

EFEITO DE MICRORGANISMOS FIXADORES DE NITROGÊNIO QUE HABITAM A FILOSFERA NA NUTRIÇÃO DA ALFACE

Juliana Aparecida Marchetti

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientação

Prof. Manuel Ângelo Rosa Rodrigues - IPB

Coorientação

Prof^ª. Margarida Maria Pereira Arrobas Rodrigues - IPB

Prof. Luis Cesar Cassol – UTFPR

Bragança

2022

JULIANA APARECIDA MARCHETTI

EFEITO DE MICRORGANISMOS FIXADORES DE NITROGÊNIO QUE
HABITAM A FILOSFERA NA NUTRIÇÃO DA ALFACE

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Graude Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Ângelo Rosa Rodrigues.

Coorientadores: Prof^ª. Dra. Margarida Maria Pereira Arrobas Rodrigues.
Prof. Dr. Luis Cesar Cassol.

BRAGANÇA

2022

À minha família, em especial Marli e Genésio Marchetti, meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, discernimento e força para trilhar meus caminhos. Agradeço por guiar minhas escolhas, iluminar meus passos e me amparar durante todos os meus dias.

Aos meus pais, Marli e Genésio, pelo amor, carinho, cuidado e atenção ao longo de toda a minha vida, pelo esforço e apoio para que eu chegasse até aqui. Obrigada por terem me ensinado a sonhar, por terem sonhado comigo e por estarem sempre ao meu lado durante a realização de cada sonho.

A minha irmã Thainá, pelo incentivo, pela força, pelo companheirismo e principalmente, por ser minha fonte de inspiração desde à infância. Obrigada por serem o alicerce que sustenta meu ser.

Agradeço ao meu namorado Leonardo, que além de acreditar em meus sonhos, aceita vive-los junto comigo, aventurando-se no desconhecido. Obrigada pelo companheirismo, auxílio e suporte durante este ano e na realização desta dissertação. Obrigada pela paciência, zelo e todo amor.

Agradeço aos meus avós maternos Delézia e Natal (*in memoriam*) e aos meus avós paternos Rozimbo e Alide por terem me ensinado muito sobre caráter e resiliência, e por terem ajudado por diversas vezes durante todos os meus anos como estudante.

Agradeço aos amigos e familiares brasileiros por cada prece, por cada vela, por toda intercessão e por cada mensagem de carinho. Agradeço aos meus amigos de longa data e aos que conquistei durante este ano em Portugal, vocês foram essenciais para o sucesso desta caminhada. Eu os levo em meu coração, independentemente de onde eu for.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manuel Ângelo Rodrigues e aos coorientadores, Prof. Dra. Margarida Maria Pereira Arrobas Rodrigues e Prof. Dr. Luís Cesar Cassol pelos conselhos, orientação, disponibilidade e conhecimento compartilhado durante a realização deste programa e desta dissertação.

Aos demais professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica, por transmitirem conhecimento e atuarem além da formação profissional, mas também na

manifestação do caráter e responsabilidade interpessoal. Por terem disponibilizado o tempo de suas vidas para a realização de cada projeto que conclui até hoje desde o início da graduação.

Ao Instituto Politécnico de Bragança e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade de realizar o programa de dupla diplomação e poder realizar esta dissertação.

A técnica do laboratório de solos da Escola Superior Agrária, Rita Diz e a engenheira Ana Pinto e David Carvalho por todo apoio, auxílio e companheirismo na realização das análises. Agradeço também a colega Soraia de Lurdes Raimundo por todos o suporte no decorrer deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de certa forma contribuíram e continuam a contribuir para minha formação acadêmica e preparação para a vida. Muito obrigada!

RESUMO

Na agricultura, além da disponibilidade da água, a disponibilidade de nitrogênio é geralmente considerada o fator mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural. Apesar de sua importância e de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, este elemento é encontrado na natureza em abundância em uma forma quimicamente muito estável (predominantemente na forma de gás nitrogênio, N₂), fazendo-se necessária a transformação para uma forma “combinada” com o hidrogênio (H₂) que facilite sua assimilação. As plantas podem adquirir o nitrogênio “combinado” a partir de diferentes fontes sintéticas (processo Haber Bosch) e naturais, como os raios; e a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN constitui a principal via de incorporação do nitrogênio à biosfera, tornando-se um processo biológico determinante para a vida na terra, de igual importância a fotossíntese e a respiração. Com o intuito de reduzir os efeitos adversos dos fertilizantes sintéticos, manter e aumentar a fertilidade dos solos, contribuir com a nutrição das culturas e melhor aproveitar a FBN, têm-se avaliado o potencial dos fertilizantes biológicos. Neste contexto, o potencial de organismos fixadores de nitrogênio que habitam a filosfera de culturas hortícolas é ainda pouco conhecido. Neste trabalho, testou-se a aplicação de um bioestimulante comercial com microrganismos que colonizam a filosfera na cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) e avaliou-se a capacidade de fixação de nitrogênio do microrganismo e sua contribuição para a cultura. O experimento decorreu no município de Bragança, região de Trás-os-Montes, nordeste de Portugal. Para a condução do experimento utilizou-se um delineamento fatorial com dois fatores: fertilização nitrogenada, com quatro níveis de fator (D1, D2, D3 e D4, a que correspondem 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹); e um produto comercial com *Methylobacterium symbioticum*, com dois níveis de fator (Com e Sem). De cada tratamento foram incluídas quatro repetições. Realizaram-se dois ciclos de cultivo. Ao longo do experimento determinou-se a intensidade da cor verde das folhas. As plantas foram coletadas e levadas a estufa, até atingirem peso constante, pesadas, moídas, e levadas ao laboratório para determinação da biomassa produzida e avaliação da composição elementar dos tecidos. De modo geral, os resultados permitiram atribuir ao tratamento Com Microrganismo um incremento na produção de matéria seca (11,4 contra 9,8 g vaso⁻¹ no primeiro ciclo e 14,6 contra 10,7 g vaso⁻¹ no segundo ciclo), área foliar (99,4 dm² contra 69,3 dm² no primeiro ciclo) e índice de clorofila (medido por leituras SPAD, nos valores de 27,8 contra 25,0 no primeiro ciclo) em comparação com as plantas de alface não inoculadas. Para os demais parâmetros avaliados (teor de nitratos e macro e micronutrientes nos tecidos), apesar dos valores não diferirem estatisticamente, os resultados obtidos nas plantas com microrganismo mantiveram uma tendência favorável quando comparados ao tratamento sem microrganismo. Ainda assim, recomenda-se a realização de novos estudos para avaliar a eficácia do produto comercial à base de *Methylobacterium symbioticum* para esta e outras culturas.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L.; *Methylobacterium symbioticum*; agricultura sustentável; biofertilizantes; bioestimulantes; fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

In agriculture, in addition to water, nitrogen availability is generally considered the most limiting factor for plant growth in their natural environment. Despite its importance and being required in significant quantities by living beings, this element is found in nature in abundance in a chemically very stable form (predominantly in the form of nitrogen gas, N₂), making it necessary to transform into a form “combined” with hydrogen (H₂), that facilitates its assimilation. Plants can acquire “combined” nitrogen from different synthetic (Haber Bosch process) and natural sources, such as lightning; and biological nitrogen fixation (BNF). The BNF constitutes the main way of incorporation of nitrogen into the biosphere, becoming a biological process determinant for life on earth, of equal importance to photosynthesis and respiration. To reduce the adverse effects of synthetic fertilizers, maintain and increase soil fertility, contribute to crop nutrition, and make better use of BNF, the potential of biological fertilizers has been evaluated. In this context, the potential of nitrogen-fixing organisms that inhabit the phyllosphere of horticultural crops is still poorly understood. In this work, the application of a commercial biofertilizer with microorganisms that colonize the phyllosphere in the lettuce crop (*Lactuca sativa* L.) was tested and the nitrogen fixation capacity of the microorganism and the increase in production of this crop evaluated. The experiment took place in the municipality of Bragança, region of Trás-os-Montes, northeast of Portugal. In the experiment, a factorial design with two-factors was used: nitrogen fertilization, with four-factor levels (D1, D2, D3 and, D4, corresponding to 0, 0.33, 0.66, and, 1.32 g N pot⁻¹); and commercial product with *Methylobacterium symbioticum* with two-factor levels (With and Without). From each treatment, four replicates were included. Two cultivation cycles were carried out. Throughout the experiment, the intensity of the green color of the leaves was determined. The plants were collected and taken to the greenhouse until they reached constant weight, weighed, ground, and taken to the laboratory to determine the biomass produced and evaluate the elemental composition of the tissues. In general, the results allowed to attribute to the treatment with microorganism an increase in the production of dry matter (11.4 against 9.8 g vase⁻¹ in the first cycle and 14.6 against 10.7 g vase⁻¹ in the second cycle), leaf area (99.4 dm² versus 69.3 dm² in the first cycle) and chlorophyll index (measured by SPAD readings, in the values of 27.8 versus 25.0 in the first cycle) compared to uninoculated lettuce plants. For the other parameters evaluated (nitrate content, and macro and micronutrients in the tissues), although the values did not differ statistically, the results obtained in plants with microorganism maintained a favorable trend when compared to the treatment without microorganism. Even so, further studies are recommended to evaluate the effectiveness of the commercial product based on *Methylobacterium symbioticum* for this and other cultures.

Key words: *Lactuca sativa* L.; *Methylobacterium symbioticum*; sustainable agriculture; biofertilizers, plant biostimulants; biological nitrogen fixation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem do local de implantação do experimento (Google Earth, 2022).29
- Figura 2.** Matéria seca produzida no primeiro ciclo da alface, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$). 36
- Figura 3.** Matéria seca produzida no segundo ciclo da alface, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).36
- Figura 4.** Área foliar por planta no primeiro ciclo da alface, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).37
- Figura 5.** Área foliar por planta no segundo ciclo da alface, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).37
- Figura 6.** Concentração de nitrogênio (N) nos tecidos da alface produzida no primeiro ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹) submetidas. Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$)......39
- Figura 7.** Concentração de nitrogênio (N) nos tecidos da alface produzida no segundo ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).39
- Figura 8.** Concentração de NO₃⁻ nos tecidos da alface produzida no primeiro ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$)......40

Figura 9. Concentração de NO_3^- nos tecidos da alface produzida no segundo ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso^{-1}). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$)......41

Figura 10. Leituras SPAD realizadas na alface produzida no primeiro ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso^{-1}). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$)......42

Figura 11. Leituras SPAD realizadas na alface produzida no segundo ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso^{-1}). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$)......42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração média de fósforo, potássio, cálcio e magnésio na matéria seca da alface do primeiro ciclo nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$). 43
- Tabela 2.** Concentração média de fósforo, potássio, cálcio e magnésio na matéria seca da alface do segundo ciclo nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$). 44
- Tabela 3.** Concentração média de boro, ferro, manganês, zinco e cobre nos tecidos da cultura de alface do primeiro ciclo nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Na coluna, e para cada ciclo, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$). 45
- Tabela 4.** Concentração média de boro, ferro, manganês, zinco e cobre nos tecidos da cultura de alface do segundo ciclo nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Na coluna, e para cada ciclo, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$). 46

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. AGRICULTURA ORGÂNICA.....	14
3.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	16
3.2.1. Sistemas fixadores.....	18
3.2.2. Bioquímica da fixação.....	22
3.3. <i>Methylobacterium symbioticum</i>	23
3.4. A CULTURA DA ALFACE.....	25
3.4.1. Descrição da cultura.....	25
3.4.2. O cultivo da alface no Brasil e em Portugal.....	26
3.4.3. Características culturais.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO.....	29
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
4.3. INSTALAÇÃO E MANUTENÇÃO DO EXPERIMENTO.....	30
4.3.1. Instalação do experimento.....	30
4.3.2. Manutenção do ensaio.....	31
4.4. DETERMINAÇÕES EM CAMPO	31
4.4.1. Determinação da intensidade da cor verde das folhas.....	31
4.4.2. Estimativa da área foliar.....	32
4.5. COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	32
4.6. ANÁLISES LABORATORIAIS	32
4.6.1. Determinação do nitrogênio.....	33
4.6.2. Determinação de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês.....	33
4.6.3. Determinação de boro	34
4.6.4. Determinação de nitratos.....	34
4.7. ANÁLISE DE DADOS.....	34
5. RESULTADOS	35
5.1. MATÉRIA SECA E ÁREA FOLIAR DAS PLANTAS.....	35
5.2. CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NOS TECIDOS E INDICADORES DE ESTADO NUTRITIVO NITROGENADO	38
5.3. CONCENTRAÇÃO DOS MACRONUTRIENTES FÓSFORO, POTÁSSIO, CÁLCIO E MAGNÉSIO NAS FOLHAS	43

5.4. CONCENTRAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NOS TECIDOS VEGETAIS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	47
6.1. FATOR MICRORGANISMO	47
6.2. FATOR DOSE DE NITROGÊNIO	49
7. CONCLUSÕES.....	53

1. INTRODUÇÃO

Na agricultura, além da disponibilidade da água, a disponibilidade de nitrogênio é geralmente considerada o fator mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural. Esta importância é decorrente ao fato de o nitrogênio ser um importante componente das clorofilas (pigmentos indispensáveis à fotossíntese), assim como dos aminoácidos (os principais constituintes das proteínas, incluindo enzimas) e muitos outros componentes essenciais ao crescimento de plantas (Barros, 2020). Desta forma, as plantas respondem rapidamente ao nitrogênio aplicado como fertilizante, o que o torna cada vez mais importante para a agricultura.

Por este motivo, a utilização da adubação nitrogenada mineral na agricultura é cada vez mais comum e muitas vezes inevitável, entretanto, representa um custo significativo na produção e, quando em excesso, este pode tornar-se um fator poluente, alterando o equilíbrio ecológico, causando impactos negativos no ambiente e na sociedade (Cui et al., 2014). Com o intuito de reduzir os efeitos adversos dos fertilizantes sintéticos, manter e aumentar a fertilidade dos solos, e contribuir com a nutrição das culturas, têm-se avaliado o potencial dos fertilizantes biológicos.

Além disso, a procura por alimentos mais saudáveis, livres de possíveis contaminantes químicos que venham da utilização excessiva de agroquímicos tem se elevado. Paralelamente, também se tem voltado a uma produção menos dependente dos recursos não renováveis e menos poluentes. Neste contexto, os questionamentos referentes às formas de fertilização das culturas, especialmente das hortícolas, revestem-se de elevada importância para fazer frente à crescente demanda de alimentos por parte da população que vem crescendo de forma exponencial. Incrementa-se na agricultura o uso de práticas agrícolas que visam o fomento da fixação biológica do nitrogênio, elemento essencial para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável.

A fixação biológica contribui para sustentabilidade da produção de alimentos de forma direta, onde o nitrogênio fixado é consumido através do produto cultivado, ou indiretamente, fornecendo nitrogênio ao solo e ao ecossistema agrícola, não dependendo de recursos exógenos, nomeadamente, fertilizantes nitrogenados sintéticos. No que diz respeito à produção de hortícolas, a fixação biológica de nitrogênio demonstra ainda mais potencial. Estes produtos apresentam grande resposta à adubação nitrogenada, entretanto, em condições de elevada

disponibilidade, acumulam o nitrogênio em seus tecidos na forma de nitratos e são consumidos *in natura*. Tais características reforçam a necessidade da atenção quanto à fertilização nitrogenada e a necessidade de exploração de novas formas de fornecer nutrientes às culturas hortícolas.

Ainda, apesar de os organismos fixadores de nitrogênio ter um papel muito relevante na agricultura na medida em que permitem reduzir grandemente a aplicação de fertilizantes nitrogenados, do ponto de vista comercial os rizóbios, que se usam para inocular as sementes das leguminosas, possuem expansão generalizada. O potencial de organismos fixadores de nitrogênio que habitam a filosfera de culturas hortícolas é ainda pouco conhecido.

2. OBJETIVOS

Diante do exposto, neste trabalho, testa-se a aplicação de um bioestimulante comercial com microrganismos que colonizam a filosfera na cultura da alface. É avaliada a capacidade de fixação de nitrogênio do microrganismo e o efeito na produção da cultura da alface.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica são apresentadas informações teóricas sobre os temas que permitem facilitar a compreensão da pesquisa, contextualizar a necessidade do estudo e destacar a importância do mesmo, bem como ajudar a interpretar os resultados.

3.1. AGRICULTURA ORGÂNICA

Desde os tempos históricos a agricultura tem sido orientada para a produção e é dependente da disponibilidade de recursos naturais. A notória expansão da demanda mundial por água (50%), alimentos (35%) e energia (40%) até 2030 (Embrapa, 2018), é um fenômeno que se intensificou nos últimos anos e pode ser explicada pelo aumento populacional nos países em desenvolvimento, do aumento da expectativa de vida, da intensa urbanização e das mudanças comportamentais e econômicas dos consumidores.

Diante deste cenário, o desejo de maximizar o rendimento e minimizar os custos de produção, aliado às novas tecnologias provocaram uma marcada intensificação da agricultura nas últimas quatro décadas. Paralelamente – mas não proporcionalmente – nos últimos anos tomou-se consciência de que essa intensificação ameaça o equilíbrio dos ecossistemas.

Mundialmente busca-se estabelecer uma relação mais equilibrada entre população e ambiente, os componentes de produção de alimentos e energia. Neste âmbito, destacam-se os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos sob a coordenação da Organização das Nações Unidas (ONU), com o propósito de até 2030, garantir um planeta mais próspero, equitativo e saudável (UNESCO, 2015). No centro desta agenda mundial, estão a agricultura e alimentação.

Nesta linha, a agricultura brasileira terá um papel protagonista, tendo em vista que nas últimas cinco décadas, o país tornou-se um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos. O Brasil continua investindo em processos de intensificação da produção, atualmente com vertente sustentável (Embrapa, 2018), destacando-se a produção de duas safras por ano em mesma área, sistema plantio direto (SPD), recuperação de pastagens degradadas, sistemas integrados de produção agropecuária (SIPA), reflorestamento, tratamento de dejetos animais e a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A agricultura sustentável não leva em consideração a sustentabilidade do meio ambiente de maneira isolada, mas também do sistema social que depende da produção, de forma que sejam aplicadas medidas benéficas e viáveis para ambos (Altieri, 2018). Portanto, a agricultura deve tender à intensificação sustentável e, para alcançá-la, inúmeras medidas estão sendo promovidas para ajudar a mitigar seus efeitos (Vesperinas, 2021). Neste mesmo contexto, a política agrícola da UE introduziu um termo de “agricultura sustentável” como uma das prioridades para o desenvolvimento de um modelo agrícola que respeite o meio ambiente, como uma forma de conseguir maior produção, com o mínimo de degradação.

O modo de produção biológico relaciona-se com a agricultura sustentável. Esta forma de agricultura é conhecida no Brasil e em países de língua inglesa como “agricultura orgânica”, na Espanha e na Dinamarca é chamada de “agricultura ecológica” e de “agricultura natural”, no Japão (Agrobio, 2020). Apesar de algumas diferenças, ambas possuem princípios comuns.

Segundo o Codex Alimentarius (Commission, FAO/WHO, 1999), “Agricultura Biológica” define-se como um sistema de produção que promove e melhora a saúde do ecossistema agrícola, ao fomentar a biodiversidade, os ciclos biológicos e a atividade biológica do solo. Privilegia o uso de boas práticas de gestão da exploração agrícola tendo em conta que os sistemas de produção devem ser adaptados às condições regionais. Isto é conseguido, sempre que possível, através do uso de métodos culturais, biológicos e mecânicos em detrimento da utilização de materiais sintéticos.

Como alternativa à agricultura dos dias de hoje amplamente praticada, a agricultura biológica começa a implementar-se no mundo e em Portugal através de diferentes maneiras e possui como objetivo promover mudanças tecnológicas e filosóficas na agricultura. Dentro das diversas questões que remetem cada vez mais para a adoção de práticas agrícolas sustentáveis, como a agricultura biológica, com a finalidade de reduzir o impacto causado pela exploração agrícola no meio ambiente está o uso e as fontes de fertilizantes, principalmente no que diz respeito aos fertilizantes nitrogenados (DGADR, 2017).

Atualmente na agricultura discute-se a necessidade de reduzir o uso de fertilizantes químicos, devido ao seu impacto no meio ambiente, principalmente quando mal manejados ou aplicados em excesso (Sharma, 2005). A fim de evitar poluir os recursos naturais, no modo de produção biológico não é permitido o uso de fertilizantes minerais nitrogenados e existe um limite máximo de estrume a ser aplicado por hectare relacionado ao teor de nitrogênio contido neste (Forcelini, 2020).

Estas mudanças e parâmetros estabelecidos são viáveis através do uso de técnicas já conhecidas e indispensáveis ao sistema, como: construção e manutenção da fertilidade do solo; preservação da estrutura do solo; utilização de técnicas de cultivo adequadas; utilização de organismos auxiliares para cultivo (biofertilizantes e bioestimulantes); e controle de pragas e doenças, que conciliem a existência da agricultura e da pecuária.

3.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Além da disponibilidade da água, a disponibilidade de nitrogênio (N) é geralmente considerada o fator mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (Vieira, 2017). Esta importância é decorrente ao fato de o nitrogênio um importante componente das clorofilas (pigmentos indispensáveis à fotossíntese), assim como dos aminoácidos (os principais constituintes das proteínas, incluindo enzimas) e muitos outros componentes essenciais ao crescimento de plantas (Barros, 2020). Desta forma, as plantas respondem rapidamente ao nitrogênio aplicado como fertilizante, o que o torna cada vez mais importante para a agricultura.

Apesar de sua importância e de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, este elemento é encontrado na natureza em abundância em uma forma quimicamente muito estável (predominantemente na forma de gás nitrogênio, N_2) na atmosfera da Terra que limita sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos (Vieira, 2017). Desta forma, é necessária a transformação para uma forma “combinada” com o hidrogênio (H_2) que facilite sua assimilação. Assim, antes que o nitrogênio possa ser utilizado pela maioria dos seres vivos, as ligações da molécula praticamente inerte de N_2 precisam ser rompidas, e deve ser transformada em moléculas mais reativas, como N-amoniacal ou N-nítrico para ser utilizado (Rocha e Cardoso, 2021).

As plantas podem adquirir o nitrogênio “combinado” a partir de diferentes fontes, das quais se podem citar: a adubação nitrogenada com a aplicação de amônia e/ou nitrato (do processo Haber-Bosch); o uso de excrementos animais (cama de aviário, esterco bovino...); a decomposição dos resíduos vegetais e da matéria orgânica do solo; a conversão de nitrogênio atmosférico através de processos naturais, como os raios; e, por fim, a FBN. De qualquer modo, a redução do nitrogênio atmosférico é um processo complexo que requer um grande gasto de energia para ocorrer (Vieira, 2017)

Neste contexto, a FBN constitui a principal via de incorporação do nitrogênio à biosfera (Vance, 2001; Graham e Vance, 2003). Anualmente estima-se que a contribuição global da FBN nos diferentes ecossistemas seja de cerca de 258 milhões de toneladas de N, e na agricultura, estima-se uma contribuição em 60 milhões de toneladas (Embrapa, 2018). Este é um valor superior ao fixado industrialmente (Cooper e Scherer, 2012) e resulta em efeitos positivos no ambiente e na economia. Segundo Stevenson (1986) seus benefícios colocam a FBN como processo biológico determinante para a vida na terra, de igual importância a fotossíntese e a respiração.

A FBN, descoberta por Beijerinck em 1901 (Beijerinck, 1901), é realizada por um grupo especializado de procaríotos que apresentam a enzima nitrogenase funcional. Esses organismos utilizam a enzima nitrogenase para catalisar a conversão do nitrogênio atmosférico em amônia (NH_3), a qual pode ser prontamente assimilada pelas plantas para produzir as biomoléculas nitrogenadas (Santos, 2015). Estes organismos são denominados diazotróficos e sua ação garante um reservatório inesgotável de nitrogênio na atmosfera. A FBN promove equilíbrio no ecossistema, a redução de aplicação de fertilizantes nitrogenados e conseqüentemente, a redução do uso de combustíveis fósseis necessários para produção de energia gasta pela cadeia produtiva destes fertilizantes (MAPA, 2016) e ainda, possibilita o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, menos agressiva ao meio ambiente. A fixação biológica é realizada naturalmente por microrganismos de vida livre ou simbioses (Damo, 2019)

Este processo é particularmente importante na prática da agricultura biológica, na qual não são utilizados fertilizantes químicos (Varenes, 2003) e de igual modo para uma agricultura sustentável (Embrapa, 2018), pois, o processo Haber-Bosch (que combina nitrogênio e hidrogênio, formando amônia ou produzindo outros compostos como uréia), tem alta demanda de combustível fóssil, sendo necessárias cerca de 1,3 toneladas de combustível fóssil para fixar 1 tonelada de nitrogênio em alta pressão (35 a 100 MPa) e temperatura (300 a 400 °C). Considerando a alta demanda por fertilizantes nitrogenados pela agricultura, o requerimento de energia para a produção destes fertilizantes corresponde entre 1 e 2% do suprimento mundial de energia anual e gera mais de 300 milhões de toneladas métricas de dióxido de carbono (CO_2) (Vieira, 2017).

Além do alto consumo de combustíveis, o uso de doses elevadas deste tipo de fertilizante sintético predispõe à contaminação de solos, da água e alimentos por nitratos e nitritos resultando em graves problemas humanitários e ambientais. (Amado et al., 2000; Cui et al.,

2014). Portanto, a promoção da FBN nos agrossistemas apresenta efeitos positivos no ambiente, na sociedade e na economia (Embrapa, 2018).

3.2.1. Sistemas fixadores

A FBN consiste na conversão ou redução enzimática do N₂ atmosférico em amônia e é restrita a uma porção dos organismos procariotos. Estes microrganismos foram designados de diazotróficos (azoe – azoto (nitrogênio); trofos – alimentação) (Santos, 2015) e possuem o complexo enzimático nitrogenase a partir do qual conseguem transformar o nitrogênio atmosférico em nitrogênio utilizável pelas plantas (Santos, 2015). Podem caracterizar-se três grupos distintos de bactérias fixadoras de nitrogênio/diazotrófos: organismos de vida livre; associativos (endofíticos facultativos ou obrigatórios); e simbióticos (Evans e Burris, 1992). A diversidade existente entre os grupos garante a continuidade dos processos de FBN em um determinado ecossistema, assim como sua ocorrência nos mais diferentes habitats terrestres (Moreira et al., 2010).

3.2.1.1. Diazotrófos de vida livre

Os diazotrófos de vida livre foram os primeiros a serem reconhecidos e fixam o nitrogênio para seu próprio uso (Evans e Burris, 1992). Deste modo, não necessitam estabelecer associações simbióticas com plantas, podendo citar-se as bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Rhodospirillum* e algas verde-azuladas.

Com a exceção das bactérias fotossintéticas (do gênero *Rhodospirillum*) e cianobactérias (algas verde-azuladas) que fixam nitrogênio, a maioria das bactérias diazotróficas de vida livre são heterotróficas (ou seja, não são autossustentáveis por não produzir sua própria fonte de energia) requerendo ecossistemas capazes de prover uma fonte de carbono utilizável, necessário para a fixação de nitrogênio (Marin et al., 1999). Devido à escassez de fontes adequadas de carbono e energia para esses organismos, sua contribuição para as taxas globais de fixação de nitrogênio é geralmente considerada pequena. Entretanto, em sistemas com manutenção de um ambiente com características favoráveis, como alto teor de

carbono e baixo teor de nitrogênio, permite otimizar a atividade dos organismos de vida livre resultando em uma maior contribuição.

As bactérias fotossintéticas do gênero *Rhodospirillum* e as algas verde-azuladas, também fotossintéticas, encontram-se em diferentes solos. No entanto, ambientes que possuem solos mal drenados tornam a ação destas bactérias mais eficiente e explicam valores interessantes de FBN em arrozais, em especial no caso em que aquelas algas se encontrem associadas a fetos aquáticos do gênero *Azolla* (Santos, 2015).

As bactérias fixadoras de nitrogênio aeróbias, que têm um alto nível de respiração, são favorecidas em solos alcalinos bem arejados com teores elevados de matéria orgânica e fósforo (P). A melhor temperatura para a atividade destas bactérias é próximo aos 30 °C, fazendo com que as quantidades de nitrogênio fixadas sejam superiores em climas quentes e terrenos áridos. Em climas temperados, que apresentam temperaturas mais amenas podem fixar 10 a 20 kg nitrogênio ha⁻¹ ano⁻¹ (Yague, 1999). Fazem parte deste grupo dois gêneros da família *Azotobacteraceae*, *Azotobacter* e *Azomonas*.

3.2.1.2. Diazotrófos associativos

Algumas espécies fixadoras de nitrogênio podem ser encontradas em grandes populações e além de colonizar abundantemente a rizosfera, são capazes de invadir o córtex e colonizar tecidos internos em diversas espécies vegetais (Schepers e Raun, 2008). Quando essas bactérias/diazotrófos associadas aos vegetais habitam o interior da planta hospedeira e contribuem para o crescimento do vegetal sem causar dano aparente, são chamadas de endofíticas (Dutta et al., 2014; Gouveia et al., 2020; Joo et al., 2021). Estas características permitem dividi-los entre os endofíticos facultativos (podem colonizar tanto a rizosfera como o interior das raízes) e os endofíticos obrigatórios (colonizam o interior das raízes). A colonização do interior dos tecidos das plantas pode conferir uma vantagem ecológica sob as bactérias que colonizam a rizosfera (Lodewyckx et al., 2002).

O interior dos tecidos das plantas fornece aos endofíticos um ambiente mais uniforme e protegido de condições ambientais extremas encontradas na superfície das raízes das plantas ou no solo. Por estes mesmos motivos, estes microrganismos apresentam grande capacidade de FBN, por estarem protegidos do oxigênio, podendo expressar todo o seu potencial para a

fixação de nitrogênio (Lodewyckx et al., 2002). As plantas podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande variedade de bactérias.

Microrganismos facultativos podem alternar entre plantas e o ambiente, demonstrando um estágio bifásico em seu ciclo de vida (Hardoim et al., 2008). As bactérias estabelecidas endofiticamente apresentam, além da melhoria da nutrição nitrogenada via FBN, a capacidade de interferir positivamente no crescimento da planta hospedeira. Estes microrganismos podem atuar no biocontrole de fitopatógenos e auxiliar a supressão de doenças por indução de resistência (Santos e Varavallo, 2011). Através da solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e da produção e/ou alteração da concentração de hormônios vegetais, como o ácido indol acético, ácido giberélico, citocininas e etileno (Santos e Varavallo, 2011) atuam na promoção do crescimento vegetal (Mirza et al., 2001).

Alguns exemplos mais conhecidos destes organismos são associados à cana de açúcar, sorgo e milho, como *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. e também ao arroz, como os gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (Rai, 2009). Segundo Lodewyckx et al. (2002), bactérias endofíticas facultativas podem ser encontradas colonizando tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. Como acontece com muitos diazotrófos de vida livre, os diazotrófos endofíticos facultativos normalmente não excretam NH_4^+ (Schepers e Raun, 2008).

Os endofíticos obrigatórios são microrganismos estritamente dependentes da associação com a planta para crescimento e sobrevivência (Hardoim et al., 2008). Entre os endofíticos obrigatórios, encontram-se bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

3.2.1.4.1. Associações não simbióticas na filosfera

Existe uma diversidade de associações de microrganismos com plantas, algumas das quais estabelecidas na filosfera. A filosfera corresponde à superfície das plantas, nomeadamente à parte aérea das plantas vasculares, fazendo deste modo, analogia à rizosfera (Newton et al., 2010), podendo referir-se a superfície adaxial e abaxial da folha, e em alguns casos, a folha completa, incluindo o ambiente interno (Mayz-Figueroa, 2004). Pode ainda incluir uma pequena fração representada pelas flores, os frutos e os ramos.

A diversidade microbiana da filosfera apresenta uma magnitude muito superior à esperada, uma vez que as folhas geralmente são consideradas um ambiente relativamente inóspito aos microrganismos (Lambais et al., 2006). Apesar da frequente exposição às variações de temperatura, humidade, radiação ultravioleta e baixa disponibilidade de nutrientes, este é um habitat bastante denso e diversificado. Este habitat inclui, na sua maioria, bactérias, mas também algumas leveduras, fungos, oomycetes e algas (Lindow e Brandl, 2003). A população e a composição podem ser influenciadas por inúmeros fatores abióticos e pela planta hospedeira (Vorholt, 2012), uma vez que a microbiota é distinta a cada espécie de planta, podendo haver até mesmo uma variação entre as diferentes folhas de um mesmo indivíduo (Lambais et al. 2006).

Os microrganismos na filosfera podem colonizar a planta epifiticamente (colonização da superfície) ou endofiticamente (colonização dos tecidos internos (Lindow e Brandl, 2003). De modo geral, as bactérias mais abundantes nas folhas são as pigmentadas (*Methylobacterium mesophilicum*, *Pseudomonas syringae*), às quais foi atribuída uma melhor adaptação aos raios solares (Mayz-Figueroa, 2004). Dentre os habitantes que podem colonizar a filosfera estão várias bactérias fixadoras de nitrogênio (Berdugo, 2012; Gomez, 2012).

3.2.1.5. Diazotrófos simbióticos

Muitos microrganismos fixam nitrogênio simbioticamente por meio de associações com uma planta hospedeira, onde há uma verdadeira relação de simbiose entre as plantas e os microrganismos. Nesta relação, existe uma especificidade entre o microrganismo e o hospedeiro (Maunoury et al., 2008). A planta fornece carboidratos da fotossíntese, sais minerais e demais substratos orgânicos através do floema, que são utilizados pelo microrganismo fixador de nitrogênio para a energia necessária para a fixação de nitrogênio. Em troca dessas fontes de carbono, os microrganismos fixam e cedem nitrogênio para a planta hospedeira. Essa capacidade de FBN é encontrada em vários grupos de microrganismos e, em alguns casos, observa-se a formação de estruturas diferenciadas (Marin et al., 1999).

Estão identificados oito gêneros de microrganismos fixadores, como *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium*, *Cupriavidus* e o *Bradhyrhizobium*) além de 30 espécies separadas. Estima-se que existam mais de 17000 espécies de leguminosas e que também algumas árvores (*Albizia lebbek*, *Gliricidia sepium*,

Leucaena leucocephala) sejam beneficiadas por esta relação (Fernández-Pascual et al., 2002; Schepers e Raun, 2008).

Embora todos os fixadores simbióticos de nitrogênio desempenhem um papel importante na ecologia mundial de fixação de nitrogênio, os microrganismos de maior interesse agrícola são os pertencentes dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que atuam em simbiose com as leguminosas (Fernández-Pascual et al., 2002; Cardoso et al., 2013). As bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* utilizam os pelos radiculares para penetrar e atingir as células corticais das leguminosas, neste processo, ocorre o enrolamento do pelo radicular que resulta na formação do nódulo (estrutura diferenciada) (Veríssimo, 2008).

As leguminosas apresentam inúmeras utilidades, especialmente para a agricultura (na produção de alimentos, adubos verdes, rotação de culturas). A maioria das leguminosas de importância econômica são capazes de nodular e fixar nitrogênio atmosférico em condições mínimas de nitrogênio disponível no solo (Luchese et al., 2002; Ferreira et al., 2013). Algumas das leguminosas mais importantes usadas em sistemas agrícolas são alfafa, feijão, trevo, feijão-nhemba, tremoço, amendoim, soja e ervilhaca. No processo de nodulação é necessário que planta hospedeira e microrganismo sejam compatíveis (Maunoury et al; 2008). Caso os inóculos nativos não se revelem eficientes, pode haver necessidade de ser fazer inoculação com estirpes de rizóbios específicas. Caso não haja compatibilidade, os nódulos nas raízes não se desenvolvem, ou mesmo que se desenvolvam a eficácia da fixação biológica é baixa.

3.2.2. Bioquímica da fixação

De acordo com Kannaiyan (2002) o processo biológico de fixação de nitrogênio requer basicamente a enzima nitrogenase, um agente redutor forte, ATP e baixa tensão de oxigênio, ou seja, um sistema enzimático complexo pois a reação demanda muita energia.

Existem grandes diferenças morfológicas e fisiológicas entre os organismos diazotróficos, entretanto, o processo executado é similar para todos (Fernández-Pascual et al., 2002). Os microrganismos fixadores de nitrogênio possuem um sistema enzimático chamado nitrogenase, e é este complexo enzimático o responsável pela redução da molécula de N_2 a NH_3 (Militão, 2004; Santos, 2015). Este complexo é constituído por duas subunidades de proteínas: uma, a dinitrogenase, com peso molecular elevado, contendo 24 átomos de ferro e 2 átomos de

molibdênio (FeMo-proteína); a outra, a dinitrogenase redutase (Fe-proteína), de peso molecular inferior, contém ferro e enxofre (Ludden, 2001; Hoffman et al., 2014).

Para que a reação ocorra, é necessário ATP e poder redutor (ferredoxina, FAD). Os hidratos de carbono são necessários à produção de ATP, poder redutor e fornecem os esqueletos carbonados para incorporação de NH_3 (Havlin et al., 2014). Os microrganismos que fixam nitrogênio obtêm a energia necessária através da oxidação destas moléculas orgânicas, os hidratos de carbono. Os microrganismos de vida livre não fotossintéticos devem obter essas moléculas de outros organismos, enquanto os microrganismos fotossintéticos, como as cianobactérias, usam açúcares produzidos pela fotossíntese. Microrganismos fixadores de nitrogênio associativos e simbióticos obtêm esses compostos da rizosfera de suas plantas hospedeiras.

O ATP e os elétrons da cadeia transportadora (ferredoxina) induzem modificações na conformação da Fe-proteína (dinitrogenase redutase) convertendo-a em um redutor capaz de transportar elétrons para a FeMo-proteína (dinitrogenase) que reduz o N_2 a NH_3 . Neste processo são requeridos de 15 a 30 ATP por molécula de N_2 reduzida, deste modo, a subunidade menor fornece os elétrons para a redução do N_2 pela subunidade maior (Ludden, 2001).

Concentrações elevadas de oxigênio podem interromper a atividade da nitrogenase além de causar danos irreversíveis à enzima. Para atenuar essas dificuldades, e reduzir a tensão de O_2 , os microrganismos fixadores de nitrogênio criaram alternativas que visam tornar o ambiente anaeróbico. Dentre as alternativas estão a criação de barreiras físicas de proteção, saída forçada de O_2 e eliminação pelo metabolismo. Desta forma, reduzem a concentração para níveis aceitáveis perto do complexo enzimático, promovem a alteração da nitrogenase, de modo a resistir a inativação (Soto-Urzúa e Baca, 2001).

3.3. *Methylobacterium symbioticum*

O gênero *Methylobacterium* é composto por diferentes espécies de bactérias que se encontram distribuídos no solo, ar, poeira, água (doce e salgada), sedimentos e ambientes como banheiros e ar condicionado (Van Aken et al., 2004). Espécies do gênero *Methylobacterium* podem ser encontradas em associação com mais de 70 espécies de plantas (Omer et al., 2004), podendo ocupar as superfícies de folhas, nódulos e grãos.

As bactérias deste gênero são gram-negativas e apresentam como características taxonômicas a forma de bastonete reto e metabolismo estritamente aeróbio. Podem crescer utilizando compostos de apenas um carbono (C1), como metanol e metilamina (Toyama et al., 1998) e geralmente apresentam pigmentação rósea, devido à síntese de carotenóides (Van Dien et al., 2003), sendo por estas características denominadas de PPFM (*Pink-Pigmented Facultative Methylophics*).

Outra característica importante é que estas bactérias podem fixar nitrogênio atmosférico (por meio de um sistema de nitrogenase dependente) (Agafonova et al., 2014), nodular a planta hospedeira, mobilizar P, produzir o fitohormônio citocinina e as enzimas pectinase e celulase, o que permite promover o crescimento vegetal devido à disponibilidade de nitrogênio e, durante o processo de colonização da planta hospedeira, induzir resistência sistêmica (Madhaiyan et al., 2006; Lee et al., 2006). Também é possível atribuir a *Methylobacterium* sp. um aumento na capacidade fotossintética da planta hospedeira em virtude do aumento no número de estômatos, do teor de clorofila e do conteúdo de ácido málico (Cervantes-Martinez et al., 2004).

Na agricultura, bactérias *Methylobacterium* spp. desempenham um papel em várias aplicações biotecnológicas, melhorando significativamente o rendimento de plantas que receberam tratamentos que incluíam estes microrganismos (Madhaiyan et al., 2007). Deste modo, bactérias deste gênero são isoladas frequentemente para testagem *in vitro* e em ensaios de campo para avaliar seu efeito em plantas e para a caracterização fenotípica e genotípica.

Pascual et al. (2020) isolaram da parte interna de esporos do fungo micorrízico *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* uma cepa do gênero *Methylobacterium*, que foi identificada como SB0023/3T, posteriormente nomeada como *Methylobacterium symbioticum*. Essa bactéria é gram-negativa, estritamente aeróbia, em forma de bastonetes e a temperatura ótima de crescimento situa-se em 28 °C. Uma vez que a cepa foi identificada como uma nova espécie, realizaram-se ensaios para avaliar seu efeito em plantas.

A cepa isolada demonstrou sua capacidade endofítica ao ser encontrada no interior da raiz e folhas da planta, além de mover-se pelo xilema, não sendo afetada por qual parte é inoculada (raiz ou folhas). Os ensaios realizados para testar o efeito da inoculação em campo, em arroz, milho e videira para vinho mostraram que, em geral, promoveu um aumento no rendimento, permitindo redução do teor médio de nitrogênio aplicado, demonstrando seus efeitos como bioestimulante ou biofertilizante. Deste modo, foi identificada sua potencialidade para uso na agricultura moderna (Pascual et al. 2020).

Com o intuito de reduzir a aplicação de fertilizantes nitrogenados e promover a agricultura sustentável, a *Methylobacterium symbioticum* foi utilizada para a produção de um biofertilizante comercial, o BlueN® (Corteva agriscience). Este bioestimulante foi desenvolvido para proporcionar o fornecimento de nitrogênio por meios biológicos e estabilizar o funcionamento ecológico e a produtividade dos ecossistemas, uma vez que contém estirpe exclusiva da bactéria fixadora de nitrogênio (Hubel Verde, 2020).

Dentre as propriedades do bioestimulante, pode-se citar a rápida colonização da filosfera da planta pela estirpe, ainda durante as primeiras fases de desenvolvimento, o que permite uma elevada capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e efeito estimulante para o desenvolvimento da cultura tratada. Além do efeito nutricional, dentre as referidas propriedades do produto destaca-se também a capacidade de atuar positivamente na fisiologia das plantas ao retardar o envelhecimento das células vegetais e prolongar a atividade fotossintética. Acresce ainda a possibilidade de promover o crescimento das raízes, melhorando o acesso a água e nutrientes, um aumento da qualidade e da vida pós-colheita dos frutos e do rendimento das culturas. A sua aplicação é recomendada para hortícolas (abobrinha, acelga, alface, batata, beringela, brócolis, cebola, cenoura, ervilhas, pepino, pimentão, rabanete, repolho, tomate...), frutíferas (citrinos, frutos secos, melancia, melão, morango), cereais (aveia, arroz, cevada, milho, trigo...), leguminosas de grão (soja), algodão e vinha (Hubel Verde, 2020).

3.4. A CULTURA DA ALFACE

3.4.1. Descrição da cultura

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta anual herbácea, que pertence à família Asteraceae e gênero *Lactuca*, do qual estão identificadas mais de 100 espécies. É uma cultura de domesticação antiga, sendo cultivada na região mediterrânica desde 2500 a. C.. (Almeida, 2006). É originária de espécies silvestres ainda encontradas em algumas regiões, nomeadamente no Sul da Europa e na Ásia Ocidental. Chegou ao Brasil através dos portugueses, no ano de 1647 (Almeida, 2006). A domesticação resultou em diversas modificações morfológicas e fisiológicas, nomeadamente relacionadas ao aumento do tamanho dos aquênios, número e área das folhas, perda de pilosidade, formação de repolho e redução da acumulação de látex (Almeida, 2006).

É uma hortaliça de folhas grandes, delicadas e de consistência variada. As folhas podem ser crespas ou lisas e prendem-se ao caule em forma de roseta. Algumas possuem capacidade de formar repolho (cabeça) ou são soltas (sem formação de repolho). A coloração pode variar em tons esverdeados (de claro-amarelado à escuro) ou roxo. Estas características permitem distribuir as cultivares por seis grupos distintos: Repolhuda-Crespa; Repolhuda-manteiga; Tipo Solta-lisa; Tipo Solta-crespa; Tipo romana e Tipo mimosa (Filgueira, 2003).

O agrupamento dos tipos de alface é importante porque a diversidade nas características morfológicas e fisiológicas entre os grupos determina grandes diferenças na conservação pós-colheita e, conseqüentemente, nos aspectos de manuseio (Henz e Suinaga, 2009).

3.4.2. O cultivo da alface no Brasil e em Portugal

O Brasil cultiva inúmeros produtos hortifrutícolas de Norte a Sul do país, designadamente 117 variedades de frutas e 123 diferentes hortaliças (Conab, 2021). Entre as cinco principais frutas comercializadas internamente estão banana, laranja, maçã, mamão e melancia e dentre as hortaliças, destacam-se alface, batata, cebola, cenoura e tomate. De acordo com a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2020), a alface é a terceira hortaliça mais cultivada (em volume de produção) e a primeira em área cultivada, ocupando quase 50% da área plantada de hortaliças folhosas (Yokoro e Pereira, 2020). É a hortaliça que mais tem destaque, sendo o seu consumo geralmente na forma “in natura”, em saladas frescas e no preparo de sanduíches (ABCSEM, 2020). Em termos de demanda, o grupo de alfases mais cultivado é o das crespas, representando 62,1% do total cultivado, seguido pelo grupo das americanas (25,0%), alface lisa (10,2%) e alface roxa/vermelha (2,7%) (Yokoro e Pereira, 2020).

A maior parte da produção brasileira concentra-se no estado de São Paulo que comercializa cerca de 63% do volume total, onde também se concentra a maior quantidade de consumidores, seguido pelo Paraná (13,3% do volume) e pelos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (Yokoro e Pereira, 2020)

Na União Europeia, a alface é uma das hortícolas mais importantes, por conta de ser um produto de fácil aquisição e custo baixo (Moreira, 2018). Em Portugal, a produção de alface encontra-se próximo dos grandes centros populacionais, nomeadamente na zona litoral, como

a região Oeste, Entre Douro e Minho e Beira Litoral. Em todo o país, a alface pode ser cultivada em estufa e ao ar livre. Em 2020 a produção nacional portuguesa foi de cerca de 60 mil toneladas, em uma área de cultivo de 2.452 hectares, sendo a sétima hortícola mais produzida (INE, 2021).

3.4.3. Características culturais

O ciclo cultural da alface é relativamente curto e a planta pode ser colhida com poucos dias após o transplante. A duração do ciclo, que se divide entre o período vegetativo e o reprodutivo, varia de acordo com a cultivar, a região, a época e o modo de produção. Em estufa, o ciclo cultural tem duração de cerca de 6 a 8 semanas na época de primavera-verão e entre 10 e 12 semanas durante o inverno (Almeida, 2006; Moreira, 2018). Por se tratar de uma cultura com crescimento relativamente rápido, responde bem à disponibilidade de nitrogênio e necessita de nutrientes imediatamente disponíveis no solo ou no substrato (Almeida, 2006).

O cultivo da alface apresenta certas limitações, principalmente devido a sensibilidade às mudanças de temperatura, umidade e ocorrência de chuva (Gomes et al., 2005). A produção de alface depende da utilização de insumos, portanto o cuidado na escolha e/ou preparo do substrato é fundamental para o desempenho final das plantas, tanto no aspecto nutricional como no tempo necessário para seu crescimento e número de ciclos produtivos por ano (Filgueira, 2003; Freitas et al., 2013).

A aplicação de fertilizantes nitrogenados é de grande importância para esta cultura, pois a carência de nitrogênio atrasa o crescimento, reduz o número de folhas e a área foliar, aumenta a clorose das folhas e causa má formação do repolho. Contudo, a aplicação excessiva de nitrogênio interfere diretamente na qualidade e na quantidade de alface produzida, pois além de reduzir a produção, aumenta a senescência das folhas e reduz a formação do repolho (Sala et al., 2008). O desenvolvimento vegetativo excessivo pode favorecer o ataque de pragas e doenças (Almeida, 2006). Doses de adubação nitrogenada em excesso podem também resultar problemas na saúde humana pelo efeito da acumulação de nitratos, que quando ingerido em grandes quantidades resulta em formação de nitritos, que dentre outros problemas, pode ser cancerígeno (Miyazawa et al., 2001; Santos, 2015).

Em relação aos solos, a alface pode ser cultivada com sucesso em diversos tipos (Almeida, 2006). Contudo, adapta-se bem e apresenta melhor desenvolvimento em solos limo – argilosos. O sistema radicular pode ser muito ramificado e superficial, situando-se entre os primeiros 25 cm de solo quando a cultura é transplantada, ou ainda, ser pivotante e atingir cerca de 60 cm de profundidade caso seja cultivada por sementeira direta. Vale ressaltar que a alface pode ser sensível a solos muito ácidos ou muito alcalinos. Desta forma, valores de pH neutros, situados entre 6,5 e 7,2, permitem um bom desenvolvimento desta hortícola folhosa (Almeida 2006).

A maioria das cultivares desenvolve-se melhor em climas amenos, com temperaturas entre 15 e 20 °C, principalmente no período de crescimento vegetativo, pois temperaturas altas (entre 24 °C e acima dos 33 °C durante vários dias do ciclo cultural) podem acelerar o ciclo da cultura e afetar a qualidade da planta, tornando os caules alongados (Almeida, 2006). Temperaturas elevadas originam também floração prematura, o que induz um sabor amargo nas folhas e a inutiliza para o mercado (Maroto, 2000). Ainda, vale ressaltar que, dependendo do genótipo, pode resultar em plantas menores (Henz e Suinaga, 2009). Médias de temperatura muito baixas (próximas aos 7 °C) também prejudicam a qualidade e o ciclo da alface, reduzindo o seu crescimento (Almeida, 2006). Assim, a temperatura ideal para o desenvolvimento da alface está compreendida entre 15 °C e 18 °C, apesar de tolerar faixas de temperaturas mais elevadas, entre 26 °C a 29 °C, desde que as temperaturas noturnas sejam baixas (Almeida, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi instalado no município de Bragança, região de Trás-os-Montes, nordeste de Portugal. O ensaio foi realizado em vasos, dispostos em um abrigo situado ao lado do Laboratório de Solos (nas coordenadas $41^{\circ}47'52.52''$ N e $6^{\circ}45'56.08''$ W, com altitude de 674 metros) nas instalações da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (Figura 1). De acordo com a classificação de Köppen, o clima de Bragança é Csb, caracterizado por verão seco e pouco quente e por inverno chuvoso (IPMA, 2021a).



Figura 1. Imagem do local de implantação do experimento (Google Earth, 2022).

De acordo com os dados meteorológicos do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), as temperaturas médias das mínimas e máximas entre julho e outubro de 2021 na cidade de Bragança foram de 7,1 e 20,9 °C em maio, 11,8 e 26,0 °C em junho, 13,2 e 29,4 °C em julho, 13,6 e 31,3 °C em agosto, 11,4 e 24,5 °C em setembro e 8,2 e 20,9 °C em outubro. Já a precipitação total para estes mesmos meses foi de 4,0, 6,0, 8,0, 67,1 e 54,4 mm, respectivamente (IPMA, 2021b).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a condução do experimento utilizou-se um delineamento fatorial com dois fatores: fertilização nitrogenada, com quatro níveis de fator (D1, D2, D3 e D4, a que correspondem 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹); e produto comercial com *Methylobacterium symbioticum*, com dois níveis de fator (Com e Sem). De cada tratamento foram incluídas quatro repetições.

O nitrogênio foi aplicado na forma de Nitro 27 (27% N, 50% na forma nítrica e 50% na forma amoniacal). Foi ainda adicionado fósforo (P) e potássio (K) usando os adubos superfosfato de cálcio (18% de P₂O₅) e cloreto de potássio (60% de K₂O), nas doses de 1,98 e 0,6 g/vaso, respectivamente. Os ensaios foram instalados em vasos de polietileno, sendo necessário 32 vasos para todas as repetições.

4.3 INSTALAÇÃO E MANUTENÇÃO DO EXPERIMENTO

4.3.1. Instalação do experimento

O solo usado no experimento teve origem na camada arável (0-20 cm) de uma parcela em pousio nos dois anos anteriores, localizada no arboreto das estufas da Escola Superior Agraria de Bragança.

No estudo foram usados 3 kg de solo seco por vaso, crivado em malha de 2 mm. O solo está classificado como Regossolo de origem coluvial e apresenta textura franco argiloarenosa. Contém 24,2% de argila, 21,7% de limo e 54,1% de areia. No início da instalação do ensaio apresentava pH próximo da neutralidade (pH_{H2O} = 6,8) e um teor em carbono orgânico baixo, com 11,7 g kg⁻¹. Os valores de P e K extraíveis (lactato de amónio) foram classificados de médios, 85,7 mg P₂O₅ kg⁻¹ e 94,0 mg K₂O kg⁻¹, respetivamente. A capacidade de troca catiónica foi classificada de média, com um valor de 17,9 cmol₊ kg⁻¹.

Na preparação dos vasos foram adicionados os fertilizantes fosfatados e potássicos nas doses referidas anteriormente e metade do adubo nitrogenado referido no delineamento experimental. A outra metade do adubo nitrogenado foi aplicada a meio do ciclo cultural.

Foram efetuados dois ciclos de alface, tendo o primeiro iniciado em 24 de maio de 2021 e encerrado dia 27 de julho de 2021. O segundo ciclo teve início em 20 de agosto de 2021 e terminou em 15 de outubro de 2021. O microrganismo foi aplicado nas mesmas datas da adubação de cobertura e nas doses equivalentes ao recomendado pelo fabricante, 333 g ha⁻¹

(cálculo efetuado para uma densidade de plantação de 140.000 alfaces ha⁻¹). A aplicação foliar foi feita com auxílio de um borrifador. No primeiro ciclo a adubação de cobertura e a aplicação do microrganismo ocorreram em 30 de junho e no segundo ciclo em 17 de setembro. Em ambos os ciclos foi utilizada a variedade de alface Maravilha de Verão. As mudas foram obtidas na feira municipal de Bragança e posteriormente transplantadas para os vasos, no estado de três folhas verdadeiras. Para o transplante, foi realizada uma pequena cova no centro de cada vaso com o auxílio de uma espátula de jardim, onde foram colocadas as raízes de cada muda.

4.3.2. Manutenção do ensaio

Após o transplante das mudas de alface o ensaio foi diariamente monitorado. Conforme a necessidade, as plantas eram regadas ajustando-se a periodicidade de acordo com as condições ambientais e em função do estado hídrico aparente do solo e da planta no momento da rega. Ao meio do primeiro e durante o segundo ciclo a frequência de rega passou a ser diária devido ao aumento da evapotranspiração e o rápido esgotamento da água no solo. Realizou-se o controle manual das plantas infestantes e dos afídeos durante os dois ciclos vegetativos das alfaces.

4.4. DETERMINAÇÕES EM CAMPO

4.4.1. Determinação da intensidade da cor verde das folhas

A meio dos ciclos foi determinada a intensidade da cor verde das folhas, uma medida indireta do teor de clorofila, utilizando o medidor portátil SPAD (Soil and Plant Analysis Development) – 502, que faz estimativas não destrutivas e rápidas de clorofila foliar com base nas propriedades de transmitância espectral das folhas. Este equipamento determina a intensidade da cor verde das folhas, que está relacionada com o conteúdo de clorofila, constituindo-se como um indicador do estado nutricional em nitrogênio.

4.4.2. Estimativa da área foliar

Ao final de cada ciclo foi realizada a estimativa da área foliar por meio do método de discos foliares. Este método consistiu na retirada de discos foliares de área conhecida em duas posições do limbo foliar, evitando a amostragem da nervura central. Em seguida, os discos foliares foram colocados em estufa com circulação de ar a 70 °C até a obtenção de massa constante. Posteriormente os discos foram pesados em balança analítica. A área foliar foi estimada pela Equação 1, onde: AF é a área foliar estimada pelo método; PP é a massa seca da planta; AD é a área conhecida do disco retirado da folha; e PD é a massa seca dos discos.

$$AF = \frac{PP \times AD}{PD}$$

Equação 1. Cálculo da estimativa da área foliar.

4.5. COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Ao final de cada ciclo as alfaces foram colhidas junto ao solo com auxílio de uma faca. As plantas foram cortadas em múltiplas partes para facilitar a secagem. Após os cortes, as alfaces foram levadas para uma estufa de ventilação forçada Memmert, regulada a 70 °C, até obtenção de peso constante. Posteriormente as amostras foram pesadas para a determinação da massa seca e moídas em moinho Cyclotec 1030 FOSS, com um crivo de 1 mm de malha.

4.6. ANÁLISES LABORATORIAIS

A seguir descrevem-se procedimentos analíticos realizados para a determinação da composição elementar dos tecidos vegetais.

4.6.1. Determinação do nitrogênio

Utilizou-se o método Kjeldahl em que o nitrogênio é medido após a digestão da amostra e posteriormente é realizada a titulação em equipamento automático. Este procedimento envolve três passos: o primeiro consiste na conversão do nitrogênio orgânico em nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) através de digestão sulfúrica; o segundo passo consiste na destilação do digerido com NaOH para promover a formação de NH_3 ; o terceiro passo consiste na quantificação do nitrogênio por titulação. Para a digestão, pesou-se 1 g de amostra de material vegetal em tubos de digestão. Então, adicionou-se 15,0 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-97%) e duas pastilhas de um catalisador (selênio) para aumentar a taxa de oxidação da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico. Na reação forma-se sulfato de amônio. Em seguida as amostras foram aquecidas a 400 °C por 60 minutos para promover a oxidação da amostra. As amostras já digeridas foram encaminhadas para o equipamento Kjeltec TM 8400 Autoanalyser FOSS. O íon NH_4^+ é então transformado em NH_3 por ação de NaOH. A amônia é então arrastada numa corrente de vapor para uma solução recetora de ácido bórico com indicadores. A amônia reage com o ácido bórico para formar NH_4^+ . Segue-se uma titulação com uma solução de HCl para a quantificação de N (Bremner, 1996).

4.6.2. Determinação de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês

A determinação destes nutrientes foi feita após mineralização das amostras num equipamento de digestão por microondas (*MARS, CEM corporation*). DE cada amostra pesou-se 0,25 g para tubos de digestão e adicionou-se 10 mL de ácido nítrico. Estes tubos foram fechados e levados para digestão por 30 minutos a 120 °C. A solução obtida foi diluída em água deionizada até 50 mL. Nesta solução foram determinados os nutrientes P, K, Ca, Mg, Cu, Fe Zn e Mn. Na determinação do fósforo promoveu-se o desenvolvimento de uma cor azul, usando o método azul de molibdato e o ácido ascórbico como agente redutor (Temminghoff e Houba, 2004). Nesta determinação foi utilizado um espectrofotómetro GENESYS e o comprimento de onda de 882 nm. Os restantes elementos (cátions) foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica num equipamento Perkin Elmer Pinaacle 900 T.

4.6.3. Determinação de boro

Pesou-se um grama de amostra para cadinhos onde se adicionou 0,10 g de óxido de cálcio. Após a homogeneização, a amostra sofreu incineração a 500 °C e as cinzas foram diluídas com 10 mL de ácido sulfúrico (0,5 M). Depois de 30 minutos filtrou-se a suspensão e transferiu-se uma alíquota de 1 mL para tubos de 10 ml onde procedeu-se o desenvolvimento de cor pelo método da azometina-H. A concentração de boro foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda 420 nm (Temminghoff e Houba, 2004).

4.6.4. Determinação de nitratos

Para avaliação dos teores de NO_3^- , um grama de matéria seca foi colocado em contato com 50 ml de água deionizada e agitado por um período de 30 minutos a uma velocidade de 160 rpm. Após filtração com filtro de papel Watman 42, foi determinada a concentração do íon NO_3^- no extrato em espectrofotômetro, na gama ultravioleta a 220 nm. Em simultâneo foi feita uma segunda leitura a 275 nm para eliminar interferências associadas à presença de compostos orgânicos dissolvidos. O valor final é obtido após subtração da leitura feita a 275 nm à leitura a 220 nm (Baird et al. 2017).

4.7. ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram inicialmente analisados para a normalidade e homogeneidade de variância, usando os testes Shapiro-Wilk e Bartlett's, respetivamente. Em seguida foram submetidos a análise de variância de dois fatores ou de duas vias. Quando ocorreram diferenças significativas, as médias foram separadas usando o teste de comparação múltipla de médias Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos não apresentam interação entre os dois fatores estudados (Dose de N e Microrganismo), desta maneira, são detalhados isoladamente para cada fator.

5.1. MATÉRIA SECA E ÁREA FOLIAR DAS PLANTAS

Os resultados da produção de matéria seca no primeiro ciclo de crescimento da alface são apresentados na Figura 2. Quando avaliado o fator Microrganismo, houve diferença significativa entre os tratamentos Com e Sem Microrganismo. Pode observar-se que os valores médios mais elevados foram obtidos no tratamento Com Microrganismo (11,4 contra 9,8 g vaso⁻¹). Avaliando-se o fator Dose de N, os valores médios mais elevados foram obtidos nos vasos do tratamento D4 (12,9 g vaso⁻¹) e D3 (11,4 g vaso⁻¹), com diferenças significativas para os demais tratamentos. Os valores mais baixos foram observados nos vasos do tratamento D2 (9,5 g vaso⁻¹) e da testemunha D1 (8,7 g vaso⁻¹).

No segundo ciclo de crescimento (Figura 3), os resultados mostraram um comportamento similar aos obtidos no primeiro ciclo. Para o fator Microrganismo, os valores mais elevados de matéria seca foram obtidos no tratamento Com (14,6 g vaso⁻¹) em comparação com o tratamento Sem (10,7 g vaso⁻¹) Microrganismo. Para o fator Dose de N, os valores médios mais elevados foram obtidos nos vasos com o tratamento D4 (15,6 g vaso⁻¹), com diferenças significativas para os tratamentos D2 (12,1 g vaso⁻¹) e D1 (8,9 g vaso⁻¹). Entre os tratamentos D2 e D1 as diferenças também foram significativas.

Comparando os valores médios de matéria seca produzida nos dois ciclos de cultivo, e tendo por base os níveis de aplicação de nitrogênio, os valores variaram entre 8,7 e 12,9 g vaso⁻¹ no primeiro ciclo e entre 8,9 e 15,6 g vaso⁻¹, mostrando-se assim mais elevados no segundo ciclo sobretudo para as doses mais elevadas do nutriente.

Para a produção de matéria seca, a inoculação das plantas de alface com *Methylobacterium symbioticum* promoveu um incremento de 14% no primeiro ciclo e 26,7% no segundo ciclo. O aumento das doses de nitrogênio incrementou a produção de matéria seca em 67,5% e 42% no primeiro e segundo ciclo.

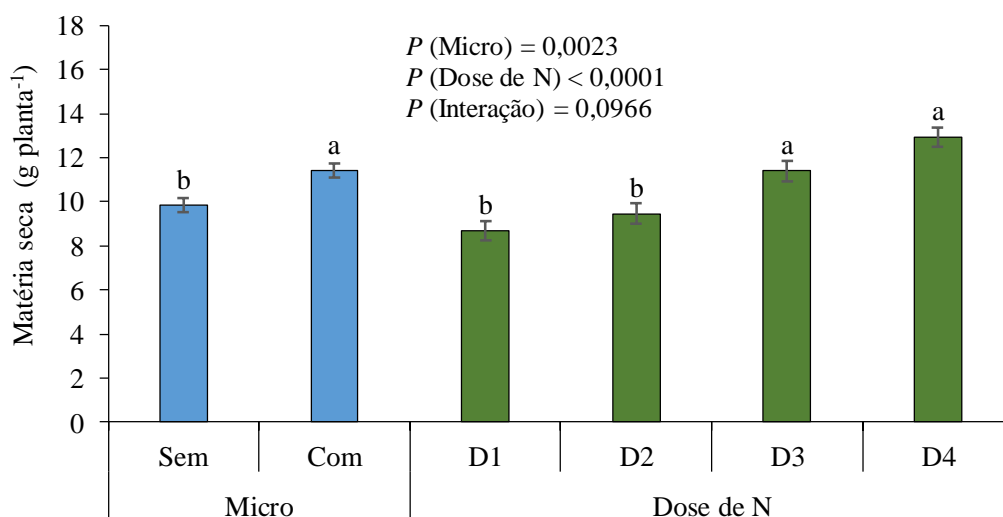


Figura 2. Matéria seca produzida no primeiro ciclo da alface, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

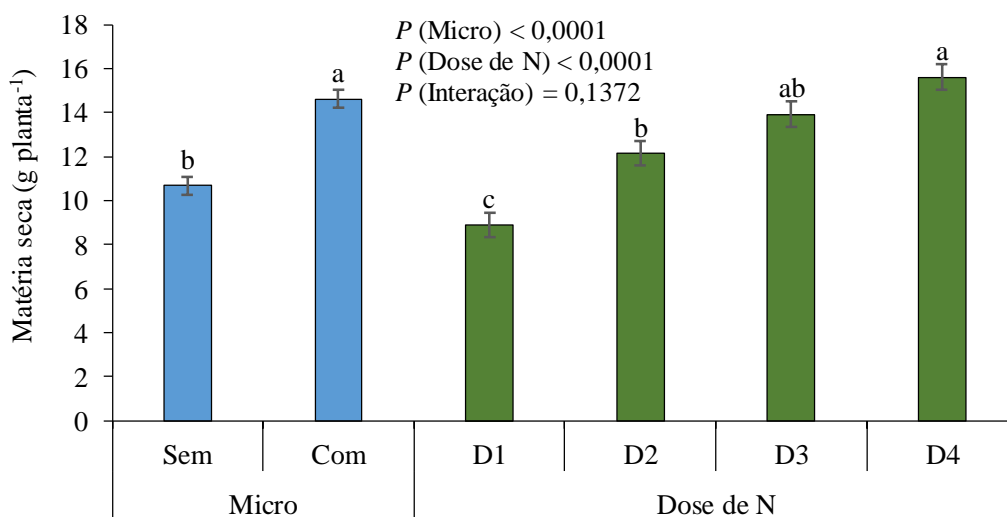


Figura 3. Matéria seca produzida no segundo ciclo da alface, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

Os valores de área foliar por planta no primeiro ciclo do ensaio são apresentados na Figura 4. Quando avaliado o fator Microrganismo, houve diferença significativa entre os tratamentos Com (99,4 dm²) e Sem (69,3 dm²) Microrganismo, sendo os valores médios mais elevados observados no tratamento Com Microrganismo. Quando avaliado o fator Dose de N,

não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Os valores médios variaram entre 72,8 e 95,2 dm².

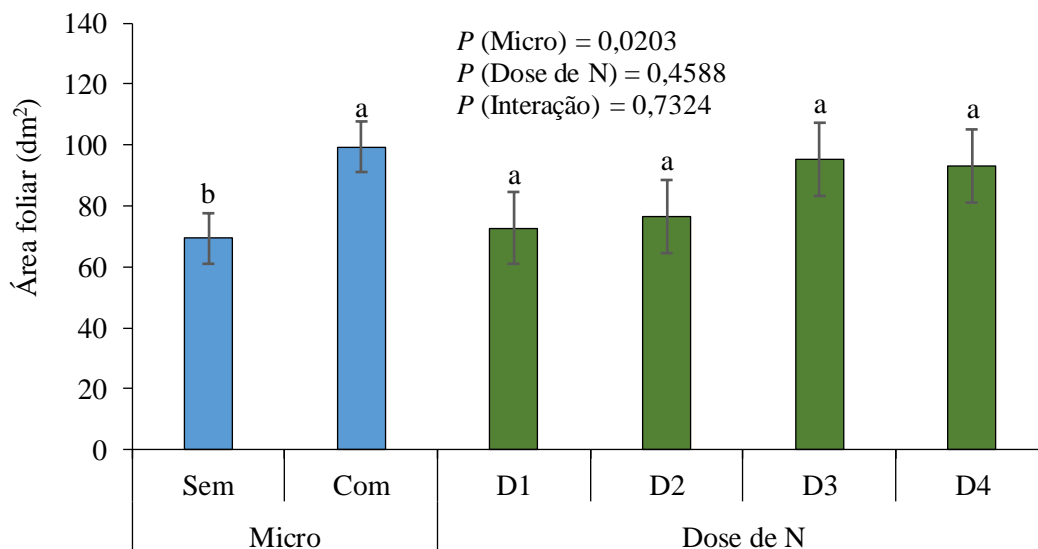


Figura 4. Área foliar por planta no primeiro ciclo da alface, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

Os resultados de área foliar correspondentes ao segundo ciclo cultural da alface estão expostos na Figura 5.

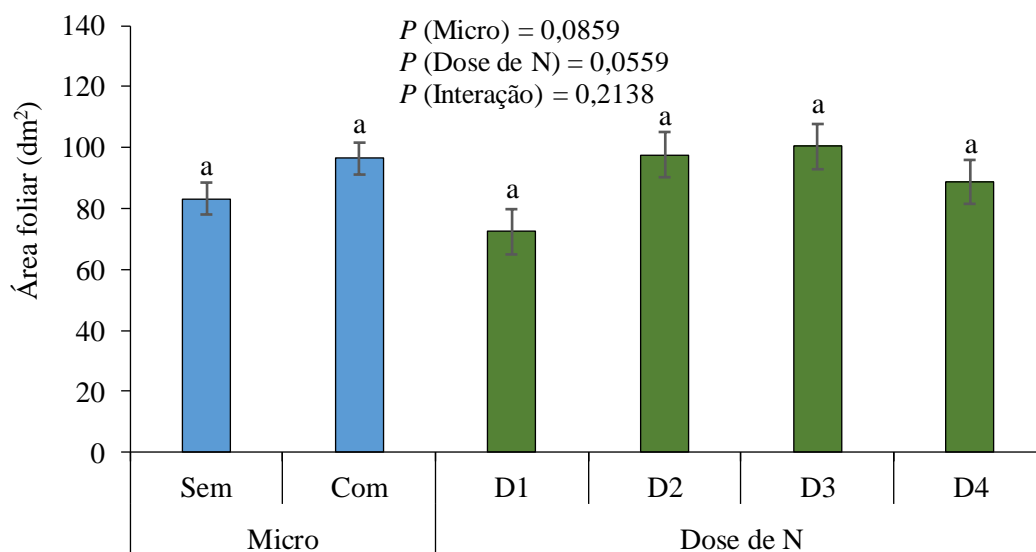


Figura 5. Área foliar por planta no segundo ciclo da alface, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

De maneira geral, os resultados mostraram valores da mesma ordem de grandeza que os do primeiro ciclo. Contudo, ao contrário dos resultados do primeiro ciclo, não ocorreram diferenças entre os tratamentos Com e Sem microrganismo. Para o fator Dose de N também não se observaram diferenças significativas entre tratamentos. No segundo ciclo, considerando as diferentes doses de nitrogênio, os valores médios variaram entre 72,5 e 100,4 dm^2 .

Para a área foliar, obteve-se um incremento de 30% em função da inoculação do microrganismo, enquanto que as doses crescentes de nitrogênio promoveram um aumento de 23,5% em relação à testemunha no primeiro ciclo da cultura. No segundo ciclo, não houve diferença significativa entre os tratamentos de ambos os fatores.

5.2. CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NOS TECIDOS E INDICADORES DE ESTADO NUTRITIVO NITROGENADO

Na Figura 6 é apresentada a concentração de nitrogênio nos tecidos da alface cultivada no primeiro ciclo. Quando avaliado o fator Microrganismo, não houve diferença significativa entre os tratamentos Com (31,8 g kg^{-1}) e Sem (33,6 g kg^{-1}) Microrganismo. A maior dose de fertilizante nitrogenado (D4) originou concentrações de nitrogênio nas folhas (38,9 g kg^{-1}) significativamente mais elevadas que nos demais tratamentos. Os valores mais baixos foram obtidos no tratamento D1 (25,2 g kg^{-1}), sendo estes significativamente mais baixos que os dos tratamentos D2 (31,8 g kg^{-1}) e D3 (34,9 g kg^{-1}). Entre os dois últimos não foram observadas diferenças significativas.

No segundo ciclo da cultura (Figura 7) pode-se observar que houve diferença significativa entre os tratamentos do fator Microrganismo. O tratamento Sem Microrganismo resultou em valores médios mais elevados (33,8 g kg^{-1}), enquanto que os mais baixos foram observados no tratamento Com Microrganismo (27,6 g kg^{-1}). Neste ciclo de crescimento, a concentração de nitrogênio na matéria seca da alface em D4 (37,3 g kg^{-1}) não diferiu significativamente da concentração de nitrogênio no tratamento D3 (33,9 g kg^{-1}). O tratamento D2 registou um valor (29,5 g kg^{-1}) significativamente mais baixo que o dos tratamentos D3 e D4 e significativamente mais elevado que o do tratamento D1 (22,3 g kg^{-1}), em que não houve adubação nitrogenada.

Os níveis de nitrogênio nos tecidos da alface não variaram no primeiro ciclo em função da inoculação com microrganismo, entretanto, no segundo ciclo foram 18% inferiores quando

comparados ao tratamento que não continha microrganismo. Com a aplicação de doses crescentes de nitrogênio, evidenciou-se um incremento de 35% e 40% nos teores de nitrogênio no primeiro e segundo ciclo, em comparação ao tratamento em que não houve fertilização nitrogenada.

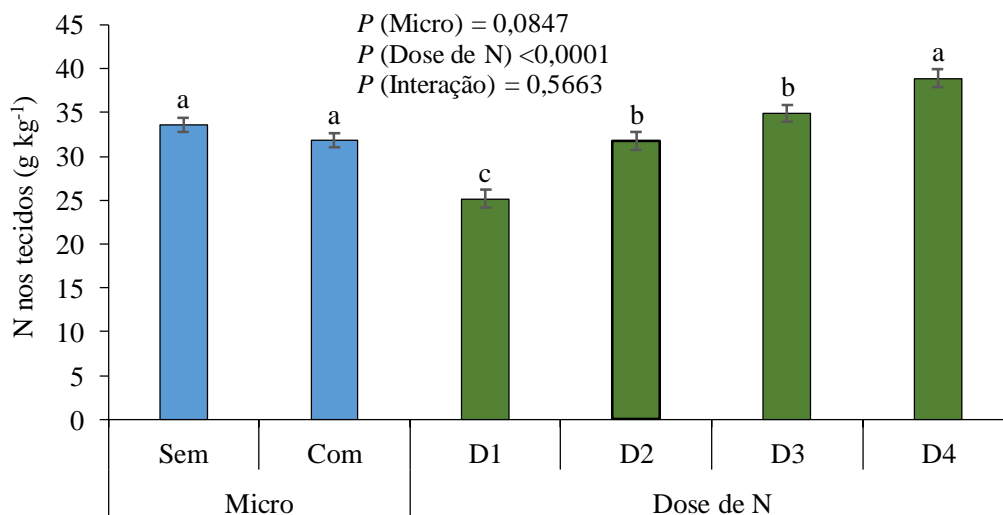


Figura 6. Concentração de nitrogênio (N) nos tecidos da alface produzida no primeiro ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹) submetidas. Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

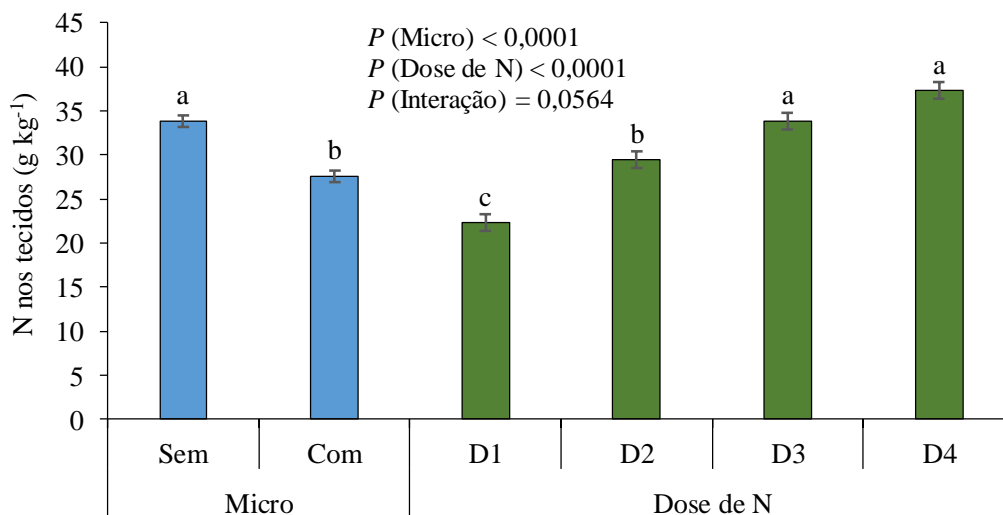


Figura 7. Concentração de nitrogênio (N) nos tecidos da alface produzida no segundo ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

A concentração de nitrato nos tecidos no primeiro ciclo da cultura da alface pode ser observada na Figura 8. Quando avaliado o fator Microrganismo, pode-se observar que o tratamento Sem Microrganismo apresentou maior acúmulo de nitrato nas folhas ($74,2 \text{ mg kg}^{-1}$) que o tratamento Com Microrganismo ($52,2 \text{ mg kg}^{-1}$). Para o fator Dose de N, pode-se observar que o tratamento D4 apresentou concentrações de nitrato nas folhas ($84,6 \text{ mg kg}^{-1}$) significativamente mais elevadas que os demais tratamentos. Os tratamentos D3 ($66,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e D2 ($69,9 \text{ mg kg}^{-1}$) não diferiram significativamente entre si e apresentaram valores significativamente mais elevados que o tratamento D1 ($32,3 \text{ mg kg}^{-1}$).

No segundo ciclo da alface (Figura 9), o tratamento Sem Microrganismo apresentou valores médios de nitrato nas folhas ($47,7 \text{ mg kg}^{-1}$) significativamente mais elevados que o tratamento Com Microrganismo ($31,3 \text{ mg kg}^{-1}$). Os valores de nitrato nos tecidos aumentaram de forma significativa e consistente com a dose de nitrogênio, variando de $28,7 \text{ mg kg}^{-1}$ em D1 a $50,0 \text{ mg kg}^{-1}$ em D4.

De maneira geral, os valores médios de NO_3^- nas folhas foram mais baixos que os do primeiro ciclo. Tendo por base as doses de nitrogênio, os valores médios variaram entre $32,9$ e $84,6 \text{ mg kg}^{-1}$ no primeiro ciclo e entre $27,8$ e $50,0 \text{ mg kg}^{-1}$ no segundo ciclo. O mesmo comportamento foi evidenciado tendo por base a presença do Microrganismo, os valores variaram entre $52,2$ e $74,2 \text{ mg kg}^{-1}$ no primeiro ciclo, enquanto que no segundo ciclo variaram entre $31,3$ a $47,7 \text{ mg kg}^{-1}$.

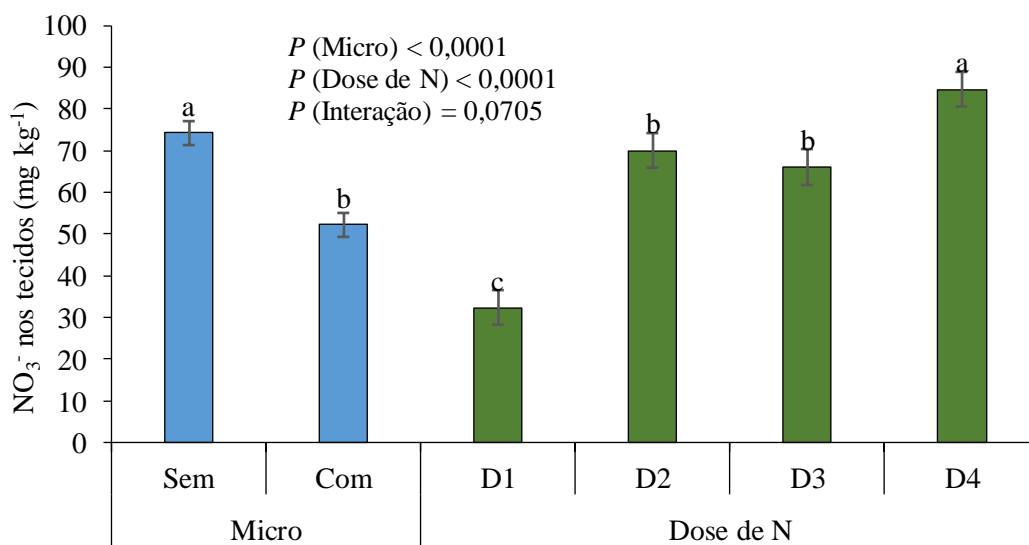


Figura 8. Concentração de NO_3^- nos tecidos da alface produzida no primeiro ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e $1,32 \text{ g N vaso}^{-1}$). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

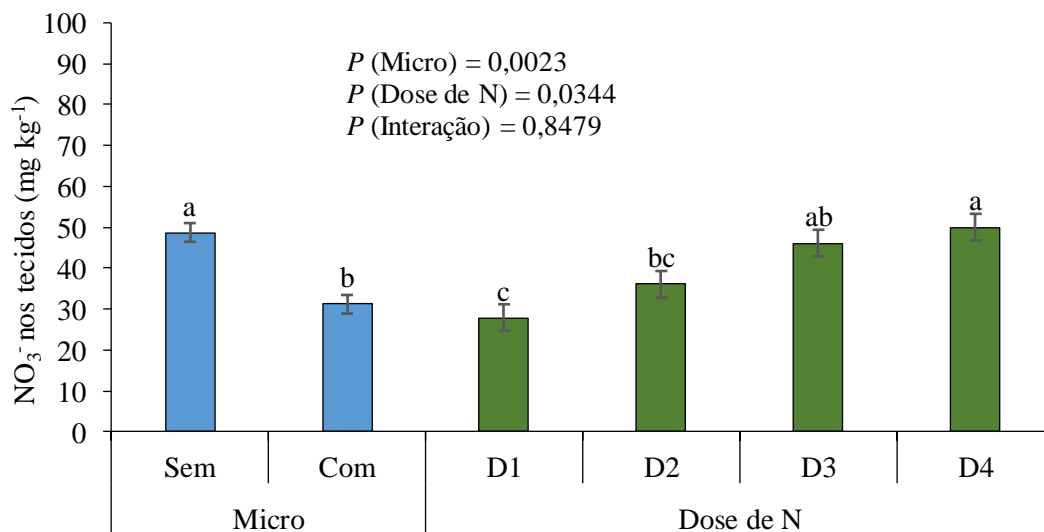


Figura 9. Concentração de NO₃⁻ nos tecidos da alface produzida no segundo ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

Na Figura 10 apresentam-se os valores das leituras com o aparelho SPAD no primeiro ciclo da cultura. O fator Microrganismo apresentou diferença significativa entre seus tratamentos. Os maiores valores médios de leituras SPAD foram observados no tratamento Com Microrganismo, 27,8 contra 25,0 no tratamento Sem Microrganismo. Entre doses de nitrogênio não se registraram diferenças significativas, ainda que os valores médios tenham aumentando entre D1 (25,2) e D4 (28,0).

No segundo ciclo da alface (Figura 11), os valores médios das leituras SPAD não diferiram significativamente para o fator Microrganismo, tendo variado entre 24,0 (Sem) e 24,9 (Com). O fator Dose de N apresentou diferenças significativas entre seus tratamentos e crescentes entre D1 (21,5) e D4 (28,4). Genericamente ocorreu o oposto que no primeiro ciclo da alface em que ocorreram diferenças entre tratamentos de aplicação de microrganismo, mas não se observaram diferenças entre doses de nitrogênio.

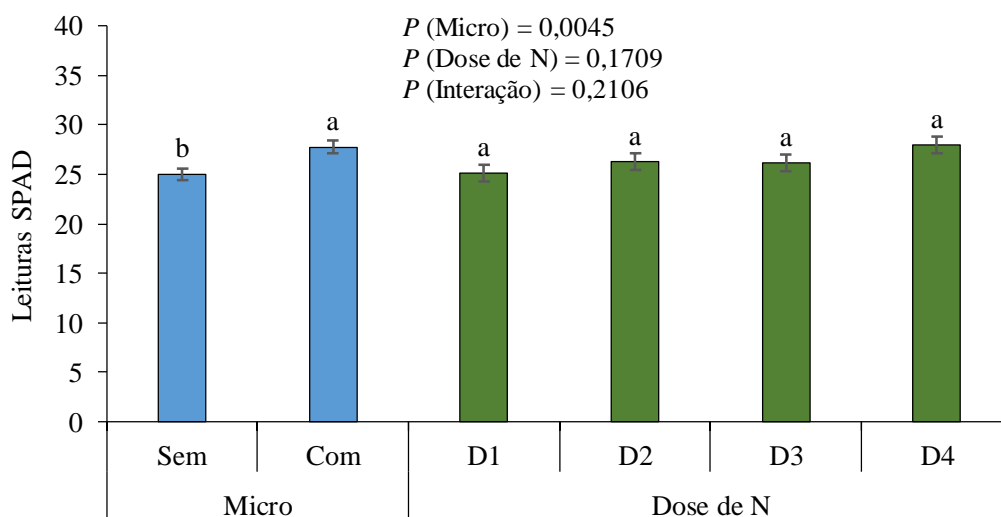


Figura 10. Leituras SPAD realizadas na alface produzida no primeiro ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

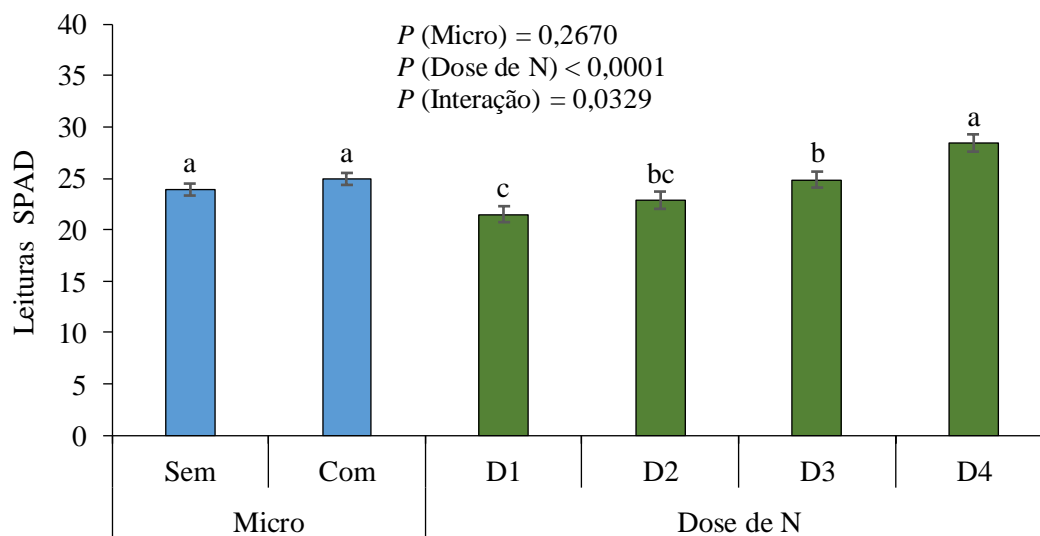


Figura 11. Leituras SPAD realizadas na alface produzida no segundo ciclo, nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

5.3. CONCENTRAÇÃO DOS MACRONUTRIENTES FÓSFORO, POTÁSSIO, CÁLCIO E MAGNÉSIO NAS FOLHAS

A concentração dos macronutrientes fósforo, potássio e cálcio não variaram significativamente entre tratamentos quer para a aplicação de microrganismo quer para a dose de N (Tabela 1). Tendo por referência os tratamentos com diferentes doses de nitrogênio, os valores médios de fósforo variaram entre 5,6 e 5,9 g kg⁻¹, os de potássio entre 89,7 e 93,5 g kg⁻¹ e os de cálcio entre 7,3 e 8,2 g kg⁻¹, teores semelhantes aos encontrados na literatura. Já no caso do macronutriente magnésio, analisando o fator Microrganismo, os teores médios foram significativamente mais elevados no tratamento Sem Microrganismo (4,4 g kg⁻¹ contra 4,0 g kg⁻¹ no tratamento Com Microrganismo). Quando se analisou a concentração de magnésio para o fator Dose de N, pode observar-se que foi no tratamento D1, onde não houve adubação nitrogenada, que se obtiveram valores significativamente mais baixos (3,4 g kg⁻¹) que nos tratamentos fertilizados (4,1 a 4,7 g kg⁻¹).

Tabela 1. Concentração média de fósforo, potássio, cálcio e magnésio na matéria seca da alfaca do primeiro ciclo nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respetivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio
	----- g kg ⁻¹ -----			
Micro (M)				
Sem	5,8 a	94,2 a	8,0 a	4,4 a
Com	5,8 a	89,9 a	7,6 a	4,0 b
Prob (M)	0,7268	0,3182	0,2039	0,0153
Erro padrão	0,08	2,98	0,21	0,11
Dose de N (DN)				
D1	5,6 a	89,7 a	7,6 a	3,4 b
D2	5,8 a	92,4 a	8,0 a	4,6 a
D3	5,9 a	93,5 a	7,3 a	4,1 a
D4	5,9 a	92,6 a	8,2 a	4,7 a
Prob (DN)	0,2502	0,9264	0,2075	<0,0001
Erro padrão	0,11	4,22	0,30	0,16
Prob (M × DN)	0,9923	0,8109	0,8746	0,5804

Analisando-se o segundo ciclo da cultura (Tabela 2), pode-se observar que os valores de fósforo e potássio para o fator Microrganismo foram significativamente mais elevados no

tratamento Sem Microrganismo, enquanto que os tratamentos não influenciaram significativamente nos teores de cálcio e magnésio.

A dose de nitrogênio influenciou de forma significativa a concentração de fósforo nos tecidos, mas de forma não coerente com a quantidade de nutriente aplicada (Tabela 2). Os teores de potássio tenderam a decrescer com o aumento da dose aplicada, sendo os valores de D1 e D2 significativamente mais elevados que os valores dos tratamentos D3 e D4. Na concentração de cálcio nas folhas, pode-se observar que os tratamentos não a influenciaram significativamente os resultados. Os valores médios mais elevados de magnésio foram observados no tratamento D4 (4,3 g kg⁻¹), onde houve a aplicação de uma maior dose de N, e decresceram de forma significativa para o tratamento D1 (3,6 g kg⁻¹), nos vasos sem aplicação de fertilizante nitrogenado. Globalmente, no segundo ciclo cultural registam-se concentrações nos tecidos mais elevadas de potássio, cálcio e magnésio.

Tabela 2. Concentração média de fósforo, potássio, cálcio e magnésio na matéria seca da alface do segundo ciclo nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respetivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Para cada fator, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio
	----- g kg ⁻¹ -----			
Micro (M)				
Sem	5,4 a	80,1 a	6,3 a	3,9 a
Com	4,6 b	66,7 b	6,1 a	3,8 a
Prob (M)	< 0,0001	< 0,0001	0,4097	0,3715
Erro padrão	0,07	1,10	0,15	0,12
Dose de N (DN)				
D1	4,8 b	79,6 a	6,1 a	3,6 b
D2	5,3 a	80,6 a	6,1 a	3,9 ab
D3	5,0 ab	72,4 b	6,0 a	3,7 ab
D4	4,9 b	60,9 b	6,7 a	4,3 a
Prob (DN)	0,0105	< 0,0001	0,0964	0,0349
Erro padrão	0,09	1,6	0,22	0,17
Prob (M × DN)	0,6698	0,0010	0,3942	0,6433

5.4. CONCENTRAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NOS TECIDOS VEGETAIS

Na Tabela 3 apresentam-se os teores médios de boro, ferro, manganês, zinco e cobre nos tecidos da alface no primeiro ciclo de cultivo. Quando os resultados de cada elemento são comparados no fator Microrganismo, pode-se observar que as concentrações de boro, ferro e manganês não diferiram significativamente entre os tratamentos. A concentração de zinco foi significativamente superior no tratamento Com Microrganismo, enquanto que para o cobre os valores mais elevados foram registados no tratamento Sem Microrganismo.

Quando as concentrações dos micronutrientes são analisadas para o fator Dose de N, pode-se verificar que as concentrações de ferro, zinco e cobre não foram influenciadas significativamente pelos tratamentos. Os valores médios de boro nas folhas foram superiores no tratamento D1 (54,6 mg kg⁻¹), e decresceram de forma significativa com a adubação nitrogenada, tendo os menores valores deste mesmo elemento sido obtidos no tratamento D4 (46,5 mg kg⁻¹), onde foi aplicada a maior dose de nitrogênio. Analisando o elemento manganês foi possível verificar que as menores concentrações ocorreram no tratamento D2 (50,0 mg kg⁻¹), cujos valores diferiram significativamente dos tratamentos D3 (65,2 mg kg⁻¹) e D4 (65,5 mg kg⁻¹).

Tabela 3. Concentração média de boro, ferro, manganês, zinco e cobre nos tecidos da cultura de alface do primeiro ciclo nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respetivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Na coluna, e para cada ciclo, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

	Boro	Ferro	Manganês	Zinco	Cobre
	----- mg kg ⁻¹ -----				
Micro (M)					
Sem	51,1 a	730,8 a	62,2 a	97,7 b	15,1 a
Com	50,4 a	696,1 a	58,9 a	142,9 a	13,6 b
Prob (M)	0,3837	0,6579	0,2804	< 0,0001	0,0445
Erro padrão	0,57	54,50	2,11	6,31	0,50
Dose de N (DN)					
D1	54,6 a	673,2 a	61,5 ab	122,8 a	13,3 a
D2	50,5 b	759,5 a	50,0 b	132,4 a	13,8 a
D3	51,3 b	775,8 a	65,2 a	128,6 a	15,5 a
D4	46,5 c	645,4 a	65,5 a	97,5 a	14,9 a
Prob (DN)	< 0,0001	0,5696	0,0044	0,0592	0,1373
Erro padrão	0,80	77,07	2,98	8,93	0,71
Prob (M × DN)	0,0065	0,0510	0,2578	0,0673	0,1307

No segundo ciclo da cultura (Tabela 4) as concentrações de ferro e zinco não diferiram significativamente quando avaliados em relação ao fator Microrganismo. Os elementos boro, manganês e cobre apresentaram diferenças significativas entre tratamentos, todos com valores médios superiores no tratamento Sem Microrganismo. Avaliando-se o fator Dose de N, os teores médios de ferro, manganês, zinco e cobre não diferiram significativamente entre tratamentos. Os tratamentos fertilizantes, porém, influenciaram nos teores de boro. Os vasos sem adubação nitrogenada (D1) apresentaram valores significativamente mais elevados de boro (48,6 mg kg⁻¹) que qualquer dos tratamentos fertilizados, enquanto que os tratamentos D3 (40,0 mg kg⁻¹) e D4 (39,4 mg kg⁻¹) apresentaram os menores valores deste micronutriente nas folhas e sem diferenças entre eles.

Tabela 4. Concentração média de boro, ferro, manganês, zinco e cobre nos tecidos da cultura de alface do segundo ciclo nos fatores Microrganismo (Micro) e Dose de N (D1, D2, D3 e D4, respectivamente 0, 0,33, 0,66 e 1,32 g N vaso⁻¹). Na coluna, e para cada ciclo, letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

	Boro	Ferro	Manganês	Zinco	Cobre
	----- mg kg ⁻¹ -----				
Micro (M)					
Sem	44,7 a	624,2 a	56,8 a	203,2 a	13,6 a
Com	41,7 b	592,0 a	50,4 b	132,7 a	12,0 b
Prob (M)	0,0018	0,5145	0,0433	0,0732	0,0023
Erro padrão	0,60	34,27	2,09	26,42	0,33
Dose de N (DN)					
D1	48,6 a	622,4 a	59,0 a	160,7 a	11,9 a
D2	44,8 b	645,0 a	52,4 a	225,9 a	12,3 a
D3	40,0 c	554,2 a	50,0 a	152,9 a	13,4 a
D4	39,4 c	610,9 a	53,1 a	132,4 a	13,7 a
Prob (DN)	< 0,0001	0,6006	0,2059	0,3443	0,0344
Erro padrão	0,84	48,67	2,95	37,36	0,47
Prob (M × DN)	0,0029	0,3071	0,5559	0,1095	0,8479

6. DISCUSSÃO

6.1. FATOR MICRORGANISMO

As bactérias do gênero *Methylobacterium* estão abundantemente presentes na filosfera das plantas e podem promover o crescimento e desenvolvimento da planta hospedeira através da produção de uma variedade de fitohormônios (Mizuno et al. 2013). Estes microrganismos utilizam compostos orgânicos como fonte de energia para o crescimento (Zhang et al., 2021). Isso é possível através da oxidação e assimilação do metanol, um subproduto associado ao metabolismo das plantas, que é utilizado como substrato para os PPFMs. A simbiose existente entre PPFMs e a filosfera gera muitos efeitos desejáveis no crescimento das plantas e na resistência a doenças.

Geralmente, os mecanismos usados por *Methylobacterium* sp. para promover o crescimento das plantas são relacionados à aquisição de nutrientes, produção de fitormônios e proteção contra fitopatógenos. Cervantes-Martinez et al. (2004) atribuíram ao endófito o aumento da atividade fotossintética em plantas, mediado pelo aumento do número de estômatos, aumento da concentração de clorofila e o teor de ácido málico na planta hospedeira. Estas características podem explicar o incremento de matéria seca observado nas plantas de alface tratadas com o microrganismo.

Vadivukkarasi e Bhai (2020) verificaram que plantas de gengibre pulverizadas com estirpes do gênero *Methylobacterium* mostraram aumento significativo em diversos parâmetros desta cultura, incluindo no número, comprimento, largura das folhas e na produtividade em comparação ao controle. Na cana de açúcar, estas bactérias são importantes endófitas consideradas responsáveis pelo aumento da germinação de sementes, da área foliar, da altura da planta e número de entrenós (Rossetto et al., 2011).

No estudo realizado por Madhaiyan et al. (2006), *Methylobacterium* sp. estimulou a germinação e o crescimento da cultura do amendoim em casa de vegetação, mostrando diferença significativa em relação ao controle. Estudos anteriores também relataram os efeitos benéficos da aplicação de bactérias metilotróficas através da embebição de sementes (Holland e Polacco, 1994) e pulverização da filosfera (Holland, 1997) no aumento do crescimento e produtividade da planta de soja. Hoppe et al. (2011) e Chanratana et al. (2018) relataram que a

promoção do crescimento de plantas ocorreu pela produção de fitormônios como citocininas e auxinas, melhoria da capacidade fotossintética e pela regulação da concentração de etileno.

Pascual et al. (2020) avaliaram o efeito da *Methylobacterium symbioticum* na planta em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Desde o início, a bactéria apresentou a capacidade de penetrar no tecido da planta e, movendo-se pelo xilema, não foi afetada pelo local de inoculação (raiz ou broto). Neste mesmo estudo, a nitrato redutase, uma enzima chave para a assimilação do nitrogênio (Schrader e Hageman, 2008), diminuiu nas plantas inoculadas, mas não teve um efeito negativo sobre o teor de clorofilas, medida através de SPAD (Pascual et al., 2020). No presente trabalho, em ambos os ciclos, o tratamento Com Microrganismo resultou em menores concentrações de nitrato nos tecidos. Este fato poderia sustentar a visão de que o nitrogênio atmosférico fixado através da *M. symbioticum* inibiu a atividade da enzima nitrato redutase através da produção de nitrogênio amoniacal, um composto intermediário de fixação de nitrogênio, que é demonstrada à inibição desta atividade enzimática (Hoffman et al., 2014).

Vários pesquisadores relataram a capacidade de promoção do crescimento de *Methylobacterium* em várias culturas e verificou-se que sua inoculação aumenta a atividade fotossintética, aumentando o número de estômatos e a concentração de clorofila (Ponnusamy et al., 2017). A contribuição dos microrganismos deste gênero pode ser evidenciada no primeiro ciclo da alface, em que o tratamento com *Methylobacterium* resultou em maiores valores na leitura SPAD.

Sivakumar et al. (2017) identificaram que a aplicação foliar de *Methylobacterium* e outros promotores do crescimento de plantas preveniram a quebra da clorofila durante a seca, levando à retenção da clorofila e retardo da senescência. Este resultado é corroborado com resultados encontrados em arroz, por Misratia et al. (2013) e por Madhaiyane et al. (2004), que observaram maior atividade fotossintética na cultivar de arroz que recebeu *Methylobacterium* e atribuíram o efeito ao aumento da concentração de clorofila, teor de ácido málico e aumento do número de estômatos. Meenakshi e Savalgi (2009) encontraram alto teor de clorofila no tratamento que recebeu tanto inoculação de sementes quanto pulverização foliar de *Methylobacterium*.

Pascual et al. (2020), constataram que a inoculação de *Methylobacterium symbioticum* permitiu reduzir a aplicação de nitrogênio em 50% sem qualquer perda de SPAD, que monitoraria o teor de clorofila e estado nutricional (Dourado et al., 2013). Os valores SPAD obtidos por Pascual et al. (2020) foram maiores no tratamento que forneceu apenas 50% do

nitrogênio requerido pela cultura do que a 100% da necessidade. De acordo com Omer et al. (2004) e Schauer et al. (2011), este fato pode ser explicado pela simbiose decorrente da necessidade de suprir o nitrogênio, provocado pela deficiência nutricional, enquanto com uma completa contribuição nutricional (100% do nitrogênio), a planta não necessita o nitrogênio potencial que o inóculo forneceria.

De maneira geral, os teores de macro e micronutrientes no tecido da planta não foram diretamente influenciados pela inoculação com *Methylobacterium symbioticum*, pois apresentaram formas variadas de comportamento entre os ciclos de cultivo. Desta forma, novas pesquisas devem ser realizadas para explicar e evidenciar as possíveis interações do microrganismo com os nutrientes.

6.2. FATOR DOSE DE NITROGÊNIO

A fertilização efetuada na alface influenciou a produção de matéria seca, a área foliar e o teor de nitrogênio mineral nas folhas. Em ambos os ciclos, foi possível observar que os vasos que receberam as maiores doses de nitrogênio (D3 e D4) apresentaram a maior produção de MS (g planta^{-1}) em comparação com o tratamento D2, que obteve valores muito próximos aos da modalidade testemunha (D1). Houve ainda, um incremento nos valores obtidos no segundo ciclo, sobretudo onde aplicaram-se as doses mais elevadas.

O nitrogênio é um macronutriente essencial para as culturas, e para a alface é o nutriente que mais interfere no crescimento vegetativo. Segundo Filgueira (2003), o nitrogênio favorece o crescimento vegetativo, o acúmulo de massa, o aumento da área foliar e, conseqüentemente, a expressão do potencial produtivo da alface. Para esta e as demais culturas folhosas hortícolas, uma maior área foliar, maior massa fresca e seca resultam, conseqüentemente, em maior produtividade (Araújo Neto et al., 2009).

Este aumento na biomassa em função de doses crescentes de nitrogênio pode ser apoiado nos resultados obtidos por Castro e Ferraz Jr (1998), Alvarenga et al. (2003), Yuri et al. (2004) e Resende et al. (2009) que observaram o efeito do nitrogênio sobre o aumento da produção de massa seca de alface. Almeida et al. (2011) observaram que a deficiência de nitrogênio afetou negativamente o crescimento da cultura, causando decréscimo na altura das plantas, área foliar, número de folhas, medida indireta da clorofila e massa seca das plantas de alface.

Quando avaliados os resultados da área foliar, pode-se perceber que em ambos os ciclos não houve diferença significativa entre os tratamentos, o que demonstra que as doses crescentes de nitrogênio não resultaram em crescente aumento da área foliar. Deste modo, o ganho de massa não pode ser atribuído apenas à área foliar, mas também à capacidade de aproveitamento da energia luminosa que envolve, sobretudo, o mecanismo de fixação de carbono, que é o responsável principal por governar o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Caron et al., 2012). Apesar da área foliar não variar em função do aumento das doses de nitrogênio, houve acúmulo de matéria seca em função deste tratamento.

A alface, por ser uma cultura composta basicamente por folhas, tem uma forte resposta a adubação nitrogenada (Resende et al., 2009). Segundo Marschner (1995), o nitrogênio é, normalmente, o elemento mineral encontrado em maior quantidade na matéria seca da alface. Diversos autores relatam o aumento do nitrogênio na alface com o incremento das doses de nitrogênio aplicado (Castro e Ferraz Jr, 1998; Tei et al., 2000; Chen et al., 2004; Yuri et al., 2004; Mantovani et al., 2005; Pôrto et al., 2008) O aumento da concentração de nitrogênio na planta com o incremento das doses de nitrogênio verificado neste estudo é uma resposta coerente em alface, uma vez que no primeiro e segundo ciclos, o tratamento D1, correspondente à testemunha, apresentou os menores teores de nitrogênio ($25,2 \text{ g kg}^{-1}$ e $22,3 \text{ g kg}^{-1}$) comparativamente ao tratamento D4, que apresentou as maiores concentrações de nitrogênio nas folhas ($38,9 \text{ g kg}^{-1}$ e $37,3 \text{ g kg}^{-1}$).

Grande parte do nitrogênio contido nas folhas é integrante das enzimas que estão associadas aos cloroplastos e participam da síntese das moléculas de clorofila (Zotarelli et al., 2003). Desta forma, sua medição indireta serve como medida de nitrogênio na planta (Almeida et al., 2011) e pode ser utilizado como ferramenta para se verificar deficiências nutricionais desse elemento. Segundo Taiz e Zeiger (2004), o teor de clorofilas nas folhas é influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, estando diretamente relacionado com o potencial de atividade fotossintética das plantas. Desta forma, uma maior eficiência fotossintética tem correlação direta com o rendimento da cultura, pois conseqüentemente acelera a taxa de crescimento da planta, aumentando a produção de massa seca (Heringer e Moojen, 2002; Quadros e Bandinelli, 2005). No primeiro ciclo, os valores SPAD não tiveram diferenças significativas entre os tratamentos, o que não era esperado, visto que o nitrogênio faz parte da constituição da molécula de clorofila, e por este motivo se esperaria que sua ausência afetasse na formação da clorofila. Isso demonstra que apesar da maior disponibilidade de nitrogênio, a planta não o converteu integralmente em pigmentos fotossintéticos (Pereira, 2015).

Pôrto et al. (2008), em experimento utilizando adubação nitrogenada, constataram aumento linear dos teores de clorofila em função das doses de nitrogênio. Além disso, observaram uma correlação positiva entre o teor de nitrogênio foliar e o teor de clorofila nas folhas de alface. Este comportamento foi observado no segundo ciclo da cultura, onde o aumento da disponibilidade de nitrogênio no solo incrementou a sua absorção e o teor de nitrogênio na folha, resultando em uma elevação dos teores de clorofila (D1, 21,5; D4, 28,4), observada através da leitura SPAD. Como resposta, obteve-se uma maior eficiência fotossintética e maior produtividade em matéria seca da alface no segundo ciclo. Este comportamento corrobora com o exposto por Taiz e Zeiger (2004) e com os resultados obtidos por Carvalho et al. (2003) para a cultura do feijoeiro. Em ambos os ciclos, o valor de clorofila SPAD apresentou-se ligeiramente superior aos resultados encontrados por Santos et al. (2010) que, trabalhando com alface, obtiveram a média de 22,5 (unidade SPAD) e por Graciano (2019), cujos valores observados situaram-se entre 15,2 e 22,5.

O aumento das doses de nitrogênio resultou em incremento nos teores de nitrato. No primeiro ciclo, o tratamento D4 apresentou concentrações de nitrato nas folhas ($84,6 \text{ mg kg}^{-1}$), significativamente mais elevados que o tratamento D1 ($32,3 \text{ mg kg}^{-1}$) que não recebeu fertilização nitrogenada. Este comportamento ocorreu novamente no segundo ciclo, com teores de nitrato na ordem de $28,7 \text{ mg kg}^{-1}$ em D1 a $50,0 \text{ mg kg}^{-1}$ em D4. Esses resultados demonstram uma relação direta entre a elevação na disponibilidade de nitrogênio e o acúmulo de nitrato pelas plantas, em concordância com o trabalho de diversos outros autores (Castro e Ferraz Jr, 1998; Chen et al., 2004; Pôrto et al., 2008; Pôrto et al., 2012 Liu et al., 2014).

A disponibilidade de nitrogênio, juntamente com a intensidade luminosa, é o fator que mais exerce influência no acúmulo de nitrato pelas plantas. Cometti et al. (2004) relatam que o acúmulo de nitrato pelas plantas ocorre quando, havendo disponibilidade de nitrogênio no sistema, a planta o absorve em maior quantidade em relação à capacidade de redução e assimilação, estocando-o em seus vacúolos na forma de nitrato. Assim, maior disponibilidade de nitrogênio através da utilização de fertilizantes minerais, orgânicos ou na composição de soluções nutritivas, irão ocasionar acúmulo de nitrato nos tecidos (Pôrto et al., 2012).

Comparando os dados de produção de matéria fresca (Figuras 1 e 2) com os das quantidades acumuladas de nitrato na parte aérea das plantas (Figuras 7 e 8), verificou-se que, com o aumento das doses de nitrogênio, houve maior acúmulo de nitrato do que acréscimo de matéria fresca. Este resultado, também encontrado por Mantovani et al. (2005) permite afirmar

que as maiores doses de nitrogênio resultaram em maiores perdas em qualidade (pelo aumento do acúmulo de nitrato nos tecidos) do que ganhos de produção de matéria seca (g vaso^{-1}).

O acúmulo de nitrato nos alimentos tornou-se tema de discussão no que diz respeito à segurança alimentar e nutricional, pois, quando ingerido em grandes quantidades, pode ser prejudicial à saúde (Pôrto et al., 2008). Na União Europeia, fixaram-se limites máximos de nitrato por quilograma de alface produzido. Quando cultivada em ambiente protegido, os teores de nitrato podem variar de 2500 mg no verão a 4000 mg por kg de matéria fresca no inverno. Quando a produção ocorre ao ar livre, os limites variam de 3500 a 4500 mg por kg de matéria fresca, respectivamente no verão e no inverno (Pôrto et al., 2008). Neste estudo, os teores de nitrato acumulados nos tecidos da alface apresentaram-se muito inferiores aos permitidos pela legislação, assim como pelos resultados encontrados em diferentes sistemas de cultivo de alface avaliados por Pedrinho et al. (2021).

De maneira geral, ocorreu um incremento nos teores de magnésio com a aplicação de doses crescentes de nitrogênio, resultado também observado por Resende et al. (2012). Segundo Malavolta (2006), entre as principais funções do magnésio nas plantas destaca-se a sua participação na clorofila e ativação de um grande número de enzimas, principalmente, as fosforilativas. Desta forma, o aumento dos teores de magnésio em função do aumento dos teores de nitrogênio no tecido pode estar relacionado com as funções complementares desses nutrientes na composição da molécula de clorofila, onde cada átomo de magnésio está ligado a quatro átomos de nitrogênio. Uma tendência que deve ser considerada é que, em ambos os ciclos, no tratamento D3 há uma ligeira redução dos teores de magnésio nos tecidos. Também é possível visualizar a redução dos teores de boro nos tecidos em função do aumento da dose de nitrogênio aplicada na cultura. Segundo Rodrigues (2000), este efeito pode ser atribuído à uma relação de antagonismo na absorção de boro pelo nitrogênio.

7. CONCLUSÕES

No primeiro ciclo da cultura, a inoculação com *Methylobacterium symbioticum* resultou em maior produção de matéria seca da alface, maior área foliar, maior valor nas leituras SPAD, menor concentração de nitrato e não influenciou nos teores de nitrogênio nos tecidos. No segundo ciclo da cultura, as alfaces tratadas com microrganismo apresentaram novamente maior produção de matéria seca e menores teores nitrato nos tecidos. Neste ciclo, observou-se também uma menor concentração de nitrogênio. Entretanto, o tratamento com microrganismo não influenciou na área foliar nem nos valores das leituras SPAD.

Para os valores de macro e micronutrientes não se constata uma alteração coerente entre os ciclos, em função dos tratamentos do fator Microrganismo. Desta forma, pode-se sugerir que a inoculação de *Methylobacterium symbioticum* não tem capacidade de influenciar o comportamento da alface em relação aos macros e micronutrientes.

A maior dose de nitrogênio resultou, no primeiro ciclo da cultura, em maior produção de matéria seca e maiores concentrações de nitrogênio e nitrato nos tecidos comparativamente à testemunha, que não recebeu fertilização nitrogenada. Entretanto, não se registraram diferenças significativas entre tratamentos nos valores de área foliar e das leituras SPAD. No segundo ciclo da cultura, o comportamento das crescentes doses de nitrogênio foi muito semelhante ao primeiro ciclo, contudo, as leituras SPAD também foram maiores à medida em que se aumentou a dose de nitrogênio, enquanto que a área foliar novamente não foi influenciada.

As doses crescentes de nitrogênio influenciaram no aumento da concentração de magnésio nos tecidos da alface cultivadas no primeiro e segundo ciclo, enquanto que, para fósforo, potássio e cálcio não foi possível estabelecer uma influência direta. As doses crescentes de nitrogênio resultaram em menores concentrações de boro nos tecidos da planta, enquanto que os demais nutrientes não sofreram influência dos acréscimos nas doses de nitrogênio.

7. REFERÊNCIAS

- ABCSEM (Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças). (2020) **Manual técnico: Cultivo de Hortaliças**. 4 ed. Campinas, SP: ABCSEM, 125 p.
- Agafonova, N. V.; Kaparullina, E. N.; Doronina, N. V.; Trotsenko, Y. A. (2014) Phosphate-solubilizing activity of aerobic methylobacteria. **Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 28-32.
- Agrobio (Associação Portuguesa da Agricultura Biológica). (2020) **O que é a agricultura biológica?** Disponível em: <<https://agrobio.pt/agricultura-biologica/o-que-e/>>. Acesso em: 24 jan. 2022.
- Almeida, D. (2006) **Manual de culturas hortícolas**. Lisboa: Editorial Presença.
- Almeida, T. B. F.; Prado R. M.; Corrêa, M. A. R.; Puga, A. P.; Barbosa, J. C. (2011) Avaliação nutricional da alface cultivada em soluções nutritivas suprimidas de macronutrientes. **Biotemas**, v. 24, n. 1, p.27-36.
- Altieri, M. A. (2018) **Agroecology: the science of sustainable agriculture**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press.
- Alvarenga, M. A. R.; Silva, E. C., Souza, R. J.; Carvalho, J. G. (2000) Efeito de doses de nitrogênio aplicadas no solo e níveis de cálcio aplicados via foliar sobre o teor e o acúmulo de micronutrientes em alface americana. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.4, p.905-916.
- Amado, T. J. C.; Mielniczuk, J.; Fernandes, S. B. V. (2000) Leguminosas e adubação mineral como fontes de nitrogênio para o milho em sistemas de preparo do solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v 24, p. 179-189.
- Araújo Neto, S. E.; Ferreira, R. L. F.; Pontes, F. S. T. (2009) Rentabilidade da produção da orgânica de cultivares de alface com diferentes preparos de solo e ambiente de cultivo. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1362-1368.
- Baird, R. B.; Eaton, A. D.; Rice, E. W. L.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D. (2017) **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater**. 23 ed. APHA, AWWA, WEF.
- Beijerinck, M. W. (1901) Über oligotrophile Mikroben. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, **Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 7, p. 561- 582.
- Berdugo, S. B. (2012) **Fixação biológica de N₂ e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ associadas às espécies *Eutерpe edulis* e *Guapira opposita***. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Bremner, J. M. (1996) **Nitrogen-Total**. In: Sparks, D. L. (Ed.) Methods of soil analysis. Part 3- Chemical Methods. SSSA. Book series nº 5. Madison, Wisconsin.

Caron, B. O.; Souza, V. Q.; Trevisan, R.; Behling, A.; Schmidt, D.; Bamberg, R.; Eloy, E. (2012) Eficiência de conversão da radiação fotossinteticamente ativa interceptada em fitomassa de mudas de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 36, p. 833-842.

Carvalho, M.A.C.; Furlani Junior, E.; Arf, O.; Sá, M. E.; Paulino, H. B.; Buzetti, S. (2003) Doses e épocas de aplicação de nitrogênio e teores foliares deste nutriente e de clorofila em feijoeiro. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 27, n. 3, p. 445-450.

Castro, S. R. P. de.; Ferraz Junior, A. S. L. (1998) Teores de nitrato nas folhas e produção de alface cultivada com diferentes fontes de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, v.16, n.1, p.65-68.

Cervantes-Martinez, J.; Lopez-Diaz, S.; Rodriguez-Garay, B. (2004) Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser induced fluorescence. **Plant Science**, v.166, p.889-892.

Chanratana, M.; Han, G. H.; Joe, M. J.; Choudhury, A. R.; Sundaram, S.; Halim, M. A.; Sa, T. (2018) Evaluation of chitosan and alginate immobilized *Methylobacterium oryzae* CBMB20 on tomato plant growth. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, p. 1489–1502.

Chen, B. M.; Wang, Z. H.; Li, S. X.; Wang, G. X.; Song, H. X.; Wang, X. N. (2004) Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. **Planta Science**, v. 167, p. 635-643.

Cometti, N. N.; Matias, G. C. S.; Zonta, E.; Mary, W.; Fernandes, M. S. (2004) Compostos nitrogenados e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 748-753.

Conab (Companhia Nacional De Abastecimento). (2021) **Boletim Hortigranjeiro**, Brasília, DF, v. 7, n. 2.

Cooper, J.; Scherer, H. (2012) Nitrogen fixation. *In*: Marschner, P. (Ed.) **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Londres: Academic Press, p. 389-408.

Cui, Z.; Wang, G.; Yue, S.; Wu, L.; Zhang, F.; Chen, X. (2014) Closing the N-use efficiency gap to achieve food and environmental security. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 10, p. 5780-5787.

DGADR (Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural). (2017) **Guia para o produtor biológico**: Produção vegetal e animal, Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. Disponível em: <https://www.dgadr.gov.pt/images/docs/val/mpb/Guia_Produtor_Biologico.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2022.

Döbereiner, J. (1995) Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *In*: International symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation, Angra dos Reis. **Abstracts** [...] Angra dos Reis: The National Centre for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), p.3-4.

Döbereiner, J.; Baldani, V. L. D.; Baldani, J. I. (1995) **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 60p.

Döbereiner, J.; Pedrosa, F.O. (1987) **Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants**. Madison: Science Tech, 155p.

Dourado, M. N.; Bogas, A. C.; Pomini, A. M.; Andreote, F. D.; Quecine, M. C.; Marsaioli, A. J.; Araújo, W. L. (2013) Methylobacterium- plant interaction genes regulated by plant exudate and quorum sensing molecules. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 1331–1339.

Dutta, D.; Puzari, K. C.; Gogoi, R.; Dutta, P. (2014) Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n.5, p 621-629.

Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). (2018) **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1090820>. Acesso em 10 jan. de 2022.

Evans, H. J.; Burris, R. H. (1992) Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. *In*: Stacey, G.; Burris, R. H.; Evans, H. J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p. 1-42.

Fernandes Júnior, P. I.; Araújo, A. P. (2013) Contribuições para a melhoria da eficiência da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro comum no Brasil. **Tópicos de Ciência do Solo**, v.8, p.251-291.

Fernández-Pascual, M.; María, N.; Felipe, M. R. (2002) Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes. **Ciencia y media Ambiente**, p. 195-202.

Ferreira, E. P. B.; Mercante, F. M.; Hungria, M. Mendes, I. C.; Araújo, J. L. S.;

Filgueira, F. A. R. (2003) **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV. p. 295-300.

Forcelini, D. (2020) **Desenvolvimento da parte aérea e radicular de plantas jovens de oliveira após a aplicação de micorriza comercial**. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Bragança. Bragança.

Freitas, A. F.; Silva, R. R.; Barros, H. B.; Vaz-De-Melo, A.; Abrahão, A. P. (2013) Produção de mudas de alface em função de diferentes combinações de substratos. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 44, n. 1, p. 159-166.

Gomes, T. M.; Botrel, T. A.; Modolo, V. A.; Oliveira, R. F. (2005) Aplicação de CO₂ via água de irrigação na cultura da alface. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 316-319.

Gomez, S. P. M. (2012) **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica de nitrogênio na Mata Atlântica**. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Graciano, P. D. (2019) Biofortificação agrônômica com zinco em cultivares de alface crespa. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia.

- Graham, P. H.; Vance, C. P. (2003) Legumes: Importance and constraints to greater utilization. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 872-877.
- Hardoim, P. R.; Overbeek, L. S. V.; Elsas, K. D. V. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471.
- Havlin, J. L.; Tisdale, S. L.; Nelson, W. L.; Beaton, J. D. (2014) **Soil fertility and fertilizers, an introduction to nutrient management**. 8. ed. USA: Pearson.
- Henz, G. P.; Suinaga, F. A. (2009) Tipos de Alface Cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças**, 7 p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado técnico, 75).
- Heringer, I.; Moojen, E. L. (2002) Potencial produtivo, alterações da estrutura e qualidade da pastagem de milho submetida a diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p.875-882.
- Hoffman, B. M.; Lukoyanov, D.; Yang, Z-Y.; Dean, D. R.; Seefeldt, L. C. (2014) Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage. **Chemical Reviews**. v. 114, n. 8, p. 4041–4062.
- Holland, M. A. (1997) *Methylobacterium* and plants. **Recent Research Developments in Plant Physiology**, v. 1, p. 207–213.
- Holland, M. A.; Polacco, J. C. (1994) PPFMs and other contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 197–209.
- Hoppe, T.; Peters, K.; Schmidt, F. (2011) *Methylobacterium bullatum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from *Funaria hygrometrica*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 482–486.
- Hubel Verde. (2020) **Ficha Técnica de Produto**: BLUEN Referência: FT-00294. Hubel Verde - Engenharia Agronomica, S. A.
- INE (2021) **Estatísticas Agrícolas - 2020**. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P.
- IPMA (2021a) **Clima de Portugal Continental**. Lisboa: Instituto Português do Mar e da Atmosfera.
- IPMA (2021b) **Boletim Climatológico Mensal**: Portugal continental. Lisboa: Instituto Português do Mar e da Atmosfera.
- Joo, H. S.; Deyrup, S. T.; Shim, S. H. (2021) Endophyte-produced antimicrobials: a review of potential lead compounds with a focus on quorum-sensing disruptors. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, n. 3, p. 543-568.
- Kannaiyan, S. (2002) **Biotechnology of Biofertilizers**. New Delhi: Narosa Publishing House.
- Lambais, M. R.; Crowley, D. E.; Cury, J. C.; Bull, R. C.; Rodrigues, R. R. (2006) Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1917-1917.
- Lee, H.S.; Madhaiyan, C.W.K.; Choi, S.J.; Chung, K.Y.; Sa, T.M. (2006) Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylotrophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p.402-408.
- Lindow, S. L.; Brandl, M. T. (2003) Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 4, p. 1875–1883.

- Liu, C-W.; Sung, Y.; Chen, B-C.; Lai, H-Y. (2014) Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Environmental Research and Public Health**, n. 4, v. 11, p. 4427-4440.
- Lodewyckx, C.; Vangronsveld, J.; Porteous, F.; Moore, E. R. B.; Taghavi, S.; Mezgeay, M.; Lelie, D. van der. (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Review in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606.
- Luchese, E. B.; Favero, L. O. B.; Lenzi, E. (2002) **Fundamentos da química do solo: Teoria e Prática**. 2. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos.
- Ludden, P. W. (2001) **Nitrogenase complex**. USA: University of Wisconsin.
- Madhaiyan, M.; Poonguzhali, S.; Sa, T. (2007) Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). **Planta**, v. 226, n. 4, p.867–876.
- Madhaiyan, M.; Poonguzhali, S.; Senthilkumar, M.; Sundaram, S.; Heekyung, C.; Jinchul, Y.; Subbiah, S.; Tongmin, S. A. (2004) Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Bot. Bull. Acad. Sin**, v. 45, p. 315-324.
- Madhaiyan, M.; Reddy, B. V. S.; Anandham, R.; Senthilkumar, M.; Poonguzhali, S.; Sundaram, S.P.; Sa, T.M. (2006) Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, v.53, n. 4, p.270-276.
- Malavolta, E. (2006) **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agrônoma Ceres, 638 p.
- Mantovani, J. R.; Ferreira, M. E.; Cruz, M. C. P. (1995) Produção de alface e acúmulo de nitrato em função da adubação nitrogenada. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.3, p.758-762.
- MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). (2016) **Agricultura de baixa emissão de carbono: (Programa ABC – Fixação Biológica de Nitrogênio)**. Brasília: MAPA/ACS.
- Marin, V. A.; Baldani, V. L. D.; Teixeira, K. R. dos S.; Baldani, J. I. (1999) Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. **Embrapa**, 24 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 91).
- Maroto, J.V. (2000) **Horticultura: Herbacea Especial**. 4. ed. Jerusalém: Mundi-Prensa.
- Marschner, H. (1995) **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic Press, 889 p.
- Maunoury, N.; Kondorosi, A.; Kondorosi, E.; Mergaert, P. (2008) Cell Biology of Nodule Infection and Development. *In*: Dilworth, M. J.; James, E. K.; Sprent, J. I.; Newton, W. E. (Eds.) **Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses**. Netherlands: Institut des Sciences du Végétal.
- Mayz-Figueroa, J. (2004) Fijación biológica de nitrógeno. **Revista UDO Agrícola**, v. 4, n. 1, p. 1-20.

- Meenakshi, B. C.; Savalgi, V. P. (2009) Effect of co-inoculation of *Methylobacterium* and *Bradyrhizobium japonicum* on plant growth dry matter content and enzyme activities in soybean. **Karnataka J. Agric. Sci.**, v. 22, p. 344-348.
- Militão, C. M. T. (2004) **Estudo do Ciclo do Azoto, uma aplicação para o ensino**. Dissertação (Mestrado em Biologia para o Ensino) - Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Mirza, M. S.; Ahmad, N.; Latif, F.; Haurat, J.; Bally, R.; Normand P.; Malik, K. A. (2001) Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) on micropropagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, v. 237, p. 47-54.
- Misratia, K. M.; Ismail, M. R.; Hakim, M. A.; Musa, M. H.; Puteh, A. (2013) Effect of salinity and alleviating role of gibberellic acid (GA₃) for improving the morphological, physiological and yield traits of rice varieties. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 11, p. 1682-1692.
- Miyazawa, M.; Khatounian, C.A.; Penha, L.A.O. (2001) Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. **Agroecologia Hoje**, n. 2, p. 23.
- Mizuno, M.; Yurimoto, H.; Iguchi, H.; Tani, A.; Sakai, Y. (2013) Dominant colonization and inheritance of *Methylobacterium* sp. strain OR01 on perilla plants. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** v. 77, n. 7, p. 1533–1538.
- Mizuno, M.; Yurimoto, H.; Iguchi, H.; Tani, A.; Sakai, Y. (2013) Colonização dominante e herança de *Methylobacterium* sp. estirpe OR01 em plantas de perila. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 7, p. 1533–1538.
- Moreira, F. M. S.; Silva, K. da; Nóbrega, R. S. A.; Carvalho, F. de (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n. 2, p. 74-99.
- Moreira, I. N. (2018) **Caracterização da acumulação de elementos potencialmente tóxicos em alface (*Lactuca sativa* L.)**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) – Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Newton, A. C.; Gravouil, C.; Fountaine, J. M. (2010) Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. **Annals of applied biology**, v. 157, n. 3, p. 343–359.
- Omer, Z. S.; Tombolini, R.; Gerhardson, B. (2004) Plant colonization by pink-pigmented facultative methylophilic bacteria (PPFMs). **FEMS Microbiology Ecology**, n. 47, p. 319–326.
- Omer, Z.S.; Tombolini, R.; Gerharson, B. (2004) Plant colonization by pink-pigmented facultative methylophilic bacteria (PPFMs). **FEMS Microbiology Ecology**, v.46, p. 319-326.
- Pascual, J. A.; Ros, M.; Martínez, J.; Carmona, F.; Bernabé, A.; Torres, R.; Lucena, T.; Aznar, R.; Arahal, D. R.; Fernández, F. (2020) *Methylobacterium symbioticum* sp. nov., a new species isolated from spores of *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2031–2041.
- Pedrinho, D. R.; Bimbato, S. M.; Bono, J. A. M.; Matias, R.; Aguiar, E. B.; Araújo, G. M de; Sauer, A. V.; Oliveira, A. S. (2021) Teor de nitrato em alface cultivada em diferentes sistemas de produção. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. 1-9.

- Pereira, A. K. S. (2015) Épocas de aplicação e doses de nitrato de cálcio em alface americana. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Goiás, Goiás.
- Ponnusamy, V.; Shanmugam, J.; Gopal, M.; Sundaram, S. (2017) **Perspectives of plant-methylotrophic interactions in organic farming**. In: Microorganisms for green revolution. Singapore: Springer, p. 167–187.
- Pôrto, M. L. A.; Alves, J. C.; Souza, A. P.; Araújo, R. C.; Arruda, J.A.; Tompson Júnior, U. A. (2012) Doses de nitrogênio no acúmulo de nitrato e na produção da alface em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 539-543.
- Pôrto, M. I.; Alves, J. C.; Souza, A. P.; Araujo, R. C.; Arruda, J. A. (2008) Nitrate production and accumulation in lettuce as affected by mineral nitrogen supply and organic fertilization. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 227-230.
- Quadros, F. L. F.; Bandinelli, D. G. (2005) Efeitos da adubação nitrogenada e de sistemas de manejo sobre a morfogênese de *Lolium multiflorum* Lam. e *Paspalum urvillei* Steud. Em ambiente de várzea. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 44-53.
- Rai, M. K. (2009) **Handbook of Microbial Biofertilizers**. New York: Food Products Press.
- Resende, G. M.; Alvarenga, M.A.R.; Yuri, J. E.; Souza, R. J. de. (2012) Rendimento e teores de macronutrientes em alface americana em função de doses de nitrogênio e molibdênio. **Horticultura Brasileira**, vol. 30, n. 3, p. 373-378.
- Resende, G. M.; Alvarenga, M.A.R.; Yuri, J. E.; Souza, R. J.; Mota J. H.; Carvalho, J. G.; Rodrigues Jr, J.G. (2009) Rendimento e teores de macronutrientes em alface americana em função das doses de nitrogênio e molibdênio em cultivo de verão. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 153-163.
- Rocha, C. G.; Cardoso, A. A. (2021) Gases de nitrogênio reativo como precursores do aerossol atmosférico: reações de formação, processos de crescimento e implicações ambientais. **Química Nova**, v. 44, n. 4, p. 460-472.
- Rossetto, P. B.; Dourado, M. N.; Quecine, M. C.; Andreote, F. D.; Araújo, W. L.; Azevedo, J. L.; Pizzirani-Kleiner, A. A. (2011) Specific plant induced biofilm formation in *Methylobacterium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 42, v. 3, p. 878–883.
- Sala, F. C.; Costa, C. P.; Teixeira, L. D.; Fabri, E. G.; Blat, S. F. (2008) Reação de cultivares de alface a *Thielaviopsis basicola*. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 398-400.
- Santos, C. M.; Gonçalves, E. R.; Endres, L.; Gomes, T. C. A.; Jadoski, C. J.; Nascimento, L. A. (2010) Atividade Fotossintética em alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes compostagens de resíduos industriais. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.3, n. 3, p. 95-112.
- Santos, J. Q. (2015) **Fertilização, fundamentos agroambientais da utilização dos adubos e corretivos**. Porto: Publinústria.
- Santos, T. T.; Varavallo, M. A. (2011) Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212.
- Schauer, S.; Kampfner, P.; Wellner, S.; Spröer, C.; Kutschera, U. (2011) *Methylobacterium marchantiae* sp. nov., a pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from

the thallus of a liverwort **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 870–876.

Schepers, J.S., Raun, W.R. (2008) **Nitrogen in Agricultural Systems**. 49 ed. Madison, WI: American Society of Agronomy.

Schrader, L. E.; Hageman, R. H. (2008) Regulation of nitrate reductase activity in corn (*Zea mays* L.) seedlings by endogenous metabolites. **Plant Physiology**, v. 42, n. 12, p. 1750–1756.

Sharma, A. K. (2005) **The living soil**. In: Biofertilizers for Sustainable Agriculture. Jodhpur, India: Agrobios, p. 1-19.

Sivakumar, R.; Nandhitha, G. K.; Chandrasekaran, P.; Boominathan, P.; Senthilkumar, M. (2017) Impact of pink pigmented facultative methylotroph and PGRs on water status, photosynthesis, proline and NR activity in tomato under drought. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 1640-1651.

Soto-Urzúa, L.; Baca, B. E. (2001) Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. **Revista latino-americana de microbiología**, v. 43, n. 1, p. 37-50.

Stevenson, F. J. (1986). **Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients**. New York: John Wiley & Sons, 380 p.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) **Fisiologia vegetal**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 719p.

Tei, F.; Benincasa, P.; Guiducci, M. (2000) Effect of nitrogen availability on growth and nitrogen uptake in lettuce. **Acta Horticulturae**, v. 533, p. 385-392.

Temminghoff, E. J. M.; Houba, V. J. G. (2004) **Plant Analysis Procedures**. 2 ed. London: Kluwer Academic Publishers.

Toyama, H.; Anthony, C.; Lidstrom, M. E. (1998) Construction of insertion and deletion mxa mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.166, n. 1, p.1-7.

UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação a Ciência e a Cultura). (2015) - **Agenda de Desenvolvimento pós-2015: UNESCO e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em <<http://www.unesco.org/new/pt/brasil/post-2015-development-agenda/>>, acessado em 20 dez. 2021.

Vadivukkarasi, P.; Bhai, R.S. (2020) Phyllosphere-associated *Methylobacterium*: A potential biostimulant for ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivation. **Archives of Microbiology**. v. 202, p. 369–375.

Van Aken, B.; Peres, C.M.; Doty, S.L.; Yoon, J.M.; Schnoor, J.L. (2004) *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoids* x *nigra* DN34). **Microbiology**, v.54, p.1191-1196.

Van Dien, S. J.; Okubo, Y.; Hough, M. T.; Korotkova, N.; Taitano, T.; Lidstrom, M. E. (2003) Reconstruction of C3 and C4 metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. **Microbiology**, v.149, p.601-609.

Vance, C.P. (2001) Update on the state of nitrogen and phosphorus nutrition symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, v.127, n. 2, p. 390–397.

- Varenes, A. (2003) **Produtividade dos Solos e Ambiente**. Lisboa: Escolar editora.
- Veríssimo, A. R. A. (2008) **Avaliação da comunidade microbiana diazotrófica em solos sob cultura biológica por métodos moleculares**. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) - Universidade do Algarve - Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Algarve.
- Vieira, R. F. (2017) **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas**. 21 ed. Brasília, DF: Embrapa Meio Ambiente.
- Vorholt, J.A. (2012) Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**. vol. 10, p. 828-840.
- Yague, J. L. F. (1999) **El Suelo y los Fertilizantes**. 4 ed. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Yokoro, G. K.; Pereira, J. A. (2020) Produção e comercialização de alface: um estudo a partir da perspectiva dos produtores do município de Naviraí/MS. **Revista Agropampa**, v. 3, n. 3, p. 64-79.
- Yuri, J. E.; Resende, G. M. De; Mota, J. H.; Rodrigues Júnior, J. C.; Souza, R. J. De; Carvalho, J. G. de. (2004) Comportamento de alface americana em função do uso de doses e épocas de aplicação de boro em cultivo de inverno. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 593-596.
- Zhang, C.; Wang, M-Y.; Khan, N.; Tan, L-L.; Yan, S. (2021) Potentials, Utilization, and Bioengineering of Plant Growth-Promoting *Methylobacterium* for Sustainable Agriculture. **Sustainability**, n. 13, p. 1-12.
- Zotarelli, L.; Cardoso, E. G.; Piccinin, J. L.; Urquaiga, S.; Boddey, R.M.; Torres, E.; Alvez, B.J.R. (2003) Calibração de medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 1117-1122.