Res.* 7. 405–413. [DOI: https://doi.org/10.5897/AJAR11.904](https://doi.org/10.5897/AJAR11.904) .

- Lazzari I. F. M. e Souza. A. S. (2017). Green Revolution: Impacts on Traditional Knowledge. 4th International Law and Contemporary Congress. 1. 1–16.
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 603, 591-592. <http://dx.doi.org/10.1042/bst0110591>
- Luz. J. M.Q. et al. (2014). Production of *Melissa officinalis* L. essential oil at different times. cultivation systems and fertilization. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*. 16(3). 552–560. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/11_130
- Malusá. E.. Sas-Paszt. L.. Ciesielska. J.. 2012. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*. [Online]. doi:10.1100/2012/491206
- Martins. Evandro & Poncelet. Denis & Rodrigues. Ramila & Renard. Denis. (2017). Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. *Journal of Microencapsulation*. 34. 1-18. 10.1080/02652048.2017.1403495.
- Mengistu. A. A. (2020). Endophytes: Colonization. Behaviour. and Their Role in Defense Mechanism. *International Journal of Microbiology*. 6927219. 8.<https://doi.org/10.1155/2020/6927219>
- Misra. P.. Maji. D.. Awasthi. A.. Pandey. S.S.. Yadav. A.. Pandey. A.. Saikia. D.. Babu. C.S.V.. Kalra. A.. 2019. Vulnerability of Soil Microbiome to Monocropping of Medicinal and Aromatic Plants and Its Restoration Through Intercropping and Organic Amendments. *Front. Microbiol*. 10. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02604>
- Molina-Santiago C. Pearson JR. Navarro Y. et al. The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nat Commun*. 2019;10(1):1919. Published 2019 Apr 23. doi:10.1038/s41467-019-09944-x
- Nikou. S. et al. (2019). Effects of organic. chemical and integrated nutrition systems on morpho-physiological traits of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Turkish Journal of Field Crops*. 24(1). 70-80. DOI: 10.17557 / tjfc.567363
- Olivares. F. L. (2017). Plant growth promoting bacterium and humic substances: Crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 4. 1. DOI: 10.1186 / s40538-017-0112-x
- Owen. D.. Williams. A.P.. Griffith. G.W.. Withers. P.J.A.. 2015. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Appl. Soil Ecol*. 86. 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>

- Paulus. D. et al. (2013). Content and chemical composition of essential citron oil as a function of seasonality and harvest time. *Brazilian Horticulture*. 31(2). 203–209. DOI: 10.1590/S0102-05362013000200005
- Pereira. M. M. A. et al. (2019). Humic Substances and Efficient Microorganisms: Elicitation of Medicinal Plants—A Review. *Journal of Agricultural Science*. 11(7). 268. DOI: 10.5539 / jas.v11n7p268
- Reetha D. Kumaresan G. John Milton D (2014) Studies to improve the shelf life of *Azospirillum lipoferum* immobilized in alginate beads. *Int J Recent Scientific Res* 5:2178–2182
- Rufini M. Oliveira DP. Trochmann A. Soares BL. Andrade MJB. Moreira FMS. Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação e no campo. *Pesq Agropec Bras*. 2014b;49:197-206. doi:10.1590/S0100-204X2014000300006
- Rufini M. Silva MAP. Ferreira PAA. Cassetari AS. Soares BL. Andrade MJB. Moreira FMS. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutradox. *Biol Fertil Soils*. 2014a;50:115-22. doi:10.1007/s00374-013-0832-4
- Scopel, W., Barbosa, J. Z., Vieira, M. L. 2011. Extração de pigmentos foliares em plantas de canola. *Unoesc & Ciência -ACET*. 2 (1), 87-94.
- Souza. Rocheli de. Ambrosini. Adriana e Passaglia. Luciane MP. (2015). Bactérias promotoras de crescimento de plantas como inoculantes em solos agrícolas. *Genetics and Molecular Biology* . 38 (4). 401-419. Epub em 03 de novembro de 2015. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Tarbell. T.J.. Koske. R.E.. 2007. Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inocula in a sand/peat medium. *Mycorrhiza* 18. 51–56
- Vassilev. N.. Vassileva. M.. Martos. V.. Garcia Del Moral. LF. Kowalska. J.. Tylkowski. B.. & Malusá. E. (2020). Formulação de Inoculantes Microbianos por Encapsulação em Polissacarídeos Naturais: Foco nas Propriedades Benéficas de Aditivos Portadores e Derivados. *Frontiers in plant science* . 11 . 270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>
- Wang. X.. Wang. Z.. Jiang. P.. He. Y.. Mu. Y.. Lv. X.. et al. (2018). Bacterial diversity and community structure in the rhizosphere of four *Ferula* species. *Sci. Rep.*8:5345. doi: 10.1038/s41598-018-22802-y
- Wiseman. P.E.. Colvin. K.H.. Wells. C.E.. 2009. Performance of mycorrhizal products marketed for woody landscape plants. *J. Environ. Hortic*. 27. 41–50. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-27.1.41>

Zhang, Y. S., Huang, X., Chen, Y. F. 2009. Experimental course of plant physiology. Higher Education Press, Beijing, pp. 34-135.

Zilli, J. E.; Gianluppi, V. Campo, R. J.; Rouws, J. R. C.; Hungria, M. Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. R. Bras. Ci. Solo. 34:1875-1881. 2010

Artigo 5

Content, yield and phytochemical profile of *Origanum vulgare* L. cultivated in agroecological and conventional production system

(Artigo estruturado nas normas da Industrial Crops and Products)

Abstract: The objective was to evaluate the influence of agroecological management, through the application of vermicompost with and without the inoculation of microorganism (*Bacillus subtilis*, using a commercial inoculum and other inoculum obtained from a riparian forest), compared to conventional management (using the NPK synthetic fertilizer), in two cutting seasons regarding the content, yield, and phytochemical profile of the *Origanum vulgare* L. EO. The cut in the autumn period impacted an increase in the EO content in all treatments. The application of vermicompost inoculated with immobilized *B. subtilis* promoted the highest EO yield (8.35 Kg/ha and 8.95 L/ha). The application of vermicompost inoculated with beneficial microorganisms are able to replace the application of NPK without reducing the content and yield of oregano EO, besides presenting better results over time. Thus, the vermicompost production and its use with beneficial microorganisms in oregano cultivation are potential social technologies and tools to be disseminated to traditional and family farmers.

Keywords: vermicomposting; *Bacillus subtilis*; beneficial microorganism; essential oil; carvacrol.

1 Introduction

With the advent of the green revolution, agricultural crops were established through the use of synthetic fertilizers, pesticides, land mechanization and latifundium concentration (Lazzari and Souza, 2017; Matos and Pessoa, 2011). The indiscriminate use of agrochemicals is also evidenced in the cultivation of medicinal species, which can lead to contamination of raw materials destined to the production of herbal medicines, as is the case of essential oils. Several products consumed in fresh or dehydrated form have presented high concentrations of pesticides and heavy metals (Pereira and Raimunda, 2016).

The cultivation of medicinal plants demands attention since these plants will be applied for therapeutic, pharmacological or food purposes, being of interest the traditional and agroecological practices (Pereira, 2019). In this context, the reuse of food and agricultural waste through vermicomposting is a potential tool to be applied in the cultivation of medicinal species, since it involves an accelerated process of bio-oxidation and stabilization of waste through from the interaction of earthworm species and microorganisms (Nikou et al. 2019; Singh et al. 2017; Dória et al. 2017; Jiang et al. 2016; Luz et al. 2014).

Vermicomposting is a suitable technology for on-farm bioconversion of organic compounds Velmourougane, (2011). The composting process occurs naturally due to the action of the microorganisms, in aerobic conditions, that provide the biomineralizing through of degradation of material organic (Zhu et al. 2019). Furthermore, the suppression of some pathogens may occur during the composting process (Milinkovic et al. 2019).

According to Padmavathiamma and Sakthivel, (2011), vermicomposting is rich in macro and micronutrients, humic substances, phytohormones, and microorganisms that promote plant growth. Earthworm activity in biodegradation increases the population of beneficial microorganisms in the soil (Pathma et al. 2011) which produce plant hormones and improve the availability of nutrients to plants (Suthar, 2014), factors that are beneficial to plant production (Ayyobi et al. 2014; Chatterjee et al. 2014).

Studies with *O. vulgare* L. Nikou et al. (2019), *Mentha piperita* L., *Rosmarinus officinalis* L. (Ganjali and Kaykhail, 2017) and *Ocimum basilicum* L. (esmajelpour et al. 2017), showed greater efficiency in plant growth with the application of vermicompost in relation to synthetic fertilizer (NPK) or control (soil), emphasizing that synthetic fertilizer can be largely replaced by vermicompost in the cultivation of medicinal species.

Among these species of great economic importance, it is worth mentioning the *O. vulgare* L., which has been cultivated for its flavoring properties. Popularly known as oregano, it is a medicinal and condiment plant of remarkable flavor, being marketed as a spice. In addition, essential oil (EO) can be extracted from its shoot, which is considered the most important product of this species (Fick et al. 2019; Camiletti et al. 2016; Sarikurkcu et al. 2015; Suzuki et al. 2015). *O. vulgare* L., belonging to the family Lamiaceae, a species originating in North Africa, the Mediterranean and other countries, has a diversity of chemotypes widely used worldwide (Sarrou et al. 2017; Lukas et al. 2015). For studies conducted in Brazil, Sarikurkcu et al. (2015) identified the following constituents (oil percentage): γ -terpinene (30.5), carvacrol (15.7), terpinen- 4-ol (13.0), geraniol (7.1) and cis-ocimene (7.0). According to the authors, these are remarkable substances in this species.

The chemical composition, yield and content of essential oil may change according to edaphoclimatic characteristics, such as seasonality, climate, soil type, altitude, nutritional management, harvest time, biotic, abiotic and genetic factors (El-Hadi et al. 2009; Paulus et al. 2013). In addition to these factors, it is currently known that there is a wide variety of eliciting agents, such as rhizobacteria (PGPR), humic substances, efficient microorganisms, algae extracts, among others (Bhattacharyya et al. 2012, Olivares et al. 2017; Canellas et al. 2015), which have been applied in the cultivation of medicinal species, because they influence ontogeny, production of secondary metabolites, biosynthesis, efficiency and absorption of nutrients by species (Pereira et al. 2019).

Besides being of great importance for the quality, productivity and yield of the production of plant species, the application of vermicomposting and eliciting agents is also of enormous environmental relevance and for the reduction of contamination of food and herbal medicine, as well as the exacerbated use of non-renewable natural resources, which are expropriated and continuously processed for the manufacture of synthetic fertilizers.

In this sense, the objective of this research was to compare the content, yield of essential oil and phytochemical profile of *Origanum vulgare* L. submitted to different agroecological managements, with and without inoculation of microorganisms, in relation to conventional cultivation, in two cutting seasons.

2 Material and Methods

The experiment was carried out in the field. Prior to the planting of *O. vulgare* L., the vermicompost was formulated and the rhizobacteria that promote plant growth were inoculated, which configure agroecological treatments. In this way, the material and methods will be described in stages to understand the formulation of the vermicompost and its application in cultivation.

2.1 Vermicompost formulation and rhizobacterial inoculation

The vermicompost was produced in the Biodiesel Sector of UFLA, through the pre-composting of organic residues from the university restaurant and plant residue from the campus landscaping, without prior treatment, packed in masonry blocks with a volume of 1m³ (each cell).

In the pre-composting phase, 3 cells were used. One cell was conducted without inoculation of microorganisms (T2). The second cell was conducted with inoculation of environmental microorganism - EM (T3), captured in the native forest of the UFLA campus at six points according to the methodology proposed by Countinho (2011). The third cell was inoculated with commercial microorganisms (T4) prepared according to the manufacturer's recommendations. After 90 days, with the material still in the pre-maturation phase, cattle manure and Californian red earthworm (*Eisenia fétida*) were added in each cell to start the vermicomposting phase of the pre-composted material, remaining for another 60 days in masonry blocks for biotransformation and full maturation of vermicompost.

After biotransformation of the materials, the vermicompost was packed in microfiber bags, separated according to the treatments/inoculations (pre-composting), and sent to the planting area of *O. vulgare* L.. In the field, the pure vermicompost was fractionated into three new parts. The first part was applied purely in the soil without inoculation of microorganisms (T2). The second part was inoculated with *B. subtilis* in an immobilized form (inert) in alginate capsules (T5), applying 10 capsules per plant (10⁹ colony-forming unit (CFU) per capsule). The third part was inoculated with *B. subtilis* in a suspended form in agar solution (T6), applying 10 mL per plant (10⁹ CFU/mL). All agroecological treatments (T2, T3, T4, T5 and T6) composed by the application of vermicompost, with and without rhizobacteria inoculation, were applied in the amount of 6 L/m².

The conventional treatment consisted of the application of synthetic fertilizer NPK 10-10-10 applying 80 g/m² (T7). Finally, a control treatment was performed without the application of fertilizers, corresponding to the cultivation in soil (T1). Table 1 shows the description of each treatment applied to the *O. vulgare* L. crop.

Table 1. Treatments used in the experiment.

| Treatment | Code | Method |
|--|------|-------------------------------|
| Soil (control) | T1 | Control without fertilization |
| Pure vermicompost | T2 | Agroecological |
| Environmental vermicompost | T3 | Agroecological |
| Commercial vermicompost | T4 | Agroecological |
| Pure vermicompost + immobilized <i>Bacillus subtilis</i> | T3 | Agroecological |
| Pure vermicompost + suspended <i>Bacillus subtilis</i> | T6 | Agroecological |
| Synthetic fertilizer (NPK) | T7 | Conventional |

2.2 Field conduction

After the vermicompost formulation, the experiment was conducted in the field, in the experimental area of the Plant Tissue Culture Laboratory of the Federal University of Lavras (UFLA), under the geographical coordinate Lat. -21.223062 and Long. -44.972369. The *O. vulgare* L. exsiccate is deposited in the herbarium ESAL/UFLA, under registration no. 22.156.

The seedlings were obtained from apical cuttings from matrix plants of the Medicinal Plants Garden of UFLA and rooted in expanded polypropylene trays of 128 cells. After 30 days, the seedlings were transplanted to the field, in randomized blocks experimental design, with three replications and eighteen plants per plot, spaced at 0.25 x 0.25 cm.

2.3 Extraction of essential oil

The stems of the plants were cut 5 cm from the soil after 95 days of planting, when the first plants started the flowering phase. In the first and second cut were harvested, respectively, 3.7 and 7.5 kg of fresh biomass in total, varying the quantities according to each treatment. Occasionally, the material was fractionated, allocated in kraft paper bags and taken to a forced air circulation oven at 30 °C until constant mass.

For essential oil (EO) extractions, the dry shoot was cutted into small pieces, weighed, and placed in a round-bottomed balloon of 5 L. Then, deionized water was added to the balloon until submerging the plant material, and it was wrapped in a thermal blanket and submitted to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger type device, which procedure was repeated three times. After extraction, the EO was dried with anhydrous Na₂SO₄ and packed in glass jars that were stored at a temperature below 0 °C.

2.4 Gas chromatography – mass spectrometry analysis

Gas chromatography with mass spectrometry (GC–MS) analysis was performed in a Shimadzu GC–MS QP2010 system, equipped with fused silica capillary column (30 m long and 0.25mm internal diameter), with RTX®-5MS stationary phase (0.25 µm film thickness). The carrier gas was helium, with a flow of 1.0 mL/minute. The mass spectra were obtained by impact of electrons at 70 eV, with a scan of 45 to 400 (m/z), and 1 µL of the prepared oil solution, using acetone as the solvent, was injected at a concentration of 10 mg/L, a split ratio of 1:20 was used, initial column temperature of 60 °C with programming to increase 2 °C per minute until reaching the temperature of 200 °C, and 5 °C per minute until reaching a maximum temperature of 250 °C. As an external standard, a mixture of linear alkanes (C₉-C₁₇) was used. The relative percentage of each compound was calculated using the ratio between the area of each peak and the total area of all constituents in the sample.

The arithmetic indices were calculated according to the following formula:

$$AI_{(X)} = 100_{Pz} + 100 \left[\frac{\{RT_{(X)} - RT_{(Pz)}\}}{\{RT_{(Pz+1)} - RT_{(Pz)}\}} \right]$$

Where: X: compound of interest; Pz: number of hydrocarbon carbon atoms with retention time prior to the retention time of compound X; $RT_{(x)}$: retention time of compound X; $RT_{(Pz)}$: is the retention time of the Pz compound; $RT_{(Pz+1)}$: hydrocarbon retention time with retention time after the retention time of compound X.

2.5 Statistical analysis

To compare the results, homoscedasticity and normality tests were previously performed by the ASSISTAT software³². Then the data were submitted to analysis of variance, by the F test, using the statistical program (SISVAR) and the Scott-Knott mean test³³ was applied.

3 Results

3.1 Essential Oil Content and Yield

The essential oil (EO) content obtained by hydrodistillation of the aerial parts of *O. vulgare* L. (oregano) submitted to different field cultivation systems (Figure 1) showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the treatments, for the first and second cut.

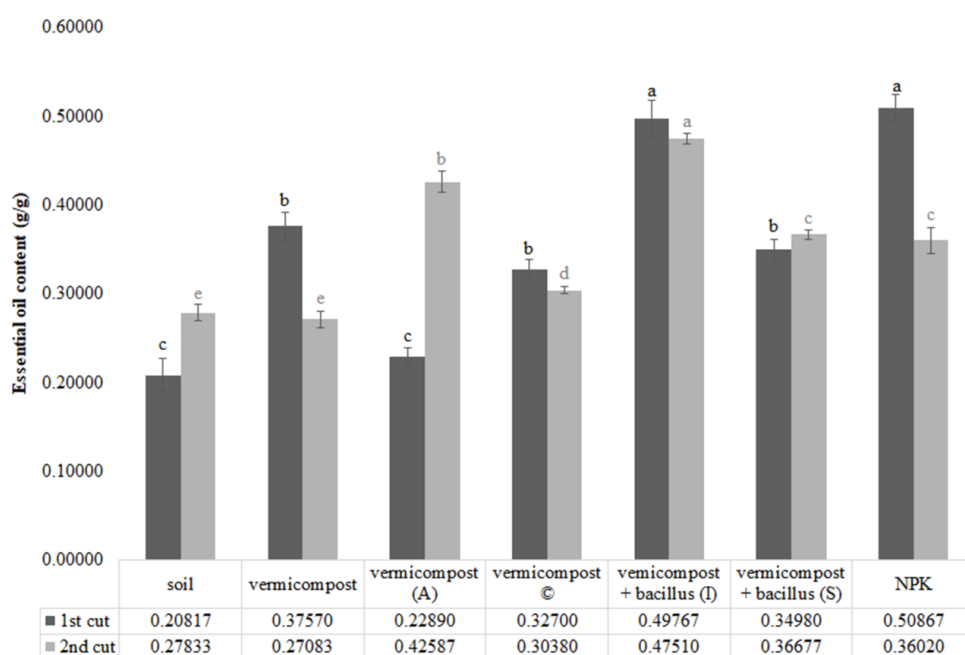
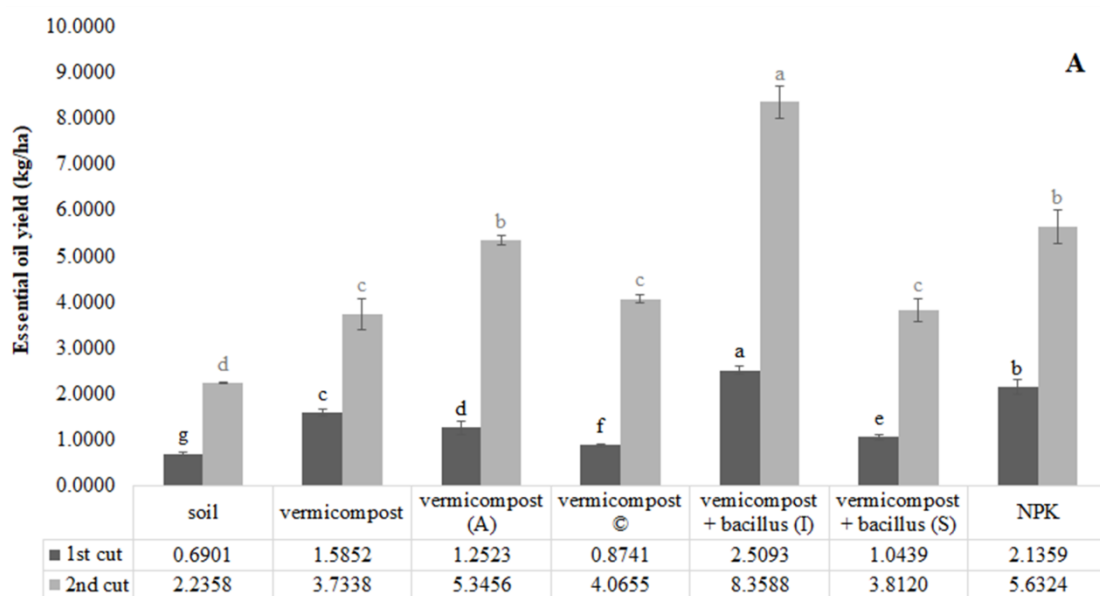


Figure 1. Content (%) of essential oil of *O. vulgare* L. in the first cut (summer) and second cut (autumn), submitted to different nutritional managements. * Bars with equal letters do not differ from each other according to Scott-Knott test ($p < 0.05$).

In the first cut, the highest content of EO was observed in *O. vulgare* L. submitted to the application of vermicompost + immobilized *B. subtilis* (T5) and to NPK (T7), presenting 0.4976% and 0.5086%, respectively (Figure 1). However, for the second cut, there was a reduction in the EO content when NPK (T7) was applied (Figure 1). For the application of vermicompost inoculated with environmental microorganisms (T3), the EO levels increased in the second cut in relation to the first. In the application of only vermicompost (T2) it was also possible to evidence a reduction of EO from the first to the second cut, similar to the application of NPK (T7).

For the essential oil yield (Figure 2A and 2B) the agroecological management through the application of vermicompost + immobilized *B. subtilis* (T5) promoted the highest EO production, presenting 2.50 Kg/ha and 2.68 L/ha in the first cut and 8.35 Kg/ha and 8.95 L/ha in the second cut, being higher than the conventional cultivation with synthetic fertilizer NPK (T7), which promoted a production of 2.13 Kg/ha and 2.28 L/ha in the first cut and 5.63 Kg/ha and 6.02 L/ha in the second cut. The application of NPK (T7) and environmental vermicompost (T3) were statistically equal in the second cut, with EO yields of 6.02 and 5.71 L/ha, respectively. The soil without vermicompost or microorganism application (T1) showed the lowest EO yield, with 0.69 Kg/ha and 0.73 L/ha in the first cut and 2.23 Kg/ha and 2.39 L/ha in the second cut.



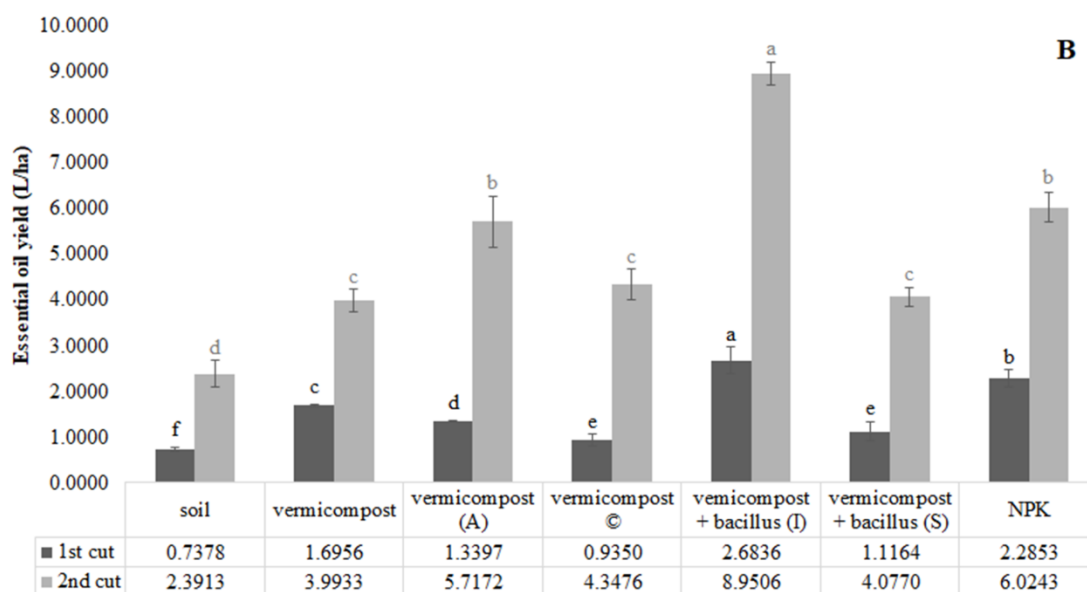


Figure 2. Essential oil yield in kg/ha (A) and L/ha (B) of *O. vulgare* L. in the first cut (summer) and second cut (autumn), submitted to different nutritional managements. * Bars with equal letters do not differ from each other according to Scott-Knott test ($p < 0.05$).

3.2 Chemical composition of *O. vulgare* L. essential oil

In the chemical analysis of essential oils obtained from oregano cultivated in different field cultivation systems, 61 constituents were identified. Nineteen constituents were identified for the first and second cut, representing from 64.02% to 91.41% of the total composition of the phytochemical profile of the species (Table 2). In general, there was no change in the phytochemical spectrum, however, there was a minimal change in the percentage of constituents as a function of treatments, especially the major constituents.

Regardless of treatment, most of the identified constituents were oxygenated monoterpenes (29.43 to 51.79%), monoterpenes without heteroatoms (25.19 to 39.20%). Sesquiterpenes without heteroatoms were identified for all treatments (3.68 to 8.70%), except for the treatment with only soil (T1) and the treatment with commercial vermicompost (T4). Oxygenated sesquiterpenes were not identified in EO composition of any treatment, and, finally, other constituents were also observed on the chromatogram but were not identified (Table 2).

Due to the variability of the chemical structure of secondary metabolites, for some retention times it was not possible to effectively affirm the definition of a single compound. In this sense, in order to avoid misunderstandings about phytochemical

composition, it was possible to point out the possible compounds for the same retention time: Sabinene or Tujone in the retention time 6.95; o-cymene or p-cymene retention time 8.87.

The main hydrocarbon monoterpenes identified were abinene, terpinene and o-cymene and the oxygenated monoterpenes terpinen-4-ol, carvacrol, γ -terpinene and trans-sabinene hydrate, being considered the major constituents. The seven compounds represent about 52% to 66% of the total composition of the essential oil of oregano, although there is no difference in the percentage of the compounds. In general, there are specific differences in relation to the majority constituents (Table 2), which are of great importance for the chemical, pharmaceutical and agrochemical industry.

In relation to the cutting time performed in summer and autumn, there is a change in the major constituents. The percentage of the trans-Sabinene hydrate metabolite for soil (control) treatment (T1) ranged from 9.41% to 15.67%, while when applied synthetic fertilizer NPK (T7) ranged from 11.34% to 18.31%. The constituent o-cymene or p-cymene ranged from 5.10% to 10.54% with the use of pure vermicompost (T2), from the first cut to the second, respectively. In general, both constituents underwent alterations in all treatments, even if minimal, when the cut was performed in the fall.

On the other hand, higher percentages of carvacrol were identified when the cut was performed in the summer, and for the application of vermicompost + suspended *B. subtilis* (T6) the retention area ranged from 17.29% to 11.09%, depending on the cutting time. For the other treatments this change is minimal or null, but with higher levels when the cut is performed in the summer.

Table 2. Chemical composition of essential oils obtained by hydrodistillation from the air-dried aerial part of *O. vulgare* L., in the first cut (summer) and second cut (autumn), subjected to different nutritional management. T1 - Soil; T2 - vermicompost; T3 - vermicompost (A); T4 - vermicompost ©; T5 - vermicompost + *Bacillus* (I); T6 - vermicompost + *Bacillus* (S); T7 - NPK.

| Sr. No. | Components | RT (min) | IR * | IR** (ad.) | Treatments (area %) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|----------|------|------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|--|
| | | | | | T1 | | T2 | | T3 | | T4 | | T5 | | T6 | | T7 | | | |
| | | | | | 1° cut | 2° cut | 1° cut | 2° cut | 1° cut | 2° cut | 1° cut | 2° cut | 1° cut | 2° cut | 1° cut | 2° cut | 1° cut | 2° cut | | |
| 1 | Sabinene or tujone | 6,953 | 971 | 969 | 3,37 | 3,35 | 3,59 | 3,37 | 3,31 | 3,02 | 3,41 | 3,12 | 3,36 | 3,18 | 2,33 | 3,31 | 3,37 | 3,35 | | |
| 2 | Myrcene | 7,534 | 989 | 988 | 2,18 | 1,89 | 2,05 | 2,02 | 1,98 | 1,79 | 2,14 | 1,81 | 2,04 | 1,87 | 1,45 | 1,91 | 2,01 | 1,87 | | |
| 3 | Terpinene | 8,540 | 1015 | 1014 | 4,22 | 3,25 | 4,49 | 3,64 | 3,83 | 3,57 | 4,19 | 3,11 | 4,12 | 3,59 | 2,52 | 3,28 | 4,07 | 3,11 | | |
| 4 | <i>o</i> -Cymene | 8,876 | 1022 | 1022 | 9,05 | 8,22 | 5,10 | 10,54 | 5,74 | 8,25 | 7,39 | 8,37 | 6,37 | 8,00 | 5,44 | 9,53 | 6,25 | 8,87 | | |
| 5 | Sylvestrene | 9,050 | 1026 | 1025 | 2,02 | 1,78 | 1,95 | 2,02 | 1,84 | 1,73 | 1,94 | 1,73 | 1,87 | 1,80 | 1,37 | 1,85 | 1,83 | 1,78 | | |
| 6 | (Z)- β -ocimene | 9,434 | 1035 | 1032 | 5,24 | 4,50 | 4,68 | 4,52 | 4,44 | 4,30 | 4,84 | 4,21 | 4,43 | 4,52 | 3,63 | 4,63 | 4,36 | 4,42 | | |
| 7 | γ -Terpinene | 10,385 | 1056 | 1054 | 11,69 | 8,20 | 13,42 | 8,09 | 11,21 | 9,36 | 12,77 | 7,98 | 12,44 | 9,29 | 8,45 | 8,20 | 12,59 | 8,02 | | |
| 8 | <i>cis</i> -Sabinene hydrate | 10,751 | 1064 | 1065 | 1,59 | 2,39 | 2,14 | 2,04 | 2,05 | 2,19 | 1,88 | 2,55 | 1,86 | 2,21 | 2,05 | 2,30 | 1,82 | 2,53 | | |
| 9 | Terpinolene | 11,789 | 1087 | 1086 | 1,43 | - | 1,26 | 1,18 | 1,10 | 1,10 | 1,22 | - | 1,12 | 1,09 | | 1,00 | 1,06 | - | | |
| 10 | <i>trans</i> -Sabinene hydrate | 12,290 | 1098 | 1065 | 9,41 | 15,67 | 11,69 | 9,79 | 12,01 | 13,51 | 10,41 | 18,11 | 10,06 | 14,24 | 15,76 | 15,30 | 11,34 | 18,31 | | |
| 11 | Linalool | 12,377 | 1099 | 1095 | 1,68 | 1,52 | 1,29 | 1,97 | 1,07 | 2,10 | 1,61 | 2,55 | 1,46 | 1,78 | - | 1,87 | 1,43 | - | | |
| 12 | Terpinen-4-ol | 16,608 | 1175 | 1174 | 14,15 | 14,25 | 15,66 | 16,77 | 13,36 | 15,95 | 14,83 | 14,12 | 14,81 | 15,63 | 13,21 | 15,09 | 14,27 | 13,83 | | |
| 13 | Terpineol | 17,351 | 1189 | 1186 | 2,60 | 3,08 | 3,26 | 3,17 | 3,16 | 3,07 | 3,08 | 3,13 | 3,20 | 3,09 | 3,48 | 3,06 | 3,16 | 3,05 | | |
| 14 | Thymol methyl ether | 20,020 | 1233 | 1232 | - | 1,38 | 1,11 | 1,31 | - | 1,10 | - | 1,26 | - | 1,01 | - | 1,02 | - | 1,14 | | |
| 15 | Bergamiol | 21,323 | 1255 | 1254 | - | 3,21 | 2,49 | 3,15 | 2,65 | 3,16 | 2,60 | 3,50 | - | 3,15 | 3,08 | 3,20 | 2,53 | 3,74 | | |
| 16 | Carvacrol | 23,730 | 1295 | 1298 | - | 10,97 | 10,50 | 10,67 | 13,10 | 11,14 | 13,32 | 11,41 | 13,24 | 11,36 | 17,29 | 11,09 | 13,76 | 10,65 | | |
| 17 | β -Caryophyllen | 31,005 | 1414 | 1408 | - | 2,43 | 2,68 | 2,42 | 3,50 | 2,32 | - | 2,28 | 2,99 | 2,20 | 3,52 | 2,04 | 2,92 | 2,30 | | |
| 18 | Germacrene D | 34,708 | 1475 | 1480 | - | 2,20 | 2,76 | 1,79 | 3,42 | 2,29 | - | 2,12 | 2,88 | 2,10 | 3,25 | 1,64 | 2,86 | 1,97 | | |
| 19 | 1-Methylethylidene | 35,645 | 1491 | 1559 | - | 1,13 | 1,60 | - | 1,78 | 1,42 | - | - | 1,50 | 1,10 | 1,44 | - | 1,78 | - | | |
| Total identified (%) | | | | | 68,63 | 88,29 | 65,54 | 64,02 | 89,55 | 89,95 | 85,63 | 91,36 | 87,75 | 90,11 | 88,27 | 90,32 | 91,41 | 88,94 | | |
| Essential oil yield (g/m²) | | | | | 0,69 | 2,24 | 1,59 | 3,73 | 1,25 | 5,35 | 0,87 | 4,07 | 2,51 | 8,36 | 1,04 | 3,81 | 2,14 | 5,63 | | |
| Grouped compounds (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hydrocarbons monoterpene (Sr. No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9) | | | | | 39,20 | 31,19 | 36,54 | 35,38 | 33,45 | 33,12 | 37,90 | 30,33 | 35,75 | 33,34 | 25,19 | 33,71 | 35,54 | 31,42 | | |
| Oxygenated monoterpene (Sr. No.: 8, 10, 11, 12, 13, 16) | | | | | 29,43 | 36,91 | 44,54 | 44,41 | 44,75 | 47,96 | 45,13 | 33,76 | 44,63 | 48,31 | 51,79 | 46,84 | 45,78 | 48,37 | | |
| Hydrocarbons sesquiterpenes (Sr. No.: 17, 18, 19) | | | | | 0,00 | 0,00 | 7,04 | 4,21 | 8,70 | 4,61 | | | 7,37 | 4,30 | 8,21 | 3,68 | 7,56 | 4,27 | | |
| Oxygenated sesquiterpenes | | | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Others (Sr. No.: 14, 15) | | | | | - | - | 3,60 | 4,46 | 2,65 | 3,16 | 2,60 | 3,50 | - | 3,15 | 3,08 | 3,20 | 2,53 | 3,74 | | |

IR* Calculated; IR** Tabled by Adans, 2017.

4 Discussion

As is known, many factors can influence the production of essential oil and the active ingredient of interest, such as the seasonality, climate, phenology, precipitation, radiation intensity, photoperiod, stage of development and duration of the treatments action, which can determine the ideal harvest time or the place of cultivation, influencing the amount of essential oil and the active ingredient of interest (Luz et al. 2016; Ayyobi et al. 2014; Roshanpour et al. 2014; El-Wahab et al. 2016). In this research were observed differences in the oregano EO production between the treatments. It can be explained by the difference in phenological cycle, i.e. time of species development and cutting season (summer and autumn), and mainly by differences in the treatments composition, i.e. in nutritional management (agroecological, control and conventional).

According to Luz et al. 2016 the formation of volatile oils in general seems to increase at higher temperatures and the light influences the accumulation of photoassimilates and the development of plant structures that biosynthesize and store the essential oil, glandular trichomes. However, very hot days can also lead to excessive loss of these metabolites. Another relevant factor is that the intense and constant rainfall results in the loss of water soluble substances present in leaves and flowers, especially at the cutting time (Chagas et al. 2018).

In relation to the cut season, the first cut (summer) of the oregano was conducted in the field during the spring/summer season, a period that combines high incidence of solar radiation with high rainfall indexes, known as water season. In this sense, the excess of water and high temperature at the cutting time for the first cut (summer) may have lead to a reduction in the essential oil content in the oregano shoot, which is the pharmacogen. On the other hand, in the second cut (autumn), due to the precipitation of the months January/February/March, the oregano had excellent sprouting and development. The reduction in rainfall and temperature at the cutting time (May) may have contributed to the increase in the essential oil content³⁷.

In addition, oregano is considered a perennial species, whose content of the second year and/or cut, should be higher in relation to the first⁵. Studies conducted by Nikou et al. (2019) and El-Wahab (2016) with oregano also showed a reduction in the first cut EO production when compared to the production in the second cut.

These factors associated with the availability of nutrients induced by agroecological fertilization and application of phosphate solubilizing bacteria (Figure 1)

resulted in higher EO content in the oregano cultivation, corroborating with the results of the scientists (El-Hadi et al. 2009; Ayyobi et al. 2014; Luz et al. 2016). Differences regarding cutting times were also observed for the cultivation of *Mentha arvensis* L. (Chagas et al. 2011) and *O. vulgare* L. (El-Hadi et al. 2009).

According to Nikou et al. (2019), the significant results for the application of vermicompost associated with the activity of growth-promoting bacteria and cutting time are due to the greater development of the root system and high solubilization of growth-promoting substances. Khalid and Hossein, (2012) point out that the positive effect of organic fertilizer levels on essential oil production is due to the fact that organic fertilizers can accelerate the reaction of primary, secondary and enzymatic metabolism, stimulating biosynthesis of essential oil content, associated with better cutting time and crop development.

Regarding the cultivation systems (agroecological, conventional and control), differences in the content and yield of essential oil of *O. vulgare* L. depending on the treatments were also evidenced by Heidarpour et al. (2019), whose results confirm higher essential oil content when applied vermicompost, and the lowest content for plants grown in medium without vermicompost. Similar results were observed by Anwar et al. (2005) and Esmailpour et al. (2017) for *O. basilicum* L., by Ganjali and Kaykhail, (2017) in the cultivation of *R. officinalis* L., by Ayyobi et al. (2014) in the cultivation of *M. piperita* L., and Nikou et al. (2019) for *O. vulgare* L., highlighting the greater efficiency of the application of vermicompost in relation to the conventional system with chemical fertilizer NPK or control (soil).

In the conventional system the chemical fertilizer NPK, for being highly soluble and available, and associated with the low organic matter content of the soil, was initially readily available for the root system of the oregano. However, in the long term, it may have been assimilated, immobilized, and or leached, reducing the stock and its availability for development and growth after the first cut, which culminated in a reduction in the content and yield of essential oil in the second cut. According to Kazimierczak et al. (2015), soluble mineral fertilizers (NPK) result in rapid biomass growth, but with reduced bioactive concentration. This factor can affect not only the content and yield of essential oil, but also modify the phytochemical profile of the species.

On the other hand, the agroecological system with the use of organic fertilizers, besides having essential nutrients, presents slow release rate (Nikou et al. 2019)

contributing directly or indirectly to the increase in the content and yield of essential oil of the species, especially over the time of cultivation (Esmailpour et al. 2017).

In this sense, the high essential oil yield of *O. vulgare* L. (Figure 2) when submitted to the application of vermicompost + *B. subtilis* (I) (T5), presenting 2.50 Kg/ha and 8.35 Kg/ha in the first and second cut, respectively, is related to the increase in biological activity in the rhizosphere, which alters the chemical and physical properties of the soil. The application of vermicompost accelerates the mineralization rate, where the chemical compounds of organic matter, such as humic acid, decompose and are available for uptake and assimilation by plants through the root system (Nikou et al. 2019).

Through degradation and mineralization, the vermicompost contributes to the increase of the contents of essential nutrients such as nitrogen, phosphorus and potassium, and micronutrients, iron, manganese, zinc, among others, which are assimilated by the root system during the phenological cycle. This may be related to the good results observed in the EO production by the treatments with vermicompost, since the essential oils are molecules formed from the biosynthesis of photoassimilates, which require ATP and NADPH, products obtained from photosynthesis, which need phosphorus and nitrogen for their formation.

Other important factor that can influence the plant growth, as well as the EO production, is that the vermicompost also has humic substances, phytohormones and plant growth-promoting microorganisms (Padmavathiamma et al 2008), in addition to high porosity, water retention capacity and aeration (Arancon et al 2010), forming nutrient complexes that are gradually released to the roots of plants (Chand et al. 2011).

The vermicompost itself is already rich in a great diversity of microorganisms, due to the activity of earthworm in biodegradation (Pathma et al. 2011), but the enrichment of this organic fertilizer with *B. subtilis* in the immobilized form (inert in alginate capsules) favored the slower degradation of organic material, once the action of the inoculated bacteria depends on its release and colonization into the soil, providing nutrients gradually, throughout the cycle, or for the phenological phases of higher nutritional demand, for the two times of oregano cutting.

According to Pereira et al. (2019), *B. subtilis* is one of the main potential microorganisms to be applied in the in vivo (field) cultivation of medicinal plants. Because it is a rhizobacterium that has the ability to form endospores, resistance structures and rapid colonization of the rhizosphere, mainly to soil dryness, it has greater

survivability in formulated with inert polymers, molding efficient systems of absorption and catabolism of organic compounds existing in the roots exudate (Bakker et al. 2013; Ahemad and Libret, 2014). Confirming the information above, in this research we observed better results with the inoculation of *B. subtilis* in the immobilized form (inert in alginate capsules).

B. subtilis acts in the regulation of mineralization processes, nitrogen cycle, carbon and phosphate solubilization (Bhattacharyya and Jha, 2012), releases organic compounds capable of reducing iron to soluble and assimilable form by plants, and when applied to the cultivation of plant species, it contributes to the processes of respiration and photosynthesis, growth and development, which may result in higher content and yield of essential oil (Tahami et al. 2017), influencing soil health and microbial activity (Chavarria, 2018; Leite et al. 2016; Silva et al. 2017; Trinh et al. 2018).

According to Singh et al. (2013), the application of vermicompost enriched with plant growth-promoting rhizobacteria in the cultivation of *Pogostemon cablin* (patchouli) improved essential oil yield by 59.74% and 37.96% compared to portions that received untreated vermicompost (unenriched) and chemical fertilizers, respectively, in addition to reducing root rot by *Rhizoctonia* in 36.36%. Similar results were found in this research, with the application of vermicompost + immobilized *B. subtilis* (T5) presenting the highest essential oil yield, with an improvement of 124.31% and 48.67% when compared to the treatments that received untreated vermicompost (T2) and chemical fertilizer NPK (T7), respectively.

In commercial aspects, a difference of 2.93 L/ha in essential oil yield, as observed in the results between the treatment with vermicompost + *B. subtilis* (I) (T5) and the application of NPK (T7), due to production management, corresponds to a significant increase for the productive sector, which remains in constant expansion worldwide, mainly by organically certified medicinal herbs (Tripathy et al. 2015; Basak et al. 2020), free of synthetic fertilizers and agrochemicals. Esmailpour et al. (2017) comparing the use of chemical fertilizers and vermicompost, states that organic fertilizers are adequate substitutes for chemical fertilizers in the cultivation of medicinal plants, contributing not only to an increase in yield, but also to the quality of the essential oil (Ganjali et al. 2017; Hossaini et al. 2016).

These results are of paramount importance for the productive autonomy of the family farmer who can obtain similar productive incomes, cultivating from the formulation of vermicompost on his property, reducing the dependence on commercial

chemical fertilizers. The efficacy of organic fertilizers was also observed by Al-Fraihat et al. (2011) in *Majorana hortensis*, in *Thymus vulgaris* (Yadegari et al. 2012) and in Basil (Nejatzadeh- Barandozi et al. 2014).

Variations in the phytochemical profile of the essential oil corroborates research conducted by Morshedloo et al. (2017), Mastro et al. (2017), Fikry et a. (2017) and Sarrou et al. (2017). Evaluations of *O. vulgare* L. populations by several authors also identified as the majority compounds the same identified in this research and some other compounds (Nejatzadeh-Barandozi et al. 2014; Morshedloo et al. 2017; Mastro et al. 2017). The chemical marker constituent of this variety of *O. vulgare* L. can be considered the carvacrol, as identified by Shiwakoti et al. (2016), Lukas et al. (2015) and reaffirmed in this research.

As observed in the results, variations in the percentage of the compounds carvacrol and p-cymene, depending on the time or on the year of cut, were also identified by Morshedloo et al. (2017), and Laothaweerungsawat et al. (2020). The quantitative and qualitative differences in the chemical composition of the essential oil from one cut to another can be due to the climatic, genetic, altitude, soil types and plant age that influence the production of secondary metabolites (Mastro et al. 2017; El- Wahab et al. 2016).

The application of vermicompost and rhizobacteria was efficient in the production of the major constituents of *O. vulgare* L.. When evaluating the phytocomplex of the essential oil, the highest percentage of these constituents was identified in the agroecological treatments when compared to the application of NPK was compared.

The results obtained in this research corroborate those obtained by Esmailpour et al. (2017), Ganjali et al. (2017), Ayyobi et al. (2014), Nikou et al. (2019), in which the application of vermicompost associated or not with rhizobacteria in the cultivation of medicinal plants was more efficient than the application of synthetic fertilizer NPK.

5 Conclusions

The field cultivation systems (agroecological x conventional) can improve the production of essential oil of *O. vulgare* L., being the application of vermicompost inoculated with beneficial microorganisms (agroecological system) able to replace the application of chemical fertilizer (NPK) (conventional system) without reducing the content and yield of oregano essential oil, besides presenting better results over time.

The addition of *B. subtilis* in the vermicompost proved to be an efficient strategy to improve the production of oregano essential oils, showing better results with the inoculation in the immobilized form.

The cutting time influences the essential oil production in oregano, presenting higher essential oil content and yield when the cutting was carried out in autumn (May).

The vermicomposting production and the use of vermicompost enriched with beneficial microorganisms in the cultivation of oregano, are potential social technologies and tools to be disseminated to traditional and family farmers.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support for carrying out the work.

References

- Adams, R.P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 4th ed.; Allured: Carol Stream, IL, USA. 1–804.
- Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacterium: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26: 1-20.
- Al-Fraihat, A.H., Al-dalain, S.Y., Abu-Darwish, M.S., Al-Tabbal, J.A. and Al-Rawashdeh, Z.B. 2011. Effect of organic and biofertilizers on growth, herb yield and volatile oil of marjoram plant grown in Ajloun region, Jordan. *J. Med. Plants Res.* 5(13): 2822-2834.
- Anwar, M., Patra, D.D., Chand, S., Alpesh, K., Naqvi, A.A. and Khanuja, S.P.S. 200). Effect of organic manures and inorganic fertilizer on growth, herb and oil yield, nutrient accumulation, and oil quality of French basil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 36(14): 1737-1746.
- Arancon, N. and Edwards, C. A. 2010. The use of vermicomposts as soil amendments for production of field crops. In: (Ed.). *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management.* 663: 129-151.
- Ayyobi, H., Olfati, J.A. and Peyvast, G.A. 2014. The effects of cow manure vermicompost and municipal solid waste compost on peppermint (*Mentha piperita* L.) in Torbat-e-Jam and Rasht regions of Iran. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 3(4): 147-153.

- Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (4): 1327-1350.
- Bakker, P.A.H.M., Berendsen, R.L., Doornbos, R.F., Wiermants, P.C.A. and Pieterse, C.M.J. 2013. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Front. Plant Sci.* 4(165): 1-8.
- Basak, B.B., Jat, R.S., Gajbhiye, N.A., Saha, A. and Manivel, P. 2020. Organic nutrient management through manures, microbes and biodynamic preparation improves yield and quality of Kalmegh (*Andrographis paniculata*), and soil properties. *J. Plant Nutr.* 43(4): 548-562.
- Chagas, F.O., Pessotti, R.D.C., Caraballo-Rodríguez, A.M. and Pupo, M.T. 2018. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chem. Soc. Rev.* 47: 1652-1704.
- Chand, S., Pande, P., Prasad, A., Anwar, M. and Dhar Patra, D. 2011. Influence of integrated supply of vermicompost, biofertilizer and inorganic fertilizer on productivity and quality of rose scented geranium (*Pelargonium species*). *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 38 (19-20): 2581-2599.
- Chavarria, D.N. 2018. Response of soil microbial communities to agroecological versus conventional systems of extensive agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ.* 264: 1-8.
- Chagas, J.H., Pinto E.J.B.P., Bertolucci, S.K.V., Santos, F.M., Botrel, P.P. and Pinto, L.B.B. 2011. Japanese mint production due to fertilization Organic did not plant and cover. *Brazilian Horticulture.* 29: 412-417.
- Chatterjee R., Bandyopadhyay S. and Jana J.C. 2014. Evaluation of vegetable wastes recycled for Vermicomposting and its response on yield and quality of carrot (*Daucus carota* L.). *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 3: 60-67.
- Camiletti, B.X., Asensio, C.M., Gadban, L.C., Pecci, M.D.L.P.G., Conles, M. Y. and Lucini, E.I. 2016. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agentes against withe rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Ind. Crops Prod.* 85: 117-124.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P. and Piccolo, A. 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196: 15-27.
- Dória, J., Rezende, R.A.L.S., Rezende, R.M., Botrel, E.P. and Carvalho, A.M. 2017. Agricultural Waste Composting : a Source of Humic Substances. *Rev. Sci. Agrár. Parana.*

16(4): 414-421.

El-Hadi, N.I.M.A., El-Ala, H.A. and El-Azim, W.M.A. 2009. Response Of Some Mentha Species To Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) Isolated From Soil Rhizosphere. Aust. J. Basic & Appl. Sci. 3(4), 4437-4448.

El-Wahab, A., Ellabban, H.M. and Moghith, W.M.A. 2016. Combined effect of organic and biofertilizer on herb yield and essential oil production of *Origanum vulgare* L. plants under sandy soil conditions. J. Agric. Res., Kafr El-sheikh Univ. 42(2): 144-159.

Esmailpour, B., Rahmanian, M., Heidarpour, O. and Shahriari, M.H. 2017. Effect of Vermicompost and Spent Mushroom Compost on the Nutrient and Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.). J. Essent. Oil-Bear. Plants. 20(5), 1283-129.

Ferreira, D.F. 2011 Sisvar: a computer statistical analysis system. Science and Agrotechnology. 35(6): 1042.

Fikry, S., Khalil, N. and Salama, O. 2019. Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. AMB Express. 9(41): 1-12.

Ganjali, A. and Kaykhail, M. 2017. Investigating the Essential Oil Composition of *Rosmarinus officinalis* Before and After Fertilizing with Vermicompost. J. Essent. Oil-Bear. Plants. 20(5): 1413-1417.

Heidarpour, O., Esmailpour, B., Soltani, A.-A. and Khorramdel, S. 2019. Effect of Vermicompost on Essential Oil Composition of (*Satureja hortensis* L.) Under Water Stress Condition. J. Essent. Oil-Bear. Plants. 22(2): 484-492

Hossaini, S.M., Aghaalikhani, M., Sefidkon, F. and Ghalavand, A. 2016. Effect of Vermicompost and Planting Pattern on Oil Production in *Satureja sahendica* L. under Competition with Pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.). J. Essent. Oil-Bear. Plants. 19(3): 606-615.

Khalid, K.A. and Hussein, E.M. 2012. Effect of cattle and liquid fertilizers on essential oil and antioxidant activities of celery fruits (*Apium graveolens* L.). J. Essent. Oil-Bear. Plants. 15: 97-107.

Kazmierczak, R., Hallamann, E. and Rembalkowska, E. 2015. Effects of organic and conventional production systems on the content of bioactive substances in four species of medicinal plants. Biol. Agric. Hortic. 31(2): 118-127.

LazzariI, F.M. and Souza, A.S. 2017. Green Revolution: Impacts on Traditional Knowledge. 4th International Law and Contemporary Congress. 1: 1-16.

- Laothaweerungsawat, N., Sirithunyalug, J., Chaiyana, W. 2020. Chemical Compositions and Anti-Skin-Ageing Activities of *Origanum vulgare* L. Essential oil from tropical and Mediterranean region. *Molecules*. 25(5): 1101.
- Leite, P.A.K., Da Silva, J.R., Alencar, F.C., Peixoto, A.R., De Souza, J.C. and Paz, C.D. 2016. Selection of rhizobacterium as growth promoters in watermelon. *Sci. Plena*, 12(4): 1 -8.
- Lukas, B., Schmiederer, C. and Novak, J. 2015. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 119: 32-40.
- Luz, J.M.Q., Silva, S.M., Habber, L.L. and Marquez, M.O.M. 2014. Production of *Melissa officinalis* L. essential oil at different times, cultivation systems and fertilization. *Rev. Bras. Plantas Med.* 16(3): 552-560.
- Luz, J.M.Q., Silva, S.M., Soares, J.S., Oliveira, R.C., Marques, M.O.M. and Facanali, R. 2016. Organic fertilization and composition of oregano essential oil. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromát.* 15(5): 301-314.
- Mastro, G.D., Tarraf, W., Verdini, L., Brunetti, G. and Ruta, C. 2017. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. *Food Chem.* 235: 1-6.
- Matos, P.F. and Pessoas, V.L.S. 2011. The Modernization of Agriculture in Brazil and the new uses of the Territory. *Geo UERJ*. 2(22): 290-322.
- Milinković, M., Lalević, B., Jovičić-Petrović, J., Golubović-Ćurguz, V., Kljujev, I. and Raičević, V. 2019. Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste—Effect on plant growth and plant pathogens' suppression. *Process Saf. Environ. Prot.* 121: 299-306.
- Morshedloo, M.R., Craker, L.E., Salami, A., Nazeri, V., Sang, H. and Maggi, F. 2017. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiol. Biochem.* 111: 119-128.
- Nejatzadeh-Barandozi, F., Darvishzadeh, F. and Aminkhani, A. 2014. Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of (*Ocimum basilicum* L.). *Org. Med. Chem. Lett.* 4(11): 1-6.
- Nikou, J., Bahram, M., Mahmoud, P.M., Varahram, R. and Abdollah, H.G. 2019. Effects of organic, chemical and integrated nutrition systems on morpho-physiological traits of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Turkish J. Field Crop.* 24(1): 70-80.
- Olivares, F.L., Busato, J.G., de Paula, A.M., da Silva Lima, L., Aguiar, N.O. and Canellas,

- L.P. 2017. Plant growth promoting bacterium and humic substances: Crop promotion and mechanisms of action. *Chem. biol. technol. agric.* 4(30): 1-13.
- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y., and Kumari, U.R. 2008. An experimental study of vermi-biowaste composting for agricultural soil improvement. *Bioresour. Technol.* 99(6): 1672-1681.
- Paulus, D., Valmorbida, R., Toffoli, E. and Nava, G.A. 2013. Content and chemical composition of essential citron oil as a function of seasonality and harvest time. *Brazilian Horticulture.* 31(2): 203-209.
- Pathma J., Kennedy R.K. and Sakthivel, N. 2011. Mechanisms of fluorescent pseudomonads that mediate biological control of phytopathogens and plant growth promotion of crop plants. In: Maheshwari DK (ed) *Bacteria in agrobiolology: plant growth responses.* Springer 605014: 77-110.
- Pereira, L.A. and Raimunda, A.D.S. 2016. The intensive use of pesticides - the new face of the agrarian question. *Okara:Geografia em Debate.* 10: 185-194.
- Pereira, M.M.A., Caproni, L.C., Marques, E.A. Martins, A.D., Cavalcanti, V.P., Rodrigues, F.A., Gonçalves, W.M., Blank, A.F., Pasqual, M. and Dória, J. 2019. Humic Substances and Efficient Microorganisms: Elicitation of Medicinal Plants – A Review. *J. Agric. Sci.* 11(7): 268-280.
- Roshanpour, N., Darzi, M.T. and Haj-Seyed-Hadi, M. 2014. Effects of plant growth promoter bacteria on biomass and yield of Basil (***Ocimum basilicum*** L.). *J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 2(6): 2077-2085
- Sarikurkcü, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R. and Aktumsek, A. 2015. Composition antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Ind.Crop Prod.* 70: 178-184.
- Sarrou, E., Tsivelika, N., Chatzopoulou, P., Tsakalidis, G., Menexes, G., Mavromatis, A. 2017. Conventional breeding of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and development of improved cultivars for yield potential and essential oil quality. *Euphytica,* 213(5): 104.
- Silva, S.M., Luz, J.M.Q., Nogueira, P.A.M., Blank, A.F., Sampaio, T.S., Pinto, J.A.O. and Wisniewski, A. 2017. Organo-mineral fertilization effects on biomass and essential oil of lavender (*Lavandula dentata* L.). *Ind. Crops Prod.* 103: 133-140.
- Silva, F.A.S.E. and Azevedo, C.A.V. 2009. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS**

IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Singh, M., Kumar, A., Singh, R. and Pandey, K.D. 2017. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *Biotech*, 7(5): 315.

Singh, R., Singh, R., Soni, S.K., Singh, S.P., Chauhan, U.K. and Kalra, A. 2013. Vermicompost from biodegraded distillation waste improves soil properties and essential oil yield of *Pogostemon cablin* (patchouli) Benth. *Appl. Soil Ecol.* 70: 48-56.

Shiwakoti, S., Zheljzkov, V.D., Schlegel, V. and Cantrell, C.L. 2016. Growing spearmint, thyme, oregano, and rosemary in Northern Wyoming using plastic tunnels. *Ind. Crops Prod.* 94: 251-258.

Suthar, S. 2009. Impact of vermicompost and composted farmyard manure on growth and yield of garlic (*Allium stivum* L.) field crop. **Int. J. Plant Prod.** 3: 27-38.

Tahami, M.K., Jahan, M., Khalilzadeh, H. and Mehdizadeh, M. 2017. Plant growth promoting rhizobacteria in an ecological cropping system: A study on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil production. *Ind. Crops Prod.* 107: 97-104.

Trinh, C.S., Jeong, C.Y., Lee, W.J., Truong, H.A., Chung, N., Han, J. and Lee, H. 2018. *Paenibacillus pabuli* strain P7S promotes plant growth and induces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 129: 264-272.

Tripathy, V., Basak, B.B., Varghese, T.S. and Saha, A. 2015. Residues and contaminants in medicinal herbs – A review. *Phytochem. Lett.* 14: 67-78.

Van Den Dool, H. and Kratz, D.J. 1963. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatography.* 11: 463-467.

Velmourougane, K.R.K. 2011. Chemical and microbiological changes during vermicomposting of coffee pulp using exotic (*Eudrilus eugeniae*) and native earthworm (*Perionyx ceylanesis*) species. 497-507.

Yadegari, M., Farahani, G.H.N. and Mosadeghzad, Z. 2012. Biofertilizers effects on quantitative and qualitative yield of Thyme (*Thymus vulgaris*). *Afr. J. Agric. Res.* 7(34): 4716-4723.

Zhu, L., Zhao, Y., Zhang, W., Zhou, H., Chen, X., Li, Y., Wei, D. and Wei, Z. 2019. Roles of bacterial community in the transformation of organic nitrogen toward enhanced bioavailability during composting with different wastes. *Bioresour. Technol.* 285: 1 -16.

Artigo 6

Manejo orgânico x manejo convencional influenciam na atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L.

Artigo publicado na *Research, Society and Development*:
<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.8504>

Abstract: O cultivo orgânico de plantas medicinais através da aplicação de vermicompostagem, com e sem inoculação de microrganismos promotores de crescimento (*Bacillus subtilis*, inóculo comercial e da mata ciliar) comparado ao cultivo convencional, através do uso de fertilizantes sintéticos (NPK), podem influenciar no desenvolvimento, perfil fitoquímico e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Neste sentido, objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais (orgânico x convencional) de *Origanum vulgare* L. na ação contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em função dos constituintes majoritários do fitocomplexo dos óleos essenciais. A inoculação de rizobactérias (ambiental (EM) e *Bacillus subtilis*) potencializou a ação antimicrobiana e microbicida dos óleos essenciais orgânicos. Os óleos essenciais de cultivo orgânico apresentaram ação antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e, antifúngica contra *Candida albicans* enquanto que o óleo essencial de cultivo convencional não apresentou atividade antibacteriana e nem antifúngica. Conclui-se que a formulação de vermicompostagem e o uso de rizobactérias, são potenciais tecnologias e ferramentas para os agricultores familiares no cultivo de orégano.

Palavras chave: vermicompostagem; *Bacillus subtilis*; microrganismo eficiente; *S. aureus*; *E. coli*; *C. albicans*; agroecologia; antimicrobiano natural

1 Introdução

Origanum vulgare L., também conhecido como orégano ou manjerona é uma planta medicinal, condimentar, de sabor generalizado, pertencente à família Lamiaceae (Lukas et al.,2015). Por ser originária do norte da África, mediterrâneo, euro-siberiana e outros países, é uma espécie extremamente variável, apresentando cinco subespécies de acordo com o banco de dados (www.theplantlist.org), e uma diversidade de quimiotipos de óleos essenciais (OEs), produto mais importante comercialmente (Fick et al., 2019; Sarrou et al., 2017;Camiletti et al., 2016; Sarikurku et al.,2015; Suzuki et al., 2015).

O gênero *Origanum* é conhecido pelas suas propriedades expectorante, antiespasmódica, carminativa, antioxidante, para distúrbios gastrointestinais (Kosakowska et al., 2019), antisséptico, anti-inflamatórios e analgésico (Dhifi et al., 2016). Além disso, atualmente tem sido altamente empregado no setor de produtos alimentícios e farmacêuticos, devido sua ação antimicrobiana no controle de *Candida albicans* (Khan et al., 2019), *Escherichia coli* (Bhat et al., 2018; Nowotarska et al., 2017), *Staphylococcus aureus* (Cui et al., 2019) *Bordetella bronchiseptica*, *Saccharomyces cerevisiae* (Fikry et al., 2019). Estas atividades são atribuídas aos constituintes majoritários presente nos (OEs), como o carvacrol, terpinen -4 -ol, thimol, geraniol, dentre outros.

No entanto, em função dos quimiotípos, o gênero *Origanum* apresenta uma gama de constituintes majoritários presentes nos (OEs), em função da origem e do cultivo. Para estudos realizados na Argentina foram identificados os compostos o-cymene (14,3), terpinen-4-ol (12,5%), (E) -b-terpineol (10,4), thymol (10,1%), y- terpinene (9,1%) e carvacrol (5,6%) (Camiletti et al., 2016). No Brasil, Suzuki et al., (2015), identificou os seguintes constituintes: y-terpinene (30,5%), carvacrol (15,7%), terpinen- 4-ol (13,0%), geraniol (7,1%) e cis - ocimene (7,0%), enquanto que na Turquia, teve uma predominância de thymol (58,3%), carvacrol (16,1%), p-cymene (13,5%) e y-terpinene (4,5%) (Sarikurku et al., 2015).

Esta variação quanto a composição química ocorre pois as espécies medicinais podem sofrer alterações em função das características edafoclimáticas, como sazonalidade, clima, tipo de solo, altitude, manejo nutricional, época de colheita, fatores bióticos, abióticos e genéticos (Abd El-Wahab et al.,2016; Luz et al., 2014; Paulus et al., 2013). Além destes fatores, atualmente uma grande variedade de agentes elicitores, rizobactérias (PGPR), substâncias húmicas, extratos de algas, dentre outros, (Bhattacharyya et al., 2012, Olivares et al., 2017; Canellas et al., 2015), tem sido aplicado

no cultivo de espécies medicinais, por influenciarem na ontogenia, produção de metabólitos secundários, biossíntese, eficiência e absorção de nutrientes pelas espécies (Pereira et al., 2019).

Sendo assim, a diferença em relação ao cultivo em campo, seja pelo sistema convencional através da aplicação de fertilizantes sintéticos ou o manejo agroecológico, com uso de vermicomposto ou composto orgânicos, pode influenciar diretamente no rendimento, teor e composição fitoquímica dos óleos essenciais. Estudos realizados por Esmailpour et al., (2017) para *Ocimum basilicum* L., por Ganjali et al., (2017) no cultivo de *Rosmarinus officinalis* L., Ayyobi et al., (2014) no cultivo de *Mentha piperita* L. e Shirin Nikou et al., (2019) para *Origanum vulgare* L., observaram maior eficiência na aplicação do vermicomposto em relação ao fertilizante sintético (NPK) ou controle (solo).

Além dos fatores supracitados, mundialmente existe uma preocupação quanto ao meio ambiente, a produção de fitoterápicos, dentre outros produtos utilizados pela indústria alimentícia e agropecuária, que sejam isentos de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos (Basak et al., 2020; Tripathy et al. 2015). Sendo assim, objetivou-se com este estudo avaliar a atividade antimicrobiana e microbicida de óleos essenciais (*orgânico x convencional*) de *Origanum vulgare* L. na ação contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em função dos constituintes majoritários do fitocomplexo.

2 Material e Métodos

2.1 Condução em campo e preparo dos inóculos

O ensaio foi conduzido em campo, na área experimental do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A exsicata de orégano está depositada no herbário ESAL/UFLA, sob o registro nº 22.156. As mudas de *Origanum vulgare* L. foram obtidas a partir de estacas apicais provenientes de plantas matrizes do Horto Medicinal da UFLA no setor de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, e enraizadas em bandejas de polipropileno expandido de 128 células.

Após 30 dias, as mudas foram transplantadas para o campo, em canteiros de 1,8m² com 20cm de altura, para cada parcela experimental (bloco), de acordo com o delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições e dezoito plantas por parcela. Os diferentes tratamentos utilizados no experimento estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento.

| Tratamento | Código | Método |
|---|---------------|-------------------------|
| Soil (Witness) | T1 | Testemunha sem adubação |
| Vermicomposto puro | T2 | Orgânico |
| Vermicompost ambiental | T3 | Orgânico |
| Vermicomposto comercial | T4 | Orgânico |
| Vermicomposto puro + <i>bacillus subtilis</i> imobilizado | T3 | Orgânicos |
| Vermicomposto puro + <i>bacillus subtilis</i> suspenso | T6 | Orgânico |
| Fertilizante sintético (NPK) | T7 | Convencional |

Os microrganismos utilizados neste estudo foram o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os inóculos foram preparados em forma de suspensão e padronizados a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro (660 nm) e 75% de transmitância.

2.2 Formulação do vermicomposto, Inoculação de rizobactérias e características químicas do substrato de plantio

A vermicompostagem foi produzida no setor de Biodiesel – UFLA, através da pré-compostagem dos resíduos orgânicos oriundos do restaurante universitário – RU e resíduo vegetal do paisagismo do campus, sem tratamento prévio, acondicionados em blocos de alvenaria com volume de 1m³ (cada célula).

Na fase de pré – compostagem, utilizou-se 3 células, uma foi conduzida sem inoculação, e as outras duas foram inoculadas com microrganismo ambiental (EM) capturado na mata nativa do campus da UFLA em seis pontos, de acordo com a metodologia proposta por Countinho, (2011) e a outra célula inoculada com microrganismos comercial – (Korin[®]), preparado de acordo com as recomendações do fabricante. Após 90 dias, com o material ainda em fase de pré-maturação, foi adicionado esterco bovino e minhoca vermelha do tipo californiana (*Eisenia fétida*) em cada célula,

permanecendo por mais 60 dias para a biotransformação e maturação plena do vermicomposto.

Após a biotransformação dos materiais em vermicomposto, os mesmos foram acondicionados em sacos de microfibras, respeitando as inoculações (pré-compostagem) e encaminhados para a área de plantio. Em campo, o vermicomposto puro (T1) foi separado, para o fracionamento e inoculação das rizobactérias. Enquanto os demais, vermicomposto ambiental (T3) e vermicomposto comercial (T4), foram aplicados aos canteiros.

O vermicomposto puro reservado previamente, foi fracionado em três partes, sendo aplicado em campo respeitando os tratamentos de acordo com o delineamento experimental. A primeira parte foi aplicada pura (sem inoculação) e nas outras duas partes foram inoculados o *Bacillus subtilis* população de 10^9 x planta, na forma imobilizada (inerte em cápsulas de alginato) e suspensa, aplicando 10ml/ planta (líquido em solução de ágar). Perfazendo então, os tratamentos: vermicomposto (puro) (T2), vermicomposto + *Bacillus subtilis* imobilizado (T5) e vermicomposto + *bacillus subtilis* suspenso (T6).

As características químicas do solo (textura arenosa) estão descritas no Material suplementar 1 e dos vermicompostos puro (1), vermicomposto ambiental (2) e vermicomposto comercial (3), no Material suplementar 2.

2.3 Extração do óleo essencial

As hastes de orégano foram cortadas a 5 cm do solo, aos 95 dias de cultivo em campo, quando as primeiras plantas iniciaram a fase de floração. O material foi fracionado, alocado em sacos de papel tipo kraft e levados para estufa de circulação forçada de ar a 30°C até peso constante.

Para as extrações dos óleos essenciais (OEs) a parte aérea seca, foi rasurada, pesada e acondicionada em balão volumétrico de 5L, submersa em água deionizada, onde foram hidrodestiladas por 3 horas, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. Após extração, o OE foi purificado e fracionado para as análises de composição química, atividade antimicrobiana e microbicida.

2.4 Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas

A composição química foi obtida através do cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM) para identificação dos compostos presentes no óleo essencial, utilizando o equipamento da modelo QP2010 (Shimadzu), equipado com

coluna capilar de sílica fundida (30 m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno), com fase estacionária RTX®-5MS (0,25 µm de espessura do filme) e hélio, com gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/minuto.

Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, com varredura de 29 a 400 (m/z), sendo injetado 1 µL da solução do óleo preparada na concentração de 10 mg.L⁻¹ com razão de split de 1:20. e realizado a comparação dos espectros de massas ao banco de dados NIST (espectroteca).

2.5 Determinação dos índices de retenção com os índices aritméticos (AI)

Para a verificação dos índices aritméticos (AI), foi injetado no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C9 –C17). Em seguida, realizou-se a comparação dos espectros de massas da espectroteca e dos índices de retenção, com os índices aritméticos (AI) calculado conforme equação 1. O percentual relativo de cada composto foi calculado através da razão entre área de cada pico com a área total de todos os constituintes da amostra. Para auxiliar na identificação e caracterização dos compostos voláteis, os valores dos índices de retenção calculados, foram comparados com valores encontrados na literatura (Adans, 2017).

$$AI_{(x)} = 100_{Pz+100} \left[\frac{\{RT_{(x)} - RT_{(Pz)}\}}{\{RT_{(Pz+1)} - RT_{(Pz)}\}} \right]$$

Onde: X: composto de interesse; Pz: número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção anterior ao tempo de retenção do composto X; RT_(x): tempo de retenção de do composto X; RT_(Pz): é o tempo de retenção do composto Pz; RT_(Pz+1):tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção posterior ao tempo de retenção do composto X.

2.6 Atividade antimicrobiana e microbicida

A determinação das concentrações mínimas inibitórias e microbicidas dos óleos essenciais de orégano sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* foram baseadas nos padrões CLSI (2008, 2015) para leveduras e bactérias, com algumas modificações. O teste foi realizado no meio Muller Hinton (HIMEDIA, Índia) para

atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e no meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) para atividade contra *Candida albicans* (ATCC 10231).

As amostras de óleo essencial foram dissolvidas em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e colocadas nas placas de 96 poços sob diluições seriadas (1000 – 10.9375 µg/mL). Alíquotas de 20 µL dos inóculos em suspensão foram adicionadas aos poços correspondentes na microplaca, após diluição seriada do óleo essencial e antimicrobiano padrão.

Os antimicrobianos padrões usados foram a amoxicilina e a estreptomicina (10 – 0.078µg/mL) para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* respectivamente e o fluconazol (40-0.312 µg/mL) para *Candida albicans*. Em seguida as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Uma solução aquosa de resazurina a 0,2%, adicionada às 22h, foi usada como revelador para determinar a viabilidade do inóculo, indicada pela mudança de cor de azul para rosa (SARKER et al., 2007).

O valor da concentração mínima inibitória (MIC) foi determinado como a menor concentração sem variação na cor do revelador. Para a determinação da concentração mínima microbicide (MMC), uma alíquota de 15µL foi removida dos poços que não apresentavam alteração de cor e aplicada na superfície de uma placa de Petri contendo ágar Muller Hinton (HIMEDIA, Índia) para bactérias e ágar Sabouraud (HIMEDIA, Índia) para levedura e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h.

O crescimento microbiano nas placas indica que o óleo essencial não exerceu uma ação microbicide. O experimento foi realizado em triplicata. O grau da atividade antimicrobiana foi determinado com base nos critérios de Holetz et al., (2002), que estabelece a ação antimicrobiana como forte (≤ 100 µg/ml), 100 µg/ml), moderada (100 –500 µg/ml), fraca (500 -1000 µg/ml) e inativa (≥ 1000 µg/ml).

3 Resultados e Discussão

3.1 Constituintes majoritários dos óleos essenciais de orégano

Devido à complexidade da composição do óleo essencial encontrado em plantas, vários estudos demonstram suas potencialidades contra microrganismos diversos, fungos, bactérias, nematoides, etc., seja pela atividade do óleo essencial íntegro ou pelos seus constituintes isolados. Sendo assim, para o presente estudo com óleos essenciais

orgânicos e convencional, verifica-se diferenças na concentração dos constituintes majoritários identificados pela CG-MS (Tabela 1).

Os constituintes majoritários identificados com as respectivas variações na percentagem de área (Figura 1 e Tabela 2), foram o sabinene (3,02 – 3,37%), terpinene (2,52 – 4,49%), o-cymene (5,10 – 10,54%), gamma-terpinene (8,02 -13,42%), 4-thujanol (1,59 – 2,55%), terpinen-4-ol (13,21 – 16,77%) e carvacrol (10,65 – 17,29%). Avaliações quanto as populações de *Origanum vulgare* L. por todo o mundo, também identificaram estes e outros compostos, como os majoritários (Laothaweerungsawat et al.,2020; Morshedloo et al.,2017; Mastro et al., 2015).

Tabela 2. Constituintes majoritários (área%) de óleos essenciais hidrodestilados de ervas secas de *Origanum vulgare* L. submetido a diferentes manejos nutricionais (orgânicos e convencional).

| Components | IR * | IR** | CAS | Treatments (area %) | | | | | | |
|----------------------|------|------|------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |
| Sabinene | 971 | 969 | 3387-41-5 | 3,37 | 3,59 | 3,31 | 3,41 | 3,36 | 2,33 | 3,37 |
| Terpinene | 1015 | 1014 | 99-86-5 | 4,22 | 4,49 | 3,83 | 4,19 | 4,12 | 2,52 | 4,07 |
| o-Cymene ou p-cymene | 1022 | 1022 | 527-84-4 | 9,05 | 5,10 | 5,74 | 7,39 | 6,37 | 5,44 | 6,25 |
| Gamma-Terpinene | 1056 | 1054 | 99-85-4 | 11,69 | 13,42 | 11,21 | 12,77 | 12,44 | 8,45 | 12,59 |
| Sabinene hydrate | 1098 | 1065 | 17699-16-0 | 9,41 | 11,69 | 12,01 | 10,41 | 10,06 | 15,76 | 11,34 |
| Terpinen-4-ol | 1175 | 1174 | 562-74-3 | 14,15 | 15,66 | 13,36 | 14,83 | 14,81 | 13,21 | 14,27 |
| Carvacrol | 1295 | 1298 | 499-75-2 | - | 10,50 | 13,10 | 13,32 | 13,24 | 17,29 | 13,76 |

IR* Índice aritmético calculado; IR** Índice aritmético do Adans; CAS: número de registro do composto químico; T1: soil; T2: vermicomposto; T3: vermicompost (A); T4: vermicompost ©; T5: vermicompost + bacillus (I); T6: vermicomposto + bacillus (S); T7: NPK

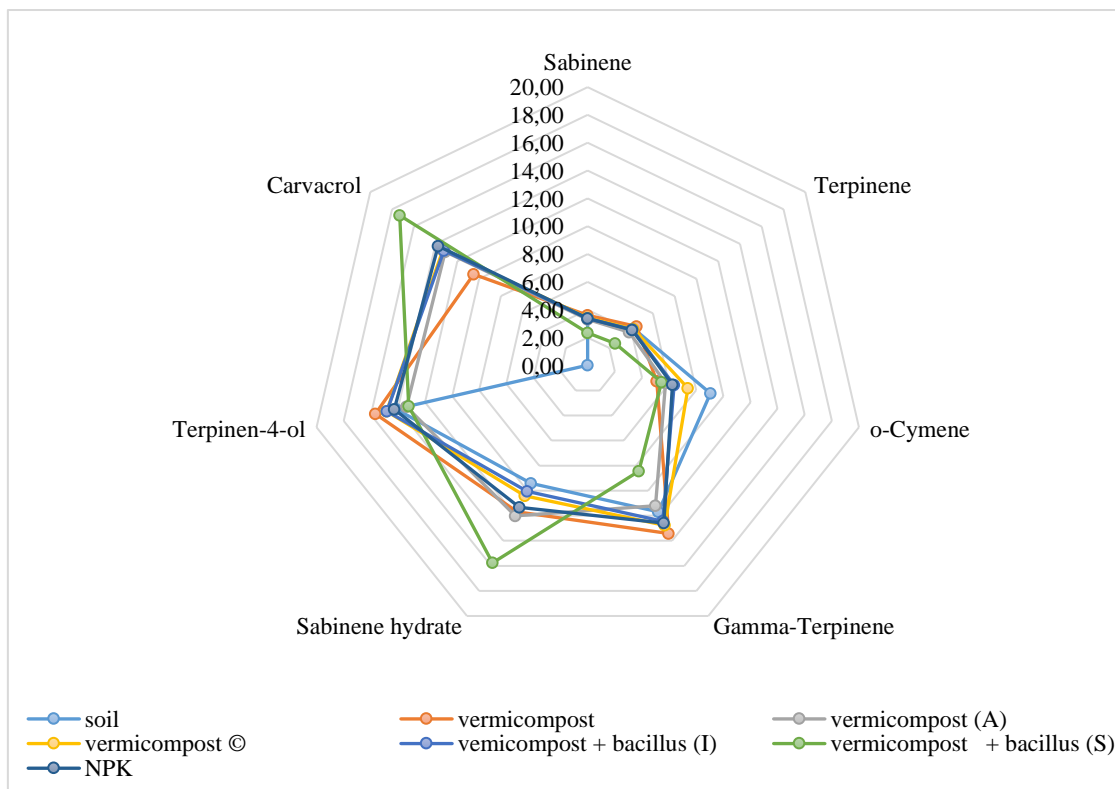


Figura 1. Constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. submetidos a diferentes manejos nutricionais (agroecológicos e convencional).

O constituinte químico marcador desta variedade de *Origanum vulgare* L é o carvacrol, como identificado nesta pesquisa e reafirmado por Shiwakoti et al., (2016); Lukas et al., (2015). Em pesquisa realizada no Brasil, Pradebon Brondani et al. (2018) e Suzuki et al., (2015), identificaram perfil fitoquímico similar, cujos os principais constituintes foram, c-Terpinene (30,5%), carvacrol (15,7%), terpinen- 4-ol (13,0%), geraniol (7,1%) e cisocimene (7,0%).

Quando as concentrações dos constituintes são avaliadas em relação às características dos tratamentos (controle, convencional e orgânico) observa-se diferenças pontuais em relação aos constituintes majoritários, que são de grande importância para a indústria química, farmacêutica e agroquímica (Hasenclever, et al., 2017). Neste contexto, quando comparado o manejo convencional com os orgânicos, foram identificados maiores teores de constituintes ativos para os seguintes tratamentos: carvacrol (17,29%) e sabinene hydrate (15,76%) para o vermicomposto puro + *bacillus subtilis* imobilizado (T6), terpinen-4-ol (15,66%) e gamma – terminene (13,42%), para vermicomposto puro (T2), o-cymene/p-cymene (9,05%) para o solo (testemunha) (T1).

A aplicação de vermicomposto e rizobactérias no cultivo e manejo de *Origanum vulgare* L. (orégano), se mostraram eficiente quanto a produção dos constituintes majoritários do óleo essencial (OE). As maiores concentrações dos compostos foram identificadas nos tratamentos orgânicos quando comparados a aplicação do fertilizante sintético convencional (NPK). Os resultados obtidos neste estudo correspondem aos obtidos por Esmailpour et al.,(2017); Ganjali et al., (2017); Ayyobi et al.,(2014); Shirin Nikou et al., (2019), em que a aplicação do vermicomposto associado ou não a rizobactérias, no cultivo de plantas medicinais, foram mais eficientes que a aplicação do fertilizante sintético NPK.

Sabe-se que o OE é influenciado pelas características edafoclimáticas, como clima, tipo de solo, altitude, manejo nutricional, sazonalidade, fatores bióticos e abióticos (Luz et al., 2014; Paulus et al., 2013). Sendo assim, as diferenças na concentração dos compostos majoritários identificados neste estudo, estão relacionadas com as características dos OEs obtidos através dos diferentes cultivos e manejos em campo.

De acordo com Prabha et al., (2008), a vermicompostagem é rica em macro e micronutrientes, substâncias húmicas, fitohormônios e microrganismos promotores de crescimento em plantas. A atividade da minhoca na biodregradação aumenta a população de microrganismos benéficos no solo (Pathma e Sakthivel, 2012, 2013), produzindo hormônios vegetais em suas secreções (Suthar 2010b), cujo os nutrientes são moldados as formas prontamente disponíveis para as plantas (Suthar 2010^a), o que representa fatores benéficos a produção vegetal (Ayyobi et al. 2014; Chatterjee et al.2014).

E quando associados à utilização de agentes elicitores, como as rizobactérias promotoras de crescimento em plantas, como o (*bacillus subtilis*, *microrganismos ambientais e comerciais*) aplicados neste estudo em campo (plantio e manejo), os mesmos podem influenciar na ontogenia, produção de metabólitos secundários, biossíntese, eficiência e absorção de nutrientes pelas plantas, resultando na alteração das concentrações do perfil fitoquímico dos OEs (Pereira et al., 2019; Chavarria et al., 2018; Trinh et al., 2018; Silva et al., 2017; Leite et al., 2016). Enquanto que estudos realizados a partir da aplicação dos fertilizantes sintéticos (NPK), relatam que o fertilizante resulta em crescimento rápido da biomassa da parte aérea e podem influenciar na redução da concentração dos constituintes bioativos (diluição). Este fator pode afetar não só o teor e rendimento do OE em si, como também modificar o perfil fitoquímico das espécies (Kazimierczak et al., 2015; Luz et al., 2014; Ayyobi et al., 2014).

Neste sentido, a partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, é possível inferir não apenas que os manejos orgânicos apresentam grande potencial na produção do óleo essencial de orégano rico, em constituintes majoritários de interesse farmacológico, industrial e agroquímico; mas também que a aplicação do fertilizante sintético (NPK) pode ser substituído pelos formulados orgânicos (agroecológicos), corroborando com as pesquisas realizadas por Basak et al., (2020); Tripathy et al., (2015); Hossaini et al., (2016).

3.2 Atividade antimicrobiana e microbicida

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (orégano) contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e o fungo *Candida albicans* foram avaliadas pela concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima microbicida (MMC) (Tabela 3).

Candida albicans foi o microrganismo mais susceptível a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, independente do tratamento, apresentando ação antifúngica moderada segundo os critérios de Holetz et al (2002). Já para as bactérias, o óleo obtido através da aplicação de vermicomposto + *Bacillus subtilis* (S) – (T6), foi o melhor resultado, tendo ação antimicrobiana moderada (250-500 µg/mL) para ambas espécies. Esta ação pode ser em função da maior concentração de carvacrol (17,29%), geralmente constituinte majoritário da espécie em estudo, como encontrado nos estudos realizado por Nowotarska et al., (2017).

Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Khan et al., (2019) no qual foi testada a ação antimicrobiana do OE de orégano coletado na Jordânia e na Arábia Saudita contra *Escherichia coli*, onde a inibição total ocorreu na concentração de 200 e 300 µg/mL, respectivamente. No entanto, os OE para a solo (testemunha) (T1) e para os OEs orgânicos, como a aplicação do vermicomposto ambiental (A) (T3), vermicomposto comercial (C) (T4) e vermicomposto + *Bacillus subtilis* (I) (T5), apresentaram ação enquanto que o OE obtido através da aplicação de vermicomposto puro (T2) não teve atividade antibacteriana.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* em µg/mL.

| Tratamento | <i>Staphylococcus aureus</i> | | <i>Escherichia coli</i> | | <i>Candida albicans</i> | |
|--------------|------------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------------|----------|
| | MIC | MMC | MIC | MMC | MIC | MMC |
| T1 | 500-1000 | >1000 | 500-1000 | >1000 | 175-250 | 500-1000 |
| T2 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | 175-250 | >1000 |
| T3 | 500-1000 | >1000 | 500-1000 | >1000 | 175-250 | >1000 |
| T4 | 500-1000 | >1000 | 500-1000 | >1000 | 175-250 | >1000 |
| T5 | 500-1000 | >1000 | 500-1000 | >1000 | 175-250 | >1000 |
| T6 | 250-500 | >1000 | 250-500 | >1000 | 175-250 | >1000 |
| T7 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Amoxicilina | 0.078-0.156 | 5-10 | -- | -- | -- | -- |
| Estreptomina | -- | -- | 0.156 -0.312 | 5-10 | -- | -- |
| Fluconazol | -- | -- | -- | -- | 3.125-6.25 | 20-40 |

MIC: concentração mínima inibitória; **MMC:** concentração mínima microbicida; **T1:** soil; **T2:** vermicomposto; **T3:** vermicompost (A); **T4:** vermicompost ©; **T5:** vermicompost + bacillus (I); **T6:** vermicomposto + bacillus (S); **T7:** NPK

Quando avaliado o OE convencional, obtido da aplicação de fertilizante sintético NPK (T7), verifica-se que o mesmo não apresentou atividade antimicrobiana para nenhum dos microrganismos utilizados no experimento. Enquanto que a ação microbicida ocorreu apenas para *C. albicans* nos testes utilizando o OE obtido através do tratamento testemunha (solo) (T1).

Os resultados deste trabalho para *C. albicans* são corroborados por outros estudos (Bhat et al., 2018; Cleff et al., 2010; Manohar et al., 2001). Em diferentes concentrações o OE de orégano foi capaz de reduzir significativamente a produção da enzima fosfolipase produzida por cepas de *C. albicans* isoladas da mucosa oral de pacientes com estomatite (Brondani et al., 2018). Outras espécies de *Candida* também foram susceptíveis a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano (Cleff et al., 2010; Chami et al., 2004), assim como no presente trabalho.

Os óleos essenciais, produto do metabolismo secundários de muitas plantas, contêm componentes distintos. Assim, o efeito antimicrobiano depende da variedade e

concentração dos compostos, seja pela atividade do óleo essencial íntegro ou individualmente pelas substâncias presentes na sua composição. Bakkali et al. (2008) afirmam que a ação antimicrobiana dos OE é atribuída principalmente aos seus compostos majoritários.

As análises cromatográficas dos OE de orégano revelaram a presença de terpinen-4-ol, carvacrol, γ -terpineno e hidrato de sabineno entre seus principais constituintes (Tabela 1), variando sua concentração em função do cultivo (testemunha, convencional e agroecológico). As diferenças nas concentrações mínimas inibitórias em cada tratamento neste estudo, deve-se às diferentes composições químicas dos OE obtidos nos diferentes manejos nutricionais realizados em campo (no plantio e manejo até a colheita).

Neste sentido, um dos compostos majoritários mais estudados do (OE) de orégano é o carvacrol, substância muito conhecida por sua ação antimicrobiana. Um experimento com *Escherichia coli* O157: H7 demonstrou que o carvacrol e timol foram capazes de diminuir o pool de ATP intracelular e aumentar o ATP extracelular, indicando uma ação disruptiva na membrana citoplasmática bacteriana (Helander et al., 1998; Nowotarska et al., 2017).

Os hidrocarbonetos monoterpenos, p-cimeno e γ -terpineno, frequentemente encontrados no OE de orégano, inclusive nos utilizados neste estudo, não apresentaram efeito inibitório contra *Escherichia coli* O157: H7 quando testados de forma isolada (Burt et al., 2005). No entanto, quando combinado com carvacrol, ocorreu sinergismo contra a bactéria *Bacillus cereus* em teste *in vitro* e também em arroz (Ultee et al., 2000). Tanto o OE de orégano como o carvacrol, presente entre os compostos majoritários de todos os OEs utilizados neste estudo, já tiveram sua ação antimicrobiana comprovada em diversas pesquisas anteriores (Ebani et al., 2020; Possamai et al., 2019; dos Santos Rodrigues et al., 2018; Pombo et al., 2018; dos Santos Rodrigues et al., 2017 ; da Silva Santos et al., 2017 ; Souza et al., 2016; Burt et al., 2005).

Neste contexto, ao observar o composto encontrado em maior concentração em cinco dos sete óleos aplicados neste estudo (Figura 1) o terpinen-4-ol, verifica-se que a ação antimicrobiana desta substância contra uma variedade de microrganismos, como *Bordetella bronchiseptica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* é corroborada através dos resultados encontrados por outros autores (Fikry et al., 2019; Hammer et al., 2012; Mondello et al., 2006). O mecanismo de ação do terpinen-4-ol pode estar relacionado aos danos na membrana plasmática e perda do material citoplasmático (Carson et al., 2002).

Além de antimicrobiano, terpinen-4-ol e carvacrol já demonstraram um potencial larvicida contra *Anopheles stephensi*, *A. subpictus*, *Culex quinquefasciatus* e *C. tritaeniorhynchus* (Govindarajan et al., 2016) e nematocida (Abdel-Rahman et al. (2013).

A grande variedade de substâncias presentes nos OE impede que sua atividade antimicrobiana seja atribuída a um único mecanismo de ação (BURT, 2004). Por apresentarem natureza hidrofóbica, os óleos essenciais têm a capacidade de penetrar nas células microbianas causando uma série de alterações em sua estrutura e também funcionalidade (Nazzaro et al., 2013). Entretanto, o potencial antimicrobiano dos OEs tem sido cada vez mais explorado, tanto para o uso medicinal em humanos e animais como para a indústria de alimentos com o objetivo de substituir conservantes tradicionais (Souza et al., 2018; Busatta et al., 2007) por OEs. Sendo assim o avanço na produção de OE orgânicos é de suma importância para o avanço destes setores, tendo em vista que a população de modo em geral tem exigido cada vez mais produtos naturais, isentos da aplicação de fertilizantes sintéticos.

De acordo com Basak et al., (2020), historicamente muitos pesquisadores afirmam não haver diferença na composição química entre alimentos orgânicos e convencionais (Dangour et al., (2010) e Rosen, (2010), no entanto há controvérsia quanto a esta afirmação. Uma vez que os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os OEs orgânicos de orégano apresentam atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e, especialmente, antifúngica contra *Candida albicans*, que pode ser atribuída principalmente à presença de terpinen-4-ol e carvacrol em sua composição química. Enquanto que o OE obtido do cultivo convencional (NPK) não apresentou ação antimicrobiana para este estudo.

Como citado anteriormente, para a caracterização dos constituintes químicos, os efeitos positivos dos óleos essenciais orgânicos, estão relacionados a vários fatores bióticos e abióticos que possibilitaram um diferencial dos OE em relação ao manejo convencional (Basak et al., (2020); Hossaini et al., (2016); Tripathy et al., (2015); Luz et al., 2014; Ayyobi et al. 2014; Chatterjee et al.2014; Paulus et al., 2013). No entanto, embora os sistemas de produção influenciem diretamente na composição do óleo essencial, são necessárias mais pesquisas quanto a ação antimicrobiana e microbicida de óleos essenciais orgânicos, a fim de comprovar a eficácia e qualidade, bem como, enfatizar a importância na transição do cultivo de plantas medicinais do sistema convencional para o orgânico (agroecológico).

O uso de fertilizantes sintéticos (NPK) são permitidos no cultivo de plantas medicinais, porém, ambientalmente, o uso contínuo aumenta a quantidade a ser aplicada, o produtor fica dependente da indústria, bem como, leva à exaustão dos solos e recursos naturais. O uso contínuo não é pela qualidade do produto final em si (planta seca ou óleo essencial), mas está associado ao modelo de produção de alimentos e produtos, estabelecido pelos pacotes tecnológicos hegemônicos (agronegócio/multinacionais), provenientes da revolução verde, e replicado pelos pequenos produtores (Gonçalves, 2011). Que historicamente foram naturalizados a um único modelo possível de agricultura, seja em função da facilidade de aquisição e/ou recursos disponíveis, imposição do mercado (Ayyobi et al., 2014).

Neste contexto, existe atualmente uma demanda crescente por plantas medicinais, óleos essenciais, cosméticos, fitoterápicos, dentre outros produtos utilizados pela indústria alimentícia, farmacêutica e agropecuária, isentos de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos. Seja pela melhoria da qualidade de vida, qualidade do produto, bem como para reduzir os efeitos negativos causados ao meio ambiente (Basak et al., 2020; Kazimierczak et al. 2015; Tripathy et al. 2015). Além do fato que a RDC nº 26/2014 aprovou fiscalização periódica de resíduos químicos na comercialização de produtos à base de plantas medicinais, vigente desde 2018 no Brasil, sendo esta uma grande preocupação em relação ao mercado de exportação de medicamentos fitoterápicos.

4 Conclusão

- Os óleos essenciais de cultivo orgânico apresentaram ação antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e, antifúngica contra *Candida albicans*;
- O óleo essencial de cultivo convencional não apresentou atividade antibacteriana e nem antifúngica;
- A vermicompostagem pode ser amplamente aplicada no cultivo de *Origanum vulgare* L.
- A inoculação de rizobactérias (ambiental (EM) e *Bacillus subtilis*) potencializou a ação antimicrobiana e microbicida dos óleos essenciais orgânicos;
- A produção de óleos essenciais de cultivo orgânicos (agroecológicos), através da formulação de vermicompostagem, são potenciais tecnologias e ferramentas para os agricultores familiares.

Referencial Bibliográfico

- Ayyobi, H.; Olfati, J. A.; Peyvast, G. A. The effects of cow manure vermicompost and municipal solid waste compost on peppermint (*Mentha piperita* L.) in Torbat-e-Jam and Rasht regions of Iran. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 2014. v. 3, n. 4, p. 147–153.
- Bakkali, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.2, p.446- 75, 2008.
- Basak, B. B. et al. Organic nutrient management through manures, microbes and biodynamic preparation improves yield and quality of Kalmegh (*Andrographis paniculata*), and soil properties. *Journal of Plant Nutrition*, 2020. v. 43, n. 4, p. 548–562.
- Bhat, V., Sharma, S. M., Shetty, V., Shastry, C. S., Rao, C. V., Shenoy, S., ... & Balaji, S. (2018). Characterization of herbal antifungal agent, *Origanum vulgare* against Oral *Candida* spp. isolated from patients with *Candida*-associated denture stomatitis: an in vitro study. *Contemporary clinical dentistry*, 9(Suppl 1), S3.
- Bhattacharyya, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012. v. 28, n. 4, p. 1327–1350.
- Brondani, L. P., da Silva Neto, T. A., Freitag, R. A., & Lund, R. G. (2018). Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de mycologie medicale*, 28(1), 94-100.
- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.94, n.3, p.223-53, 2004.
- Burt, Sara A. et al. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of food protection*, v. 68, n. 5, p. 919-926, 2005.
- Busatta, C., Mossi, A. J., Rodrigues, M. R. A., Cansian, R. L., & Oliveira, J. V. D. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 610-616, 2007
- Camiletti, B.X., Asensio, C.M., Gadban, L.C., et al. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Ind. Crops Prod.* 85, 117–124, 2016.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia*

Horticulturae, 196, 15-27, 2015.

Carson C.F., Mee B, Riley T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6):1914–1920, 2002.

Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., & Remmal, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(3), 217-226, 2004.

Chatterjee R, Bandyopadhyay S, Jana J. C. Evaluation of vegetable wastes recycled for Vermicomposting and its response on yield and quality of carrot (*Daucus carota* L.). *Int J Recycl Org Waste Agric* 3:60–67, 2014.

Chavarria, D. N. Response of soil microbial communities to agroecological versus conventional systems of extensive agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 264, 1-8, 2018.

Cleff, M. B., Meinerz, A. R.; et al. In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 116-123, 2010.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Aerobic Bacteria*. Approved Standard, 10 th ed. M07-A10. Wayne, PA, USA: CLSI, v. 35, n. 2, 2015.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Approved Standard, 3 rd ed. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, v. 28, n. 14, 2008.

Coutinho A. M. *Notebook of efficient microorganisms (EM)*. Practical instructions on the ecological and social use of EM, 2011.

Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*, 139, 111498, 2019.

Da Silva Santos, C. H., Piccoli, R. H., & Tebaldi, V. M. R. Antimicrobial activity of essential oils and compounds isolated against pathogens of clinical and food origin. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 76, 1719, 2017.

Dangour A, Lock K, Hayter A, Aikenhead A, Allen E, Uauy R. Nutrition-related health effects of organic foods: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 92:203–210, 2010.

Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N.; Mnif, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3, 25, 2016.

Dos Santos, R.; Jessica B. et al. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms

- of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. *Food Control*, v. 73, p. 1237-1246, 2017.
- Dos Santos, R.; Jessica B. et al. Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. *LWT*, v. 93, p. 293-299, 2018.
- Ebani, V. V., Bertelloni, F., Najjar, B., Nardoni, S., Pistelli, L., & Mancianti, F. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Staphylococcus* and *Malassezia* Strains Isolated from Canine Dermatitis. *Microorganisms*, 8(2), 252, 2020.
- Esmailpour, B. et al. Effect of Vermicompost and Spent Mushroom Compost on the Nutrient and Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v. 20, n. 5, p. 1283–1292, 2017.
- Fikry, S.; Khalil, N.; Salama, O. Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express*, v. 9, n. 1, 2019.
- Ganjali, A.; Kaykhahi, M. Investigating the Essential Oil Composition of *Rosmarinus officinalis* Before and After Fertilizing with Vermicompost. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v. 20, n. 5, p. 1413–1417, 2017.
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S. L., & Benelli, G. Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Research in veterinary science*, 104, 77-82, 2016.
- Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley T. V. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single-and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 2, p. 909-915, 2012.
- Helander, I.K., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agricultural Chemistry* 46 , 3590– 3595, 1998.
- Holetz F.B., Pessini G.L., Sanches N.R., Cortez D.A., Nakamura CV, Filho B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Meml Inst Oswaldo Cruz* 97:1027- 1031, 2002.
- Kazimierzak, R.; Hallamann, E.; Rembalkowska, E. Effects of organic and conventional production systems on the content of bioactive substances in four species of medicinal plants. *Biological Agriculture and Horticulture*, v. 31, n. 2, p. 118–127, 2015.
- Khan, M., Khan, S. T., Khan, M., Mousa, A. A., Mahmood, A., & Alkhatlan, H. Z.

- Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. *AMB Express*, 9(1), 176, 2019.
- Kosakowka, O.; Weglarz, Z.; Baczek, K. Yield and quality of 'Greek oregano' (*Origanum vulgare* L. *subsp. hirtum*) herb from organic production system in temperate climate. *Industrial Crops and Products*, v. 141, n. 7, 2019.
- Laothaweerungsawat, N.; Sirithunyalug, J.; Chaiyana, W. Chemical Compositions and Anti-Skin-Ageing Activities of *Origanum vulgare* L. Essential oil from tropical and Mediterranean region. *Molecules*, v. 25, n. 5, 2020.
- Leite, P. A. K. Selection of rhizobacterium as growth promoters in watermelon. *Scientia Plena*, 12, 4, 2016.
- Li, W. R., Li, H. L., Shi, Q. S., Sun, T. L., Xie, X. B., Song, B., & Huang, X. M. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(20), 8865-8875, 2016.
- Lu, Min et al. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 2329, 2018.
- Lukas, B.; Novak, J. The complete chloroplast genome of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Gene*, v. 528, n. 2, p. 163–169, 2013.
- Lukas, B.; Schmiederer, C.; Novak, J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*, v. 119, p. 32–40, 2015.
- Luz, J. M.Q. et al Production of *Melissa officinalis* L. essential oil at different times, cultivation systems and fertilization. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, v. 16, n. 3, p. 552–560, 2014.
- Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Bagchi, D., & Preuss, H. G. Antifungal activities of oregano oil against *Candida albicans*. *Molecular and cellular biochemistry*, 228(1-2), 111-117, 2001.
- Mastro, G. De et al. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. *Food Chemistry*, v. 235, p. 1–6, 2017.
- Mondello, F., De Bernardis, F., Girolamo, A. et al. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 6, 158, 2006
- Morshedloo, M. R. et al. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 111,

p. 119–128, 2017.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474, 2013.

Nikou, S. et al. Effects of organic, chemical and integrated nutrition systems on morpho-physiological traits of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, v. 24, n. 1, p. 70–80, 2019.

Nowotarska, S. W., Nowotarski, K., Grant, I. R., Elliott, C. T., Friedman, M., & Situ, C. Mechanisms of antimicrobial action of cinnamon and oregano oils, cinnamaldehyde, carvacrol, 2, 5-dihydroxybenzaldehyde, and 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). *Foods*, 6(9), 72, 2017.

Olivares, F. L. Plant growth promoting bacterium and humic substances: Crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4, 1, 2017.

Pathama, J.; Sakthavel, N. Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. *SpringerPlus*, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2002.

Paulus, D. et al. Content and chemical composition of essential citron oil as a function of seasonality and harvest time. *Brazilian Horticulture*, v. 31, n. 2, p. 203–209, 2013.

Pereira, M. M. A. et al. Humic Substances and Efficient Microorganisms: Elicitation of Medicinal Plants—A Review. *Journal of Agricultural Science*, v. 11, n. 7, p. 268, 2019.

Possamai, M. C. F., dos Santos, I. C., Silva, E. S., Gazim, Z. C., Gonçalves, J. E., Soares, A. A., ... & Otutumi, L. K. In vitro bacteriostatic activity of *Origanum vulgare*, *Cymbopogon citratus*, and *Lippia alba* essential oils in cat food bacterial isolates. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(6Supl2), 3107-3122, 2019.

Prabha, K., Padmavathiamma, A., Loretta, Y., Li, B., Usha R, Kumari. An experimental study of vermi-biowaste composting for agricultural soil improvement. *Bioresource Technology*. 99: 1672-1681, 2008.

Pradebon B. L. et al. Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Medicale*, v. 28, n. 1, p. 94–100, 2018.

Rosen J.D.A. Review of the nutrition claims made by proponents of organic food. *Compr Ver Food Sci Food Saf*. 9:270–277, 2010.

Sarikurkcu, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A. Composition antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare*

subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Ind.Crop Prod.* 70, 178–184, 2015.

Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42:321-324, 2015.

Sarrou, E. et al. Conventional breeding of Greek oregano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*) and development of improved cultivars for yield potential and essential oil quality. *Euphytica*, v. 213, n. 5, 2017.

Shiwakoti, S. et al. Growing spearmint, thyme, oregano, and rosemary in Northern Wyoming using plastic tunnels. *Industrial Crops and Products*, v. 94, p. 251–258, 2016.

Silva, S. M. et al. Organo-mineral fertilization effects on biomass and essential oil of lavender (*Lavandula dentata* L.). *Industrial Crops and Products*, v. 103, n. April, p. 133–140, 2017.

Souza, A. , Zeneratto, N. , Piccoli, R. and Bertolucci, S. Control of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Ground Beef by Blends of Essential Oils. *Advances in Microbiology*, 8, 917-930, 2018.

Souza, A. A., Dias, N. A. A., Piccoli, R. H., & Bertolucci, S. K. V. Chemical composition and minimum bactericidal concentration of sixteen essential oils on *Escherichia coli* enterotoxigenic. *Rev. Bras. Pl. Med.* [Internet], 105-112, 2016.

Suzuki, É. Y. et al. Essential Oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: An Alternative against Microorganisms responsible for Bad Perspiration Odour. *Journal of Young Pharmacists*, v. 7, n. 1, p. 12–20, 2015.

Trinh, C. S., Jeong, C. Y., Lee, W. J., Truong, H. A., Chung, N., Han, J., Lee, H. *Paenibacillus pabuli* strain P7S promotes plant growth and induces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 264-272., 2018.

Tripathy, V. et al. Residues and contaminants in medicinal herbs - A review. *Phytochemistry Letters*, 2015. v. 14, p. 67–78, 2015.

Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, E.J., Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection* 63 (5), 620 – 624, 2000.