



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Centro de Ciências Agrárias

Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

TUANY MARIN POMINI

**Microrganismos eficazes na segurança de alimentos:
alface hidropônica (*Lactuca sativa* L. cv. Milena)
produzida com baixo teor de nitrato**

TUANY MARIN POMINI

**Microrganismos eficazes na segurança de
alimentos: alface hidropônica (*Lactuca sativa* L.
cv. Milena) produzida com baixo teor de nitrato**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador(a): Prof. Dra. **Elisa Yoko Hirooka**

Coorientador(a): Prof. Dra. **Sandra Garcia**

Londrina

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P786m Pomini, Tuany Marin .
Microorganismos eficazes na segurança de alimentos: : alface hidropônica (*Lactuca sativa* L. cv. Milena) produzida com baixo teor de nitrato / Tuany Marin Pomini. - Londrina, 2021.
106 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.
Coorientador: Sandra Garcia.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2021.
Inclui bibliografia.

1. microrganismos eficazes - Tese. 2. nitrato - Tese. 3. hidroponia - Tese. 4. *Lactuca sativa* - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Garcia, Sandra. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

TUANY MARIN POMINI

**Microrganismos eficazes na segurança de alimentos:
alface hidropônica (*Lactuca sativa* L. cv. Milena)
produzida com baixo teor de nitrato**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Hideaki Wilson Takahashi
Universidade Estadual de Londrina

Dr^a. Daiane Dias Lopes
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 23 de dezembro de 2020.

*Aos meus pais, José e Yliana e ao
Rodrigo, pelo amor, incentivo e
apoio em todas as fases de minha
vida,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, paciência, confiança em meu trabalho e desempenho, ensinamentos e por todas as oportunidades nesses últimos dois anos.

À Dra. Daiane Dias Lopes por estar sempre presente me auxiliando em todas as fases desta pesquisa, e, pela paciência e amizade.

À Profa. Dra. Sandra Garcia pela coorientação, auxílio e disponibilidade.

À Universidade Estadual de Londrina, pela boa infraestrutura e condições para a realização desta pesquisa e à Chefia, Coordenadoria e a todos os Docentes do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PG CTA), pelos ensinamentos transmitidos, atenção e colaboração.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

À empresa Emagritec Sul - Londrina, sob a direção de José Roberto Bergamo pela parceria e fornecimento de EM, além de todo apoio prestado.

Ao produtor rural Wagner Artur dos Santos pelo fornecimento de mudas e todas as trocas de experiências sobre o cultivo hidropônico.

Ao Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves (Laboratório de Ecofisiologia e biotecnologia Agrícola – LEBA / CCA) por disponibilizar o laboratório, materiais e equipe e, ao Dr. Leonel Vinícius por todo auxílio em procedimentos de análise.

Ao Prof. Dr. Guilherme Biz (CCE) pelo planejamento e análise estatística e, por toda paciência e atenção.

À equipe técnica, Márcio e João, e aos alunos do Laboratório de Solos – CCA pelo incentivo, apoio e disponibilidade no processamento laboratorial e também, à estagiária Sara, pelos momentos de descontração, auxílio em análises e amizade.

À Dra. Sandra Helena Prudêncio por todo conhecimento transmitido em período de estágio em Docência.

A todos os funcionários e técnicos do Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia, Alessandra, Marli e Rubens pelo auxílio em laboratório com reagentes, pedidos e favores.

A todos os colegas do Laboratório LIM pelos momentos de descontração.

À minha família, amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima”.

(Louis Pasteur)

POMINI, Tuany Marin. **Microrganismos eficazes na segurança de alimentos: alface hidropônica (*Lactuca sativa* L. cv. Milena) produzida com baixo teor de nitrato.** 2021. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Microrganismos Eficazes (EM) é uma alternativa promissora na redução do uso de fertilizantes nitrogenados, minimizando o acúmulo de nitrato em tecido vegetal, considerado indesejável em cultivo hidropônico. Assim, avaliou-se os parâmetros fitométricos e nutricionais de *Lactuca sativa* L. cv. Milena em cultivo hidropônico visando reduzir o nitrato como fertilizante, integrando à tecnologia de EM. Concentrações de 10 e 25 % de nitrogênio foram empregadas juntamente com 0,1 e 1 % de produto comercial EM-1[®] em sistema de fluxo laminar de nutrientes (*Nutrient Film Technique* – NFT). Os parâmetros avaliados foram qualidade, fitometria, absorção de macro e micronutrientes, cor e microbioma com ênfase a microrganismos predominantes e contaminantes / patogênicos por análise microbiológica e sequenciamento metagenômico empregando o NGS (*Next Generation Sequencing*). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com modelagem mista considerando a dependência das posições. O EM proporcionou melhor crescimento de alface, analisado em épocas distintas de cultivo (verão e outono), com aumento de peso fresco da porção aérea em 222,83 %, no teor de nutrientes entre 20 e 179 % e redução do acúmulo de nitrato em tecido vegetal em 90,54 % em comparação ao controle ($p \leq 0,05$). O sequenciamento molecular mostrou predominância de colonização por microrganismos EM na porção radicular, fato este que proporcionaria a competição com patógeno, aliado a produção de bioativos e fito-hormônios em simbiose na rizosfera, favorecendo o crescimento vegetal. Dentre atividade microbiana relevante destaca-se a fixação biológica de nitrogênio e aumento da taxa fotossintética. O cultivo de verão caracterizou-se por temperaturas elevadas e dias longos, causando injúria por estresse. Salienta-se a maior efetividade de EM neste período de estresse, i.e., aumento expressivo no crescimento e desenvolvimento de 155,9 % em relação ao controle, indicando que o EM permitiu melhor adaptação à condição extrema ($p \leq 0,05$). Portanto, o uso integrado de EM no sistema hidropônico apresentou a vantagem por reduzir o teor de nitrogênio em 75 % sem afetar o crescimento, aliado ao aumento na produtividade e qualidade final de alface.

Palavras-chave: microrganismos eficazes; nitrato; hidroponia; *Lactuca sativa*.

POMINI, Tuany Marin. **Effective microorganisms in food safety: hydroponic lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Milena) produced with low nitrate content.** 2021. 107 p. Thesis (Master in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Effective Microorganisms (EM) is a promising alternative in reducing the use of nitrogen fertilizers, minimizing the accumulation of nitrate in plant tissue, considered undesirable in hydroponic cultivation. Thus, the phytometric and nutritional parameters of *Lactuca sativa* L. cv. Milena in hydroponic cultivation aimed to reduce nitrate as a fertilizer, integrating with EM technology. Concentrations of 10 and 25 % of nitrogen were used together with 0.1 and 1 % of commercial product EM-1[®] in Nutrient Film Technique (NFT). The parameters evaluated were quality, phytometry, macro and micronutrient absorption, color and microbiome with emphasis on predominant microorganisms and contaminants / pathogens by microbiological analysis and metagenomic sequencing using NGS (Next Generation Sequencing). The experimental design was completely randomized with mixed modeling considering the dependence of the positions. The EM provided better lettuce growth, analyzed in different growing seasons (summer and autumn), with an increase in fresh weight of the aerial portion in 222.83 %, in the nutrient content between 20 and 179 % and reduction of nitrate accumulation in vegetable tissue by 90.54 % compared to the control ($p \leq 0.05$). The molecular sequencing showed a predominance of colonization by EM microorganisms in the root portion, a fact that would provide competition with pathogen, combined with the production of bioactive and phytohormones in symbiosis in the rhizosphere, favoring plant growth. Among the relevant microbial activity, biological nitrogen fixation and increased photosynthetic rate stand out. Summer cultivation was characterized by high temperatures and long days, causing stress injuries. We highlight the greater effectiveness of EM in this period of stress, i.e., a significant increase in growth and development of 155.9 % in relation to the control treatment, indicating that EM allowed better adaptation to the extreme condition ($p \leq 0.05$). Therefore, the integrated use of EM in the hydroponic system has the advantage of reducing the nitrogen content by 75 % without affecting growth, coupled with increased productivity and final quality of lettuce.

Keywords: effective microorganisms; nitrate; hydroponic systems; *Lactuca sativa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de Bancada de Cultivo Hidropônico em Sistema NFT (<i>Nutrient Film Technique</i>). Universidade Estadual de Londrina (PR)	18
Figura 2 - Esquema representativo dos genes 16S, 18S e 28S rRNA de procariotos e eucariotos	30
Figura 3 – Ativação de EM-1 [®] para uso.....	31
Figura 4 - Bancada de Cultivo Hidropônico em Sistema NFT (<i>Nutrient Film Technique</i>). Universidade Estadual de Londrina (PR)	32
Figura 5 – Fluxograma geral do experimento	36
Figura 6 – Efeito de Microrganismos Eficazes (EM) no crescimento de Alface Hidropônica (<i>L. sativa</i> L. cv. Milena) em Cultivo de Outono.....	48
Figura 7 – Valores de biomassa de <i>L. sativa</i> L. cv. Milena relacionada à época de cultivo com e sem adição de EM	52
Figura 8 – Efeito de Microrganismos Eficazes (EM) nos parâmetros de cor de alface hidropônica (<i>L. sativa</i> L. cv. Milena) em cultivo de outono.....	62
Figura 9 – Comunidade bacteriana do produto comercial EM-1 [®] e porção radicular de <i>L. sativa</i> L. cv. Milena em cultivo hidropônico, análise da região v3v4 do gene 16S rRNA	65
Figura 10 – Comunidade eucariótica da porção radicular de <i>L. sativa</i> L. cv. Milena em cultivo hidropônico, análise da região ITS do gene 18S rRNA.....	70
Figura 11 – Abundância relativa de fungos e leveduras na porção radicular de <i>L. sativa</i> L. cv. Milena em cultivo hidropônico.	72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição de Solução Nutritiva Completa conforme formulação de Hoagland e Arnon (1950) e modificada, visando redução do teor de nitrato..... 34
- Tabela 2** – Efeito da concentração de nitrogênio na condutividade elétrica e pH em cultivos realizados no pré-experimento da *L. sativa* L. cv. Milena..... 43
- Tabela 3** – Efeito da redução em diferentes concentrações de nitrogênio nos parâmetros de crescimento da *L. sativa* L. cv. Milena no pré-experimento..... 44
- Tabela 4** – Efeito da redução de nitrogênio associado ao EM na condutividade elétrica e pH da *L. sativa* L. cv. Milena em épocas distintas de cultivo 46
- Tabela 5** – Efeito da redução de nitrogênio integrado ao uso de EM para os parâmetros fitométricos de *L. sativa* L. cv. Milena 50
- Tabela 6** – Concentração de macronutrientes primários e secundários em matéria seca de alface (*L. sativa* L. cv. Milena) 56
- Tabela 7** – Concentração de micronutrientes em matéria seca de alface (*L. sativa* L. cv. Milena)..... 59
- Tabela 8** – Parâmetros de cor instrumental: análise em três regiões (alto, médio e baixo) por folha de alface *L. sativa* L. cv. Milena 63
- Tabela 9** – Viabilidade de bactérias lácticas e leveduras na solução nutritiva destinada para ensaio com EM 65
- Tabela 10** – Microbiota da raiz e tecido vegetal de alface *L. sativa* L. cv. Milena cultivados em hidroponia com e sem EM 66
- Tabela 11** – Gêneros de comunidade bacteriana na porção radicular de *L. sativa* L. cv. Milena em cultivo hidropônico, analisada na região v3v4 do gene 16S rRNA 66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Alface	14
3.1.1. Aspectos Gerais, Econômicos e de Consumo de Alface	14
3.1.2. Aspectos de Qualidade de Hortaliças Folhosas	15
3.1.3. Condições de Cultivo em Sistema Hidropônico	16
3.1.4. Nutrição Mineral de Alface e Solução Nutritiva	20
3.1.5. Efeito de Nitrogênio e Nitrato para o crescimento de plantas, acúmulo em tecido vegetal e saúde humana	21
3.2. Tecnologia de Microrganismos Eficazes	24
3.2.1. Mecanismos de Atuação de EM	25
3.2.2. Aplicações: benefícios de EM em Sistemas Hidropônicos	27
3.2.3. Técnicas empregadas para análise de comunidades microbianas	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Microrganismos Eficazes (EM): ativação e manutenção	30
4.2. Solução Nutritiva e Condições do Plantio à Colheita.....	31
4.3. Delineamento Experimental	36
4.4. Determinações Físico-químicas e Microbiológicas	36
4.4.1. Caracterização Microbiológica de EM ativo	36
4.4.2. Análise Microbiológica de Raiz e Tecido Foliar	37
4.4.3. Análises da Solução Nutritiva	37
4.4.3.1. Análise de Temperatura, pH e Condutividade Elétrica	37
4.4.3.2. Análises Microbiológicas	38
4.4.4. Análises fitométrica perante Qualidade de Alface.....	38
4.4.4.1 Cor	38
4.4.4.2. Parâmetros Fitométricos	38

4.4.5. Análises Físico-químicas	39
4.4.5.1. Teor de Nitrogênio, Nitrato e Composição de Macro e Micronutrientes	39
4.4.6. Análises Estatísticas	40
4.5. Taxonomia molecular: Determinação da comunidade microbiana por sequenciamento NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>).....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
1. Determinação dos parâmetros usados no pré-experimento	42
5.1. Análises do Experimento Final: redução severa de N integrado à tecnologia de EM	44
5.1.1. Solução Nutritiva	44
5.2. Qualidade da Alface	46
5.2.1. Parâmetros Fitométricos	46
5.2.2. Teor de Macro e Micronutrientes	53
5.2.3. Cor Instrumental pelo Método CIELAB	59
5.3. Caracterização Microbiológica do EM	63
5.3.1. Análise Microbiológica da solução de EM ativo	63
5.4. Análise Microbiológica de Raiz e Tecido Foliar	65
5.5. Taxonomia Molecular da Comunidade Microbiana	65
5.5.1. Comunidade bacteriana	65
5.5.2. Comunidade de fungos e leveduras	69
6. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	89

ANEXOS

Anexo A – Composição Dos Micronutrientes Da Solução Nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950)	90
Anexo B – Relatório Do Sequenciamento Fornecido Pela Empresa NGS Soluções Genômicas	91
Anexo C – Protocolo para Identificação de Microrganismos em Nível de Espécie por meio da Plataforma BLAST	98

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) se destaca entre as hortaliças folhosas pela flexibilidade de produção, podendo ser de cultivo convencional, orgânica ou hidropônica, cujo baixo custo gera emprego e forte impacto econômico. Consumida em todas as regiões brasileiras, a alface apresenta propriedade benéfica à saúde, além de baixa caloria e bom aproveitamento nutricional devido ao consumo “*in natura*”.

O nitrogênio é o íon de maior contribuição ao crescimento, desenvolvimento e coloração verde do tecido de alface. Em cultivo hidropônico, o fornecimento ocorre via irrigação de solução nutritiva, com destaque ao nitrato (NO_3^-), pela facilidade de absorção via sistema radicular. Embora alface seja altamente exigente perante N, o uso indiscriminado em altas concentrações desencadeia acúmulo em tecido vegetal, podendo manifestar toxidez, além de potencial efeito carcinogênico ao organismo consumidor. O fato evidencia a necessidade de busca a alternativas para reduzir a quantidade de NO_3^- aplicado, ou aumentar a absorção e/ou biotransformação, capaz de assegurar desenvolvimento adequado do vegetal.

No contexto, o emprego de fertilizantes biológicos é uma alternativa sustentável devido ao melhor aproveitamento de nutrientes pelas plantas, facilidade de aplicação e baixo custo. O desenvolvimento de tecnologia de microrganismos eficazes (EM) surgiu com o objetivo de reduzir a poluição causada pelos fertilizantes minerais na agricultura convencional. O EM é um consórcio de microrganismos composto por bactérias lácticas, actinomicetos, fotossintéticos e leveduras, que, em conjunto, produzem substâncias antimicrobianas e bioativos em simbiose com o sistema radicular vegetal, promovendo melhor crescimento, enraizamento e aumento no processo fotossintético e, conseqüente produto final de coloração mais atrativa.

O EM é aplicado diretamente no solo, enquanto que em hidropônicos procede-se a pulverização foliar, não havendo ainda evidência de uso direto em solução através de irrigação. A introdução direta no sistema de fluxo laminar de nutrientes (*Nutrient Film Technique* – NFT) poderia beneficiar não apenas o crescimento vegetal, mas estender-se também à manutenção da qualidade de água, redução de contaminantes e proliferação de algas, reduzindo o risco de incrustação na tubulação do sistema.

O trabalho visa contribuir para a produção vegetal equilibrada, buscando qualidade e segurança para o produto final perante avanços tecnológicos operacionais aliado a inserção de ferramenta biológica (EM). Conhecer o microbioma empregando identificação molecular por NGS (*Next Generation Sequencing*) torna-se essencial para a compreensão de processos

metabólico-biotecnológicos desencadeados pelos microrganismos envolvidos no crescimento e desenvolvimento de plantas em condições de restrição severa de nitrogênio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os parâmetros fitométricos e nutricionais de alface crespa (*Lactuca sativa* L. cv. Milena) em cultivo hidropônico pelo sistema de fluxo laminar de nutrientes (*Nutrient Film Technique* – NFT), sob redução severa de nitrogênio como fertilizante e, acoplado ao sistema, integrando à tecnologia de microrganismos eficazes – EM.

2.2. Objetivos específicos

- Testar diferentes doses de produto comercial EM-1[®] para o desenvolvimento de alface crespa em sistema hidropônico, utilizando soluções nutritivas com diferentes concentrações de nitrogênio (sob forma de ureia), comparando-se com o "controle" (sob forma de nitrato em concentração recomendada para o cultivo);
- Avaliar os parâmetros fitométricos de raiz e porção aérea da alface;
- Analisar a qualidade microbiológica e sanitária de folhas e raízes submetidas aos tratamentos com e sem EM-1[®];
- Analisar o estado nutricional de tecido vegetal perante macro e micronutrientes empregando absorção atômica, espectrometria UV/VIS e fotometria de chama;
- Comparar a comunidade microbiana na raiz de alface com o produto EM-1[®] puro e ativo empregando o Sequenciamento de Nova Geração (NGS);

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ALFACE

3.1.1. Aspectos Gerais, Econômicos e de Consumo de Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça pertencente à família *Asteraceae* de origem asiática, cultivada desde o Egito Antigo há 4.500 a.C e, introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVI (RYDER; WHITAKER, 1976; MENEZES, SANTOS, SCHMIDT, 2001).

Esta planta herbácea anual de ciclo curto apresenta um caule diminuto para inserção de folhas, um sistema radicular ramificado (raiz pivotante) e superficial e boa capacidade de retenção de água, com pH entre 6,0 e 6,8 (FILGUEIRA, 2013). A principal parte comestível são as folhas, podendo ser lisas ou crespas e sem espinhas. A inserção radial de folhas pode ou não fechar-se ao redor, formando uma “cabeça”. Apresenta coloração brilhante, com variações desde o verde-amarelo ao verde-escuro, podendo chegar a coloração roxa, dependendo da cultivar (CPRA, 2019).

A alface é classificada comercialmente em Americana, Crespa, Lisa, Mimosa e Romana de acordo com as características das folhas e formação de cabeça (HENZ; SUINAGA, 2009). A definição dos tipos de alface é importante devido a diversidade nas características morfológicas e fisiológicas entre os grupos que determinam diferenças na conservação de pós-colheita e em manuseio. A variedade crespa lidera 70 % do mercado brasileiro, seguida de 15 % de variedade americana, 10 % de variedade lisa e 5 % de variedade mimosa e romana (SALA, COSTA, 2005; CEPEA, 2017). Determinadas cultivares apresentam resistência ao vírus do mosaico da alface (*Lettuce mosaic virus* – LMV), resistência ao pendoamento precoce ou florescimento precoce, principalmente em regiões mais quentes ou com dias mais longos (IAC, 2005; MELLO; CAMPAGNOL, 2016).

A produção mundial de hortaliças ocupa uma área de 89 milhões de hectares, produzindo um total de 1,4 bilhões de toneladas. No Brasil, o comércio de hortifrútiis gera um forte impacto na economia do país. Segundo dados levantados por KIST et al. (2018), as hortaliças folhosas ocupam uma área de 174 mil hectares e são produzidas 1,3 milhões de toneladas. A alface destaca-se por ocupar 49,9 % de hortaliças no setor agrícola, com produção total aproximada de 576 mil toneladas. Em novembro de 2019, a comercialização de alface em São Paulo foi de 4.700 toneladas, seguida por leve aumento em fevereiro de 2020, com aproximadamente 5.000 toneladas (CONAB, 2019; CONAB, 2020). Ainda, a cultura ocupa a

terceira posição em maior volume de produção e movimentando cerca de R\$ 8 bilhões de reais no varejo comparando aos anos anteriores (CEPEA, 2019).

Dessa forma, o consumo de hortaliças pode ser explicado pelo fato de que a população brasileira vem desenvolvendo hábitos mais saudáveis, incluindo a mudança de hábitos alimentares. Além de apresentar um baixo custo, a alface se destaca pelo baixo valor calórico (15 Kcal em 100g), fonte de vitaminas, incluindo as vitaminas A, B1, B2 e C e minerais (ferro, cálcio, potássio, magnésio, entre outros), fibras e água (BEZERRA et al., 2006; SOUSA et al., 2007).

Outros benefícios da alface estão relacionados à saúde, podendo ter propriedades sedativas, diuréticas pela presença da lactucina, anticancerígena quando associados a um bioflavonoide e vitamina C, além de ser benéfica para o trato digestivo e respiratório (FILGUEIRA, 2013).

Tradicionalmente a alface é consumida *in natura* em saladas, cozida em sopas ou como ingrediente adicional a uma preparação. Contudo, a alface também é muito apreciada principalmente pelo sabor suave e agradável, textura crocante e pela durabilidade sob refrigeração (HENZ; SUINAGA, 2009).

3.1.2. Aspectos de Qualidade de Hortaliças Folhosas

Dentre os produtos hortícolas, as hortaliças folhosas são alimentos considerados perecíveis e sensíveis ao manuseio. A qualidade de hortaliças está diretamente relacionada aos fatores envolvidos na cadeia (LANA, MOITA, 2019).

Os atributos de qualidade que mais se destacam no momento da compra são: aparência visual (frescor, defeitos, deterioração e o principal, a cor), textura (firmeza, resistência e integridade do tecido), sabor, aroma, valor nutricional e segurança do alimento. O manuseio da hortaliça do plantio à pós-colheita influencia em sua qualidade e durabilidade, visto que a perda de frescor e mudança de coloração ocorre devido às condições inadequadas de armazenamento (CENCI, 2006).

A cor é o atributo de maior destaque na alface, a qual apresenta coloração brilhante e maior variação de cor entre as folhas. A clorofila é o pigmento natural que confere a coloração verde, presentes nos cloroplastos das folhas e outros tecidos vegetais. Outros pigmentos, como os carotenoides, estão associados à clorofila, ocasionando diferenças aparentes na cor do vegetal (VON ELBE, 2000). As cultivares de alface com coloração roxa ou semiroxa possuem

a presença de antocianina como pigmento, diferindo das demais.

O grupo das clorofilas compreendem as substâncias semelhantes entre si, a qual é denominada clorofila a, b, c e d e estão diretamente relacionadas ao processo fotossintético de plantas. Dessa forma, o estado nutricional de plantas está relacionado com a quantidade e qualidade de clorofila presente no tecido vegetal (OKADA et al., 1992).

Dentre os pigmentos fotossintéticos, a clorofila a (Chl a) está presente em todos os organismos que realizam a fotossíntese oxigênica e compreende 75% dos pigmentos verdes encontrados em vegetais. É utilizada para realizar a fotoquímica (primeiro estágio do processo fotossintético). Os demais pigmentos, também denominados de acessórios, auxiliam na absorção de luz e transferência de energia radiante para os centros de reação, principalmente pela ação da clorofila b (Chl b), presentes em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias (TAIZ, ZIEGER, 2004).

Por apresentar estrutura química instável, a degradação de clorofila está relacionada a fatores como alta incidência luminosa e pH do tecido. A foto-oxidação relaciona-se a períodos de alta irradiação, no entanto, a presença de carotenoides atua de forma a protegê-la, prevenindo a reação (VIEIRA, 1996). Dessa forma, a relação entre clorofila e carotenoide pode ser usada como um indicador de perdas foto-oxidativas causadas por fortes irradiações (HENDRY; PRICE, 1993).

Em relação ao pH, valores mais próximos de 9,0 torna a clorofila mais estável ao calor quando comparada ao pH próximo de 3,0. A permeabilidade da membrana é reduzida devido ao equilíbrio entre cargas positivas e negativas e, assim, diminui a degradação de clorofila (VON ELBE, 2000).

O teor de clorofila nas folhas está diretamente relacionado ao potencial fotossintético da própria planta. Entretanto, o desempenho de plantas pode ser influenciado pelo uso de fertilizantes, o qual poderá favorecer ou não os processos metabólicos e consequente desenvolvimento e produtividade de plantas (TAIZ, ZIEGER, 2004).

3.1.3. Condições de Cultivo em Sistema Hidropônico

No Brasil, os sistemas de produção de alface mais conhecidos são: sistemas com e sem a utilização de solo, ambos podendo ser de cultivo convencional e orgânico. Entretanto, não existem diferenças entre as cultivares de plantio sem solo, devendo-se considerar características

como produtividade, qualidade, manejo, resistência às doenças e pendoamento precoce (SCHMIDT et al., 2001).

O cultivo hidropônico é de origem grega e significa “trabalho com água”, isto é, o cultivo de uma espécie vegetal sem a utilização de solo desde que todas suas necessidades sejam supridas (APRÍGIO et al., 2012).

Há referências para o cultivo em água há muitos anos, porém somente na década de 1930, o Dr. Willian Frederick Gericke, engenheiro agrônomo e professor na área de nutrição de plantas da Universidade da Califórnia, Estados Unidos, trouxe esta técnica para o uso comercial. Após anos de pesquisa, foi possível verificar os cinco fatores necessários para o desenvolvimento pleno de uma cultivar, entre eles o apoio, água, sol, ar e nutrientes (APRÍGIO et al., 2012; MELLO; CAMPAGNOL, 2016).

A hidroponia vem se desenvolvendo rapidamente com a produção vegetal, sobretudo para hortaliças. É um sistema protegido realizado em casas de vegetação e relaciona-se às técnicas agrícolas utilizadas e condições climáticas de cada região (HENZ; SUINAGA, 2009).

Nos últimos anos, a cadeia produtiva de hortaliças vem sofrendo diversas alterações, transformando a comercialização em um processo mais complexo e delicado, levando ao produtor a busca por técnicas ou sistemas que possam reduzir as perdas de produção (LOPES et al., 2011).

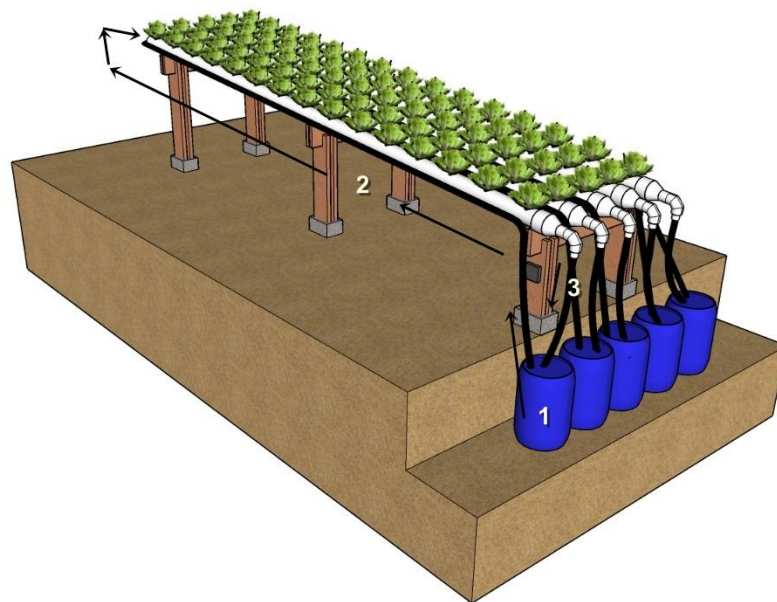
Nesse contexto, a hidroponia pode ser considerada como um método vantajoso, visando à obtenção de um produto final de boa qualidade com sabor e aspectos externos superiores e com tamanhos mais uniformes (ZEN, BRANDÃO, ARBAGE, 2017). Além disso, apresenta resultados satisfatórios para o produtor devido a maior produtividade devido ao aumento da proteção da cultura a fitopatógenos e conseqüente diminuição do uso de agrotóxicos, uso consciente de água, reduzindo até 70% de seu consumo, diminuição do uso de insumos e a possibilidade do plantio fora da época (MELLO; CAMPAGNOL, 2016).

Dentre os sistemas hidropônicos, o *Nutrient Film Technique* (NFT) destaca-se por ser um sistema mundialmente utilizado. Outros sistemas, como o Floating ou *Deep Flow Technique* (DFT), sistema de pavio, leito flutuante, subirrigação, gotejamento e aeroponia também podem ser empregados (APRÍGIO et al., 2012).

O NFT é uma técnica de cultivo onde o sistema radicular da planta é cultivado dentro de canaletas ou perfis hidropônicos, permitindo que as raízes entrem em contato direto com a solução nutritiva, permanecendo parcialmente submersas (FURLANI, 1995). Contudo, 90% dos produtores a utilizam para o cultivo de hortaliças folhosas, dentre elas, rúcula, espinafre, agrião e mais popularmente, a alface (MELLO; CAMPAGNOL, 2016).

O sistema é composto por um reservatório responsável pelo armazenamento de água e solução nutritiva, um sistema de bombeamento, canaletas de cultivo e de um sistema de retorno da solução para o reservatório. De acordo com a Figura 1, para cada canaleta, a solução nutritiva passa por meio de um fluxo denso e constante, fluindo para que a raiz absorva água, nutrientes e oxigênio e em seguida, retorne ao reservatório por gravidade. A frequência de irrigação é controlada por um temporizador digital de forma intermitente, com intervalos pré-determinados de acordo com as culturas e condições climáticas (FURLANI et al., 2009b).

Figura 1. Esquema de Bancada de Cultivo Hidropônico em Sistema NFT (*Nutrient Film Technique*). Universidade Estadual de Londrina (PR).



Sistema de bombeamento: (1) Reservatório de água e solução nutritiva. (2) A solução é conduzida pela mangueira instalada logo abaixo da canaleta e controlado por um adaptador para que a solução entre nas canaletas de irrigação radicular. (3) A solução retorna ao reservatório por gravidade.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

As características mais importantes que afetam o crescimento e desenvolvimento de hortaliças são: temperatura e umidade relativa do ar, luminosidade e declividade das bancadas de cultivo.

A produção de mudas e hortaliças em sistemas hidropônicos estão diretamente relacionadas às condições climáticas. Os processos fisiológicos de plantas de alface são influenciados pela temperatura do ar, acelerando ou retardando as reações metabólicas (VIEIRA; CURY, 1997). O verão é a estação caracterizada pelo calor intenso e dias longos, e por este motivo, o desenvolvimento de grande parte das cultivares de alface é prejudicado. O

pendoamento precoce ocorre de forma a tornar as folhas leitosas e amargas pela produção de látex, reduzindo seu valor comercial (FILGUEIRA, 2013).

Nesse sentido, as faixas ideais de temperatura do ar internamente nas estufas variam entre 20 e 25 °C durante o dia e entre 16 e 18 °C durante a noite. Temperaturas inferiores a 10 °C levam a injúrias causadas pelo frio e temperaturas superiores a 30 °C prejudicam o crescimento, floração, formação de “cabeça” e a redução do número total de folhas. Durante a colheita, são observadas hortaliças de tamanho reduzido e baixo peso devido à antecipação do ponto de colheita (SANTANA et al., 2005). De acordo com Filgueira (2013), dias curtos e temperaturas amenas estão relacionados ao melhor desempenho da etapa vegetativa em cultivares de alface. Paralelamente, a faixa ideal de umidade do ar nesses locais varia entre 60 a 85 % (MELLO; CAMPAGNOL, 2016).

Em condições de temperatura elevada e baixa umidade do ar, as plantas transpiram mais e o tempo entre as irrigações pode ser reduzido para evitar um possível estresse hídrico (LOPES et al., 2011). Não somente o estresse hídrico ocasionado pela redução da oferta de água em solução, como também o estresse causado pelo calor intenso afeta negativamente a produtividade (JONES, 1982). O aquecimento da solução ao longo dos perfis hidropônicos aumenta a temperatura da porção radicular, diminuindo a oxigenação, absorção de nutrientes, taxa fotossintética e formação de biomassa vegetal, observado por Chow, Price e Hanger (2002) e Yan et al. (2012). Devido as interações entre luz e temperatura, alguns distúrbios fisiológicos são induzidos, como “tipburn” e descoloração (SUBLETT, BARICKMAN, SAMS, 2018).

A luminosidade está diretamente relacionada ao processo de fotossíntese. A baixa oferta de luz promove o estiolamento das plantas, abortamento de flores e menor síntese de pigmentos pela menor taxa fotossintética. Por outro lado, excessos de radiação solar são prejudiciais, ocasionando queimadura de frutos e aumento de temperatura no interior das estufas. O ideal para um crescimento ótimo varia entre 20 a 30 mols^{-1} de luz diariamente (FAQUIN et al., 1994).

Com relação às bancadas de cultivo, a declividade relaciona-se a velocidade em que a solução nutritiva irá fluir dentro das canaletas. A faixa ideal varia entre 3 a 8 % (FURLANI, 1995; FILGUEIRA 2013). Valores superiores a 12 % prejudicam o sistema, de modo que o fluxo de solução fica mais veloz e afeta a absorção de nutrientes, lesiona o sistema radicular e desloca mudas pequenas para o interior da tubulação, causando entupimentos. Caso contrário, valores inferiores a 2 % de declividade geram fluxo de solução muito lento, aumentando seu aquecimento, reduzindo o teor de oxigênio e proporcionando o crescimento de algas e contaminantes (MELLO; CAMPAGNOL, 2016).

3.1.4. Nutrição Mineral de Alface e Solução Nutritiva

Nos primeiros estudos realizados por Arnon e Stout (1939), observou-se que diferente de animais e microrganismos, as plantas necessitam de água e nutrientes inorgânicos para seu desenvolvimento. Deficiências ou falta de um elemento impossibilita formar o ciclo biológico completo e os nutrientes usados devem estar envolvidos diretamente no metabolismo para a nutrição ou envolvidos em processos enzimáticos (RESH, 1997).

Os minerais são absorvidos pela porção radicular, com exceção dos nutrientes não minerais (C, H, O), que são absorvidos por meio da água e ar atmosférico (FURLANI et al., 2009a). Dessa forma, é importante que 1/3 da parte aérea entre em contato com o ar (FAQUIN et al., 1996).

A solução nutritiva em sistemas hidropônicos é composta por água e nutrientes essenciais, divididos em macronutrientes primários e secundários e micronutrientes. Os macronutrientes primários são N, P e K, os secundários são Ca, Mg e S e os micronutrientes são Zn, Fe, Mn, Mo, B, Cu, Cl e Ni (FAQUIN; FURTINI NETO, 1996).

A qualidade da solução nutritiva está relacionada a determinadas características obtidas durante o processo. A temperatura ideal da solução é de 25 °C, não ultrapassando 28 °C. Temperaturas mais frias ou mais quentes podem causar injúrias nas plantas. Temperaturas com valores superiores a 40 °C é um fator limitante à atividade de raízes, prejudicando sua capacidade de absorção (JEANNEQUIN, 1987).

A água é um parâmetro de grande influência na produtividade de alface, e esta, é uma hortaliça altamente exigente (FILGUEIRA, 2013). Para evitar o estresse hídrico, em regiões de climas mais quentes, há necessidade de ajuste da solução, pois as plantas consomem mais água do que nutrientes, empregando o uso de soluções mais diluídas. Sugere-se o volume de 1 L de solução por planta com reposição de água diária (FURLANI, 1995; FAQUIN, FURTINI NETO, 1996).

O nível de oxigênio está relacionado à temperatura, isto é, quanto maior a temperatura da solução, menor será a capacidade da solução dissolver o oxigênio e menor será a oxigenação. O ideal é manter o oxigênio dissolvido (OD) entre 5 a 10mg/L ou entre 5 e 10 ppm (FURLANI et al., 2009a).

Entretanto, a alface pode crescer satisfatoriamente em nível de OD de pelo menos 4 ppm. A insuficiência de oxigênio reduz a permeabilidade da água na raiz, ocorrendo acúmulo de toxinas, de forma que, água e minerais não podem ser absorvidos em quantidade suficiente para suportar o crescimento das plantas (FAQUIN; ANDRADE, 2004). Com isso, há

murchamento e estresse, acompanhado de taxas mais lentas de fotossíntese e transferência de carboidratos, deficiência de minerais entre outros problemas. Uma vez que a planta seja estressada, patógenos oportunistas podem aproveitar da situação, como o *Pythium* (MELLO; CAMPAGNOL, 2016).

A condutividade elétrica (CE) é importante para determinar a quantidade de íons na solução, sendo a unidade de medida em mili Siemens ou mS. Sua medida é muito dependente do clima da região e do tipo de cultivar. O Instituto Agronômico de Campinas (IAC) sugere condutividade elétrica para alface de 2 e 2,5 mS para climas amenos e entre 1 e 1,5 mS para regiões de climas quentes (FURLANI et al., 2009a).

Em relação ao Potencial de Hidrogênio (pH), o ideal é ser mantido entre 5,5 e 6,5, valores abaixo ou acima podem interferir na absorção de macronutrientes pelas raízes, tais como N, P e K. Grande parte de soluções nutritivas não tem a capacidade tampão e seu pH pode variar constantemente. Valores abaixo de 4,0 afetam a integridade da membrana celular e valores acima de 6,5 ocasionam sintomas de deficiência de Fe, P, B e Mn (MELLO; CAMPAGNOL, 2016).

3.1.5. Efeito de Nitrogênio e Nitrato para o crescimento de plantas, acúmulo em tecido vegetal e saúde humana.

O nitrogênio (N) é o íon que mais contribui quantitativamente para a formação de plantas. Sua função estrutural relaciona-se a formação de aminoácidos, proteínas, enzimas, coenzimas, vitaminas e pigmentos, como a clorofila e está diretamente relacionado ao metabolismo fisiológico de plantas. Grande parte do nitrogênio encontra-se nas folhas, especificamente nos cloroplastos (TEIXEIRA FILHO et al., 2012).

Em hortaliças folhosas como a alface, o N é um nutriente de alta exigência e tem efeitos que acarretam no aumento da produtividade, coloração atrativa e estímulo do crescimento vegetal. Entretanto, seus efeitos variam de acordo com as condições ambientais (NASCIMENTO et al., 2017).

Apesar de que o N compõe cerca de 80% do ar atmosférico, apenas 2 % está disponível para assimilação de plantas, na forma de nitrato ou amônio. O melhor aproveitamento do N atmosférico ocorre por ação de microrganismos diazotróficos, cuja ação, envolve a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MALAVOLTA, 2006).

A FBN ocorre pela conversão de N₂ gasoso em amônia ou outras espécies químicas nitrogenadas prontamente utilizadas pelas plantas (NUNES, RAIMONDI, NIEDWIESKI,

2003). É um processo complexo o qual requer a expressão conjunta de genes que codificam um complexo enzimático denominado nitrogenase (ZHAO et al., 2010; GABY; BUCKLEY, 2012). Os microrganismos capazes de fixar nitrogênio, denominados diazotróficos, apresentam a enzima nitrogenase funcional e envolve bactérias do gênero *Rhizobium* (leguminosas) e alguns fungos e leveduras. Microrganismos com ação endofítica, incluindo os gêneros *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Klebsiella* e *Burkholderia* também tem sido relatado (BALACHANDAR et al., 2006; GOVINDARAJAN et al., 2007).

Para alface hidropônica, o valor de nitrogênio recomendado na solução nutritiva é de 100 a 300 mg L⁻¹ (FURLANI et al., 2009a). O fornecimento de dosagens superiores ao recomendado leva a prejuízos na planta, bem como queimaduras em folhas jovens, aumento da susceptibilidade ao ataque de pragas e doenças devido à disponibilidade de aminoácidos totais e ao alongamento do ciclo de cultura. Em contrapartida, a deficiência está relacionada ao amarelecimento de folhas velhas e a baixa produtividade (FILGUEIRA, 2013; YURI et al., 2016).

O N presente na solução nutritiva é absorvido pelas raízes na forma de nitrato e posteriormente reduzido para amônio. A redução ocorre em duas etapas principais: a primeira etapa ocorre no citoplasma através do NADH⁺ como agente redutor originado pela energia da respiração celular. O nitrato é reduzido a nitrito pela enzima nitrato redutase. A segunda etapa ocorre nos cloroplastos, através da ferredoxina como agente redutor. Os elétrons são gerados no fotossistema I da fotossíntese, isto é, o nitrogênio participa diretamente do processo de fotossíntese (LUZ et al., 2008).

O nitrato (NO₃⁻) é a fonte de N mais comumente ofertado em solução nutritiva devido à rápida absorção pelo sistema radicular. Entretanto, seu acúmulo em tecidos vegetais está diretamente associado à quantidade ofertada por meio da adubação, ou seja, excessos adicionados serão absorvidos e acumulados em folhas e tecidos (FAQUIN, FURTINI NETO, 1996). Ao ser ofertado sob a forma amoniacal, apesar do menor gasto energético pela enzima nitrato redutase, as plantas reduzem a produção de matéria seca entre 15% e 70%, não sendo uma alternativa vantajosa (PÔRTO et al., 2012). Nesse sentido, a ureia destaca-se como boa alternativa na redução de acúmulo de nitrato devido à alta concentração de N (45%), solubilidade e compatibilidade com outros fertilizantes. Em contrapartida, a ureia apresenta maior susceptibilidade a perdas por lixiviação (NO₃⁻) e volatilização (NH₃) e desse modo, o aproveitamento é menor (FRAZÃO et al., 2014; YURI et al., 2016).

A luminosidade também influencia no acúmulo de nitrato em plantas. A baixa luminosidade gera um estresse que afeta a taxa fotossintética. Quando há baixa luminosidade

associada à alta disponibilidade do nitrato, a atividade da enzima nitrito redutase é diminuída por não gerar NADH^+ e o acúmulo de nitrito leva a inibição da atividade da enzima nitrato redutase, resultando assim, em um acúmulo nos vacúolos celulares (LUZ et al., 2008). A ação da enzima é induzível, ou seja, a luz pode influenciar em sua atividade. Outros fatores ambientais estão relacionados ao horário de colheita, temperatura, umidade relativa do ar e do solo (LOPES et al., 2011).

Em contrapartida, a deficiência de molibdênio pode acarretar em um maior acúmulo de nitrato já que é um componente da enzima nitrato redutase. O molibdênio também é essencial para o crescimento de plantas exigentes para nitrogênio, auxiliando em sua assimilação final (TURAZI et al., 2006).

Lopes et al. (2011) observou que, o órgão de maior acúmulo de nitrato na alface é o talo, seguido de folhas internas. Isto pode ser explicado pelo fato de que estes órgãos recebem menos intensidade luminosa e a ação da enzima é diminuída.

O Brasil não possui legislação vigente para os teores máximos de nitrato permitidos em vegetais e dessa forma, adotam-se os índices europeus da Norma Europeia n.1258/2011 (COMMISSION REGULAMENTATION – EC, 2011). Os limites variam entre 3.000 a 5.000 mg Kg^{-1} de nitrato por massa fresca de alface. Luz *et al.* (2008) destaca que as divergências apresentadas nas bibliografias são decorrentes de metodologias adotadas, maior sensibilidade na detecção deste íon, amostragem e horário de amostragem, procedimentos de determinação, entre outros.

O consumo de alimentos com alto teor de nitrato é tóxico ao organismo. Após a ingestão, ao entrar em contato com o trato gastrointestinal, o nitrato é reduzido a nitrito (NO_2^-). Na corrente sanguínea, ocorre a formação da metahemoglobina por meio da oxidação do ferro ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$). A metahemoglobinemia é uma condição ocasionada devido à metahemoglobina não transportar oxigênio para a respiração celular (LUZ et al., 2008; PÔRTO et al., 2012).

Em ambientes altamente ácidos como do estômago, o nitrito pode combinar-se com aminas e formar substâncias denominadas “nitrosaminas”. Estes compostos químicos são conhecidos pela ação carcinogênica e mutagênica (DU, ZHANG, LIN, 2007).

Altas concentrações de nitrato em vegetais leva a preocupação com sua qualidade nutricional relacionada à saúde (ANJANA, IQBAL, 2007). É importante ressaltar que as hortaliças não são as únicas fontes para a ingestão de nitrato. A ingestão de alimentos industrializados e água atuam de forma conjunta para o aparecimento de determinadas doenças (MENEGAES et al., 2015).

3.2. TECNOLOGIA DE MICRORGANISMOS EFICAZES

O conceito de “Microrganismos Eficazes” (*Effective Microorganisms* - EM) foi desenvolvido pelo Professor Teruo Higa, na Universidade de Ryukyus, (Okinawa, Japão), no início de 1980 (HIGA; PARR, 1994).

O EM foi desenvolvido inicialmente como uma alternativa natural e biodegradável para a agricultura convencional, reduzindo assim, seus poluentes (HIGA, WIDIDANA, 1991).

Sabe-se há muitos anos que o uso de fertilizantes minerais impacta negativamente o meio ambiente. A agricultura convencional utiliza produtos químicos, como fertilizantes, pesticidas, reguladores de crescimento de plantas, agrotóxicos, entre outras substâncias (PAULO, SERRA, 2015). O uso indiscriminado promove a redução da qualidade de solos, a resistência de plantas contra patógenos e ao alcançar os recursos hídricos, contaminam lagos, rios e mares (HIGA, 2004).

Ball (1998) e Hussain (2005) associaram o uso de microrganismos como uma forma alternativa de redução do uso de compostos químicos para a produção de alimentos. Dentro desse contexto, o EM consiste em uma mistura de culturas de microrganismos isoladas de solos férteis com funções ecológicas distintas e complementares entre si e destaca-se pela bioestimulação de solos e produção agrícola (MOHAN, 2008; OLLE, WILLIAMS, 2013).

Para que um organismo seja considerado um EM, as características relacionam-se à promoção de efeitos benéficos, ação altamente eficaz em meio a outros microrganismos, não ser patogênico ou geneticamente modificado (ZAKARIA, GAIROLA, SHARIFF, 2010; BONFIM et al., 2011). Deste modo, a constituição primária envolve as bactérias produtoras de ácido lático e leveduras e secundariamente, actinomicetos e bactérias fotossintéticas (HIGA, PARR, 2008). Além disso, todos os microrganismos devem ser compatíveis entre si e coexistir em cultura líquida (BONFIM et al., 2011).

No início da década de 90, a Fundação Mokiti Okada (Atibaia, SP) trouxe esta tecnologia para o Brasil, e posteriormente foi difundida entre os praticantes de agricultura orgânica. Após alguns anos, o EM passou a ser comercializados por empresas distribuídas pelo Brasil, divulgando o produto com nome comercial “EM-1[®]”. Entretanto, o EM pode ser produzido de forma artesanal, por famílias agrícolas, e muitos deles coletam o próprio inóculo em locais de matas nativas (MITSUIKI, 2006). Essa flexibilidade permite ao produto ser mais adaptável às condições local e mais acessível pelo baixo custo de produção (ANDRADE, 2011).

O emprego desta tecnologia é vantajoso por ser econômica, natural, segura e de alta qualidade, além de não poluir o ambiente e produzir alimentos de forma mais sustentável

(BONFIM et al., 2011).

Segundo a Fundação Mokiti Okada, a concentração inicial para uso de EM ativo é de 1:1000, não havendo qualquer recomendação para o uso em cultivo hidropônico (MITSUIKI, 2006).

3.2.1. Mecanismos de atuação de EM

O mecanismo de ação do EM envolve a capacidade de decomposição de matéria orgânica (HIGA, PARR, 1994). Entretanto, sugere-se que os benefícios produzidos quanto ao crescimento de plantas e melhora da qualidade do solo está relacionado às suas propriedades químicas, físicas e biológicas. A principal atividade dos microrganismos é o aumento da microflora do solo, permitindo um equilíbrio entre os microrganismos benéficos e facultativos e tornando o solo um ambiente desfavorável para microrganismos patogênicos (HIGA 2012; OLLE, WILLIAMS, 2013).

Devido à grande diversidade de microrganismos presentes no produto, é possível verificar a fixação de nitrogênio atmosférico, produção de hormônios vegetais e substâncias promotoras de crescimento e conseqüentemente melhor ramificação do sistema radicular, aumento da taxa fotossintética, fermentação do solo, estímulo de outros microrganismos benéficos (diazotróficos, promotores de crescimento, micorrizas, entre outros) e melhor qualidade do produto final (CONDOR, GONZALEZ, 2007). Além disso, atuam de forma a facilitar a absorção de água e sais minerais pelas plantas, promovendo a racionalização da gestão de água e reduzindo o uso de fertilizantes minerais em até 20 % (HIGA, 2012).

Em contrapartida, a maior efetividade da ação desses microrganismos está relacionada às situações em que a planta passa por algum tipo de estresse e/ou condições adversas de solo. Solos em estados favoráveis à produção vegetal possuem microrganismos nativos cuja atuação é eficiente na ciclagem de nutrientes e fontes de carbono, reduzindo assim, a eficácia da utilização de EM (HIGA, 2012). Estudos realizados por Salama, El-Sayed e El-Gammal (2014) e Talaat (2015) demonstraram maior eficiência do EM mediante adaptação ao estresse salino, aumentando a tolerância de plantas devido à modulação do pool de poliaminas e regulação da síntese de proteínas.

O mecanismo de ação do EM está diretamente relacionado à ação dos microrganismos presentes, por meio da ação de simbiose com as plantas (CORALES, HIGA, 2002). As bactérias produtoras de ácido láctico são constituídas pelos Lactobacilos (*L. casei*, *L. plantarum* e

Lactococcus lactis). No solo, sua função é a produção do ácido lático para controlar o surgimento de determinados microrganismos nocivos, como o *Fusarium sp.* São importantes também para a decomposição da matéria orgânica, fermentando e decompondo materiais como lignina e celulose (HIGA, 1995).

As leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e a *Candida utilis*) são capazes de produzir substâncias antimicrobianas, utilizar substâncias liberadas pelas raízes de plantas, sintetizar vitaminas e ativar outros microrganismos presentes naturalmente no solo. Contudo, produzem substâncias bioativas como hormônios e enzimas, gerando atividade celular nas raízes das plantas (ANDRADE, 2009).

As bactérias fotossintéticas (*Rhodospseudomonas palustris* e a *Rhodobacter spaeroides*) são importantes por utilizar a energia solar na forma de luz e calor, utilizar substâncias excretadas pelas raízes para síntese de vitaminas e nutrientes, aminoácidos, ácidos nucleicos e substâncias bioativas para favorecer o crescimento de plantas. Todavia, aumentam a população de outros microrganismos, principalmente aqueles cuja função é a fixação de nitrogênio (HIGA; PARR, 1994; ANDRADE, 2009).

E por fim, os actinomicetos (*Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus* e *Aspergillus oryzae*) atuam de forma a controlar o aparecimento de fungos e bactérias patogênicas e aumentar a resistência de plantas (HIGA; PARR, 2008).

A atuação de EM na produção vegetal assemelha-se aos biofertilizantes tradicionalmente utilizados, distinguindo-se apenas pelo pH ácido (HIGA, 2004). Nesse contexto, Higa e Parr (1994) enfatizam que o EM não é um substituto para outras práticas de manejo agrícola e sim, uma complementação, desde que em dosagens adequadas para cada cultura vegetal.

Entretanto, o uso excessivo de biofertilizantes prejudica a saúde das plantas e diminui a produtividade devido às interações (sinérgicas e antagônicas) e à competição por nutrientes entre plantas e microrganismos, ocasionando um déficit no tecido vegetal. As interações sinérgicas ocorrem quando a absorção de determinado elemento favorece a absorção de outro, como observado entre potássio (K^+) e cloro (Cl^-). Por outro lado, as interações antagônicas ocorrem quando a absorção de um nutriente dificulta a absorção de outro, como no caso de nitrogênio amoniacal (NH_4^+) e cálcio (Ca^{2+}) em tomates (CARDOSO, ANDREOTE, 2016).

3.2.2. Aplicações: benefícios de EM em Sistemas Hidropônicos

A aplicação de EM é muito ampla devido à decomposição de matéria orgânica. Além da aplicação convencional para condicionamento e melhoramento de solos e crescimento vegetal, o EM aplica-se também para tratamento de sementeiras e plantio direto, manejo de resíduos orgânicos e compostagem, suinocultura e indústrias a fim de reduzir odores desagradáveis em instalações, equinocultura para tratamentos cutâneos, avicultura para redução do uso de antibióticos e aquicultura para manutenção da qualidade de água, bem como sua oxigenação e melhor desenvolvimento imunológico em peixes (PEGORER et al., 1995; HIGA, 1996; HIGA 2012).

Szymanski e Patterson (2003); Rashid e West (2007); Józwiakowski, Czernaś e Szczurowska (2009); Zakaria, Gairola e Shariff (2010) e Shalaby (2011) investigaram a importância da aplicação de EM no tratamento e purificação de água, de forma a mantê-la limpa, reduzindo a eutrofização e seus contaminantes, restaurando assim, o ecossistema nativo. Dessa forma, o EM ameniza os impactos ambientais causados por indústrias por atuar na decomposição de resíduos e efluentes (BONFIM et al, 2011).

No contexto, o emprego de EM em sistemas hidropônicos visaria não somente a produção eficaz de hortaliças, como também o funcionamento do sistema como um todo. Sistemas hidropônicos utilizam a água como meio de transporte de nutrientes e dessa forma, a manutenção da qualidade de água, a redução da formação de algas e a limpeza das tubulações de forma a evitar incrustações poderiam ser observadas.

3.2.3. Técnicas empregadas para análise de comunidades microbianas

A complexa interação entre microbioma radicular e produção vegetal, por meio da substituição de fertilizantes químicos por material biológico, enfatiza a importância de microrganismos, visto que a identificação certa auxilia na compreensão dos processos envolvidos e possíveis manipulações das funções do ecossistema (NANNIPIERI et al., 2003). No contexto, os métodos dependentes e independentes da cultura são empregados para determinar a comunidade microbiana (MADIGAN et al., 2010). Entretanto, somente 1 % dos microrganismos presentes em ambientes e/ou amostras são cultivados pelo método dependente da cultura, i.e., contagem em placas sob condições laboratoriais (XU, 2006). Fatores relacionados envolvem características específicas do ambiente não reprodutíveis em laboratório, interação com outros organismos e desconhecimento quanto às necessidades

nutricionais específicas (SU et al., 2012).

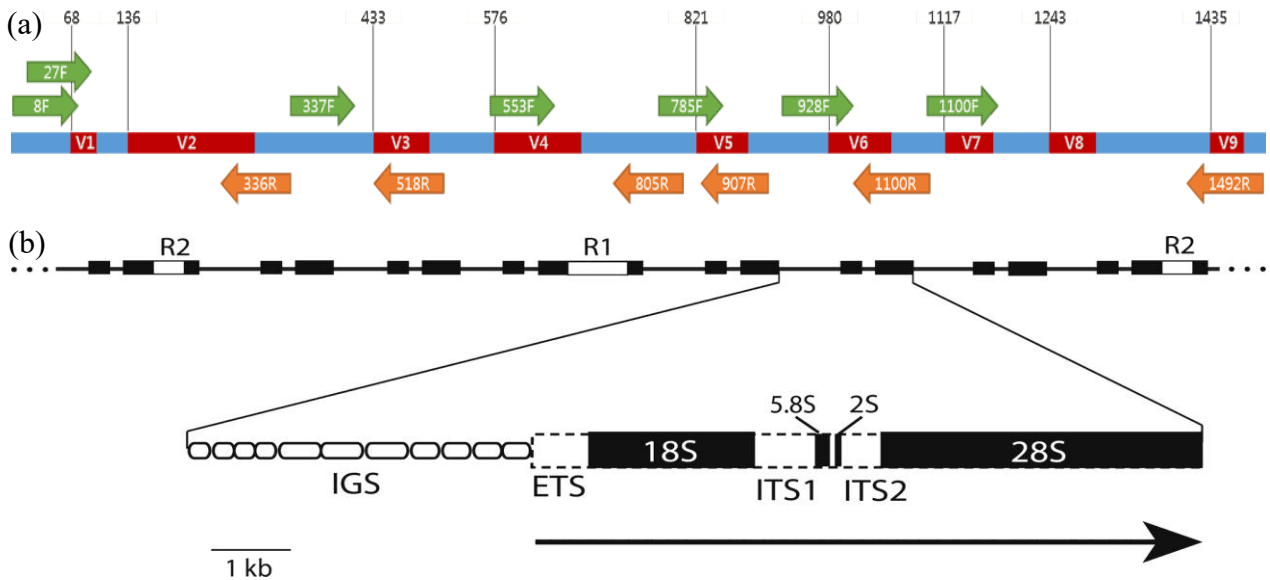
Embora a diversidade microbiana em uma comunidade seja ampla, o emprego de técnicas independentes permite identificá-los de forma mais abrangente sem a necessidade direta de cultivo (AOI, 2002). Dentre as técnicas independentes, destaca-se o Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* - NGS), possibilitando a identificação da filogenia bacteriana mediante estudo de genes 16S do RNA ribossomal por apresentar maior estabilidade, sequências de nucleotídeos em regiões conservadas e pela presença em todos os seres procariotos (AMANN et al., 1990; MADIGAN et al., 2010); e filogenia de fungos mediante estudo de região ITS (*Internal Transcribed Space*) do gene 18S e 28S, que por sua vez, está presente em todos os seres eucariotos (Figura 2) (ANDERSON, CAIRNEY, 2004).

O NGS é a técnica empregada para o sequenciamento do genoma, ou partes dele, fornecendo grande quantidade de dados em curto período de tempo, permitindo uma descrição mais aprofundada dos constituintes microbianos (MISRA et al., 2017). O NGS possibilita também estabelecer a relação genoma/transcriptoma, prospecção de novos genes, análises de expressão através de sequenciamento de RNA e, estudos da composição de comunidades microbianas (GOEL et al., 2017).

O sequenciamento envolve várias etapas de análise. As amostras são analisadas em sua forma bruta, por exemplo, partes inteiras de plantas, raízes, solos entre outros, ou isoladas em culturas puras, para microrganismos cultiváveis em condições laboratoriais. Em seguida, procede-se para a extração de DNA, e uma biblioteca de amplicons é construída por análises em PCR, processadas com a inserção de identificador próprio (index ou barcodes) diferentes para cada amostra, de forma que é possível diferenciá-las na etapa de análise. Por fim, as sequências são comparadas com bancos de dados disponíveis e diversas inferências são realizadas, possibilitando a identificação taxonômica do microrganismo de interesse (SOLOMON et al., 2014).

Assim, o emprego de método tradicional e molecular possibilitará novas abordagens para explorar a vida microbiana presente na rizosfera de plantas em cultivo hidropônico. Visto que a interação microrganismo – raiz é fundamental para a saúde da planta, a inserção de microrganismos na agricultura através de um inoculante é uma alternativa sustentável e sua produção envolve a captura e cultivo de microrganismos *in vitro* (KAMINSKY et al., 2018).

Figura 2. Esquema representativo dos genes 16S, 18S e 28S rRNA de procariotos e eucariotos.



- (a) O gene 16S rRNA para identificação de filogenia bacteriana compreende nove regiões variáveis denominadas de V1 a V9, representadas pela cor vermelho. **Fonte:** Ezbiocloud, 2020.
- (b) Os genes 18S e 28S rRNA separados por regiões ITS (*Internal Transcribed Space*), são altamente conservadas e variáveis entre diferentes espécies, possibilitando a distinção ao nível específico de seres eucariotos. **Fonte:** Stage e Eickbush, 2007.

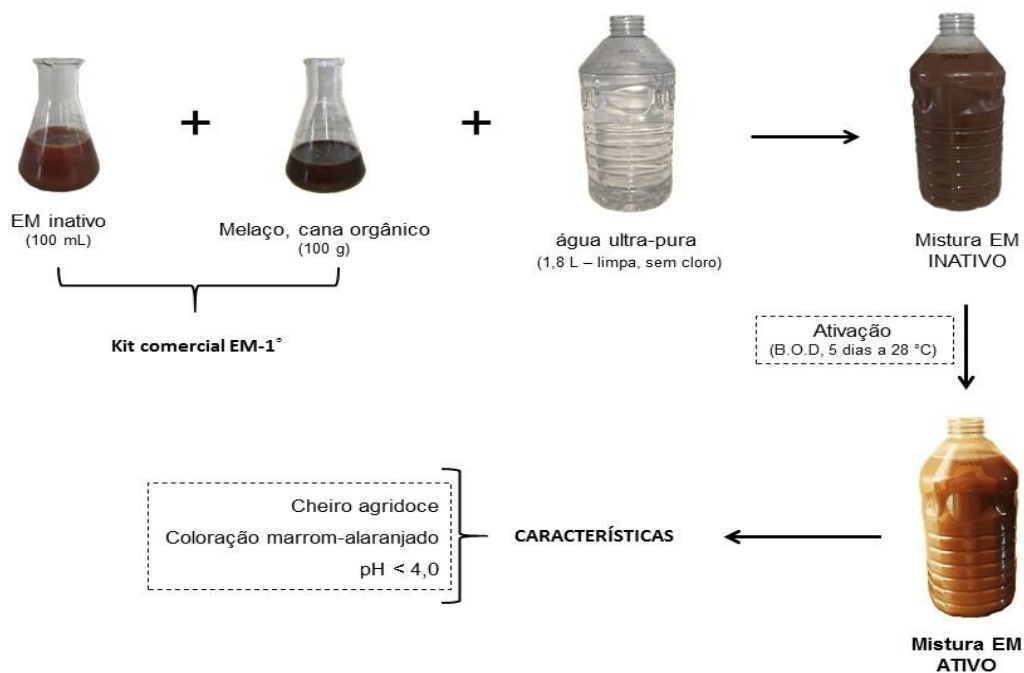
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos Eficazes (EM): ativação e manutenção.

O produto comercial EM-1[®] foi produzido pela AmbiEM (Camaçari – BA), sendo distribuído em Londrina – PR pela empresa Emigratec Sul. O Kit comercial EM-1[®] constituiu de 5,0 L de EM inativo (cultivo mantido em frasco escuro) e melação de cana de açúcar orgânico, sendo uma porção gentilmente cedida para a pesquisa. *L. casei var ramosus*, *L. acidophilus* e *S. cerevisiae* compõem os principais microrganismos e, devem ser ativados antes do uso.

A Figura 3 mostra a ativação de EM-1[®] para uso, adicionando 100 mL de produto inativo + 100 g de melação de cana orgânico em recipiente plástico com tampa contendo 1,8 L de água limpa sem cloro (ultra-pura, ELGA LabWater - UK), para volume final de 2 L. A mistura foi incubada por 5 dias à 28 °C em incubadora B.O.D (Tecnal, TE – 391, Piracicaba, SP). As principais características do produto final ativado com sucesso consistiram de: cheiro agridoce suave e agradável, coloração marrom-alaranjado e pH abaixo de 4,0. Após ativação, o produto acondicionado em local fresco de aproximadamente 25 °C, arejado e protegido de radiação solar, foi imediatamente utilizado, mas pode ser conservado por aproximadamente 30 dias, conforme demonstrou o teste preliminar realizado em paralelo.

Figura 3. Ativação de EM-1[®] para uso.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2. Solução Nutritiva e Condições do Plantio à Colheita

A alface (*L. sativa* L. cv. Milena), variedade crespa verde da empresa Sakata sementes S/A (Uberaba, SP), foi cultivada em substrato sólido (80 % de fibra de coco + 20 % de esterco bovino curtido), em bandeja com 200 células (4 cm de altura). As mudas de 20 dias pós-semeadura foram gentilmente cedidas pelo produtor rural Sr. Wagner Artur dos Santos da chácara Santa Inês, situada no Distrito Espírito Santo, Londrina-PR.

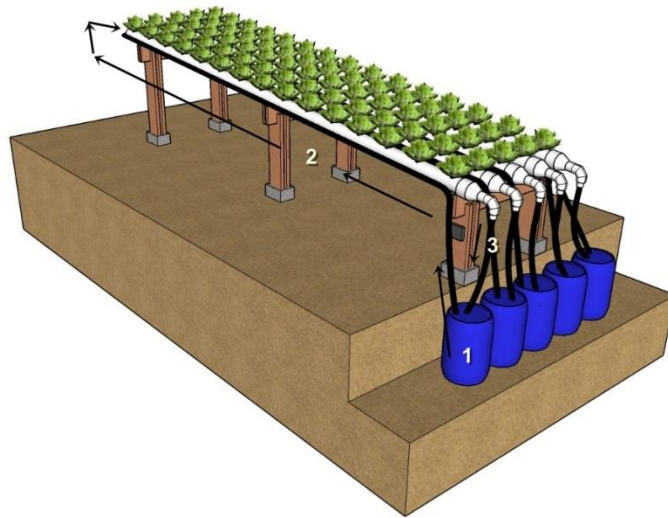
O experimento foi conduzido em cultivo hidropônico no sistema de fluxo laminar de nutrientes (*Nutrient Film Technique* – NFT) em casa de vegetação localizada na área experimental do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL / Londrina - PR). As coordenadas geográficas são 23°18' de latitude Sul e 51°09' de latitude Oeste, com altitude média de 560 m.

O experimento apresentado no fluxograma geral (Figura 5) foi conduzido em três etapas:

- Pré-experimento: preliminar para definir os níveis de N na solução nutritiva: outubro a dezembro/2019.
- Experimento cultivo de verão: janeiro / 2020.
- Experimento cultivo de outono: maio / 2020.

O sistema NFT foi composto de uma bancada de cultivo com cinco canos de PVC (3,85 m x 1 m), denominado canaletas ou perfis hidropônicos. Cada perfil hidropônico continha 12 poços (6 cm diâmetro e 3 cm de profundidade) para acomodar as mudas. O perfil hidropônico foi conectado separadamente a reservatórios (bombona de polietileno de alta densidade / BR New Sul) com capacidade para 100 L, sendo este abastecido com 50 L de solução nutritiva e, acoplado a bomba submersa individual (Atman, AT – 305, vazão de 1.200 L/h) (Figura 4). Assim, em todos os tratamentos, o reservatório com 50 % da capacidade (volume final de solução nutritiva de 50 L) foi monitorado perante reposição de EM e solução nutritiva semanal, i.e., no primeiro e sétimo dia, conforme descrito no Tópico 4.4.

Figura 4. Bancada de Cultivo Hidropônico em Sistema NFT (*Nutrient Film Technique*). Universidade Estadual de Londrina (PR).



Sistema de bombeamento: (1) Reservatório de água e solução nutritiva. (2) A solução é conduzida pela mangueira instalada logo abaixo da canaleta e controlado por um adaptador para que a solução entre nas canaletas de irrigação radicular. (3) A solução retorna ao reservatório por gravidade.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A irrigação do sistema NFT utilizou água destilada para o preparo de solução nutritiva. A Tabela 1 apresenta a composição de solução nutritiva completa utilizada como controle, elaborada seguindo a formulação proposta por Hoagland e Arnon, (1950), considerada 100 % da oferta de N. Para os tratamentos, empregou-se a solução nutritiva modificada (incompleta, para testar diferentes níveis de nitrogênio e EM-1[®]).

Na solução nutritiva modificada, o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e KNO_3 foram substituídos por Cloreto de Cálcio (CaCl_2) e Cloreto de Potássio (KCl), respectivamente, mas mantendo-se a mesma concentração de cátions. A ureia foi utilizada como fonte de N e, elaborada a partir de solução estoque a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (Tabela 1).

A composição de micronutrientes apresentou os seguintes íons: ácido bórico (H_3BO_3), cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloreto de zinco (ZnCl_2), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e as respectivas concentrações foram apresentadas no Anexo A (Página 87).

Os íons utilizados para ambas as soluções foram obtidos por meio de solução estoque a 1M. A concentração final para cada nutriente foi de 0,005M para as formas de nitrato e cloreto de cálcio e potássio, 0,002M para sulfato de magnésio e fosfato monopotássico e 0,001M para o ferro e micronutrientes para o volume final de 50 L de solução nutritiva.

Tabela 1. Composição de Solução Nutritiva Completa conforme formulação de Hoagland e Arnon (1950) e modificada, visando redução do teor de nitrato.

Solução Nutritiva Completa (controle)		
Nutrientes ⁽¹⁾	Volume (mL 50 L⁻¹)	Quantidade (g 50 L⁻¹)
Nitrato de Cálcio (Ca(NO ₃) ₂)	250	59,5
Nitrato de Potássio (KNO ₃)	250	25,5
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	100	24,8
Fosfato Monopotássico (KH ₂ PO ₄)	100	13,7
Ferro – EDTA	50	1,06
Micronutrientes	50	0,24
Solução Nutritiva Modificada		
Nutrientes	Volume (mL 50 L⁻¹)	Quantidade (g 50 L⁻¹)
Ureia (CH ₄ N ₂ O) ⁽²⁾	-	-
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	250	27,5
Cloreto de Potássio (KCl)	250	18,6
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	100	24,8
Fosfato Monopotássico (KH ₂ PO ₄)	100	13,7
Ferro – EDTA	50	1,06
Micronutrientes	50	0,24

⁽¹⁾ Solução estoque usada a 1M para cada nutriente, com exceção de ureia.

⁽²⁾ Concentração de ureia específica para cada tratamento a partir de solução estoque a 0,5 g L⁻¹.

A programação do sistema NFT empregado no ensaio foi padronizado por Lopes et al. (2011). I.e., baseado em estudo anterior empregando o mesmo sistema NFT nesta casa de vegetação, mas com modificação na programação de tempo para o acionamento de bomba.

O fluxo de solução nutritiva pelos perfis hidropônicos foi intermitente, com bombas controladas por um temporizador digital com capacidade para oito programações (HYX, TMD - 101). O sistema permaneceu ligado ininterruptamente no período diurno das 8h às 11h; 11h20m às 15h e 15h20m às 18h20m, com intervalo de 20 minutos de desligamento entre uma programação e outra. A irrigação noturna de 1h foi programada para os horários de 20, 24 e 04h.

Para determinar os tratamentos a serem conduzidos no experimento, o pré-experimento

foi realizado em outubro a dezembro/2019 para definir os níveis de N na solução nutritiva (Figura 4).

Tendo como o controle 100% de N (preparado com solução de NO_3^- [1,0 M de KNO_3 e 1,0 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$,] a 210 mg N L^{-1}), considerada como recomendada para o sistema hidropônico, prosseguiu-se a seleção, testando ureia na tentativa de eliminar o NO_3^- . As concentrações N sob forma de ureia testadas foram 10, 25, 50, 75 % da recomendação.

A reposição de nutrientes na solução nutritiva foi necessária quando a condutividade elétrica (CE) atingiu valores inferiores a 1,0 mS cm^{-1} (MELLO, CAMPAGNOL, 2016). Assim, para a reposição de solução completa e modificada, utilizou-se a solução estoque cinco vezes concentrada, até que os valores de CE atingissem 1,5 mS cm^{-1} .

As mudas de 20 dias de germinação foram transplantadas para os perfis hidropônicos com as respectivas concentrações de ureia e, após 40 dias de cultivo, as plantas foram colhidas e analisadas; nesta etapa, duas concentrações de N de 10 e 25 % foram escolhidas para prosseguir com o experimento.

Paralelamente, as concentrações de EM ativo escolhidas foram 0,1 e 1 %, seguindo as recomendações do fabricante.

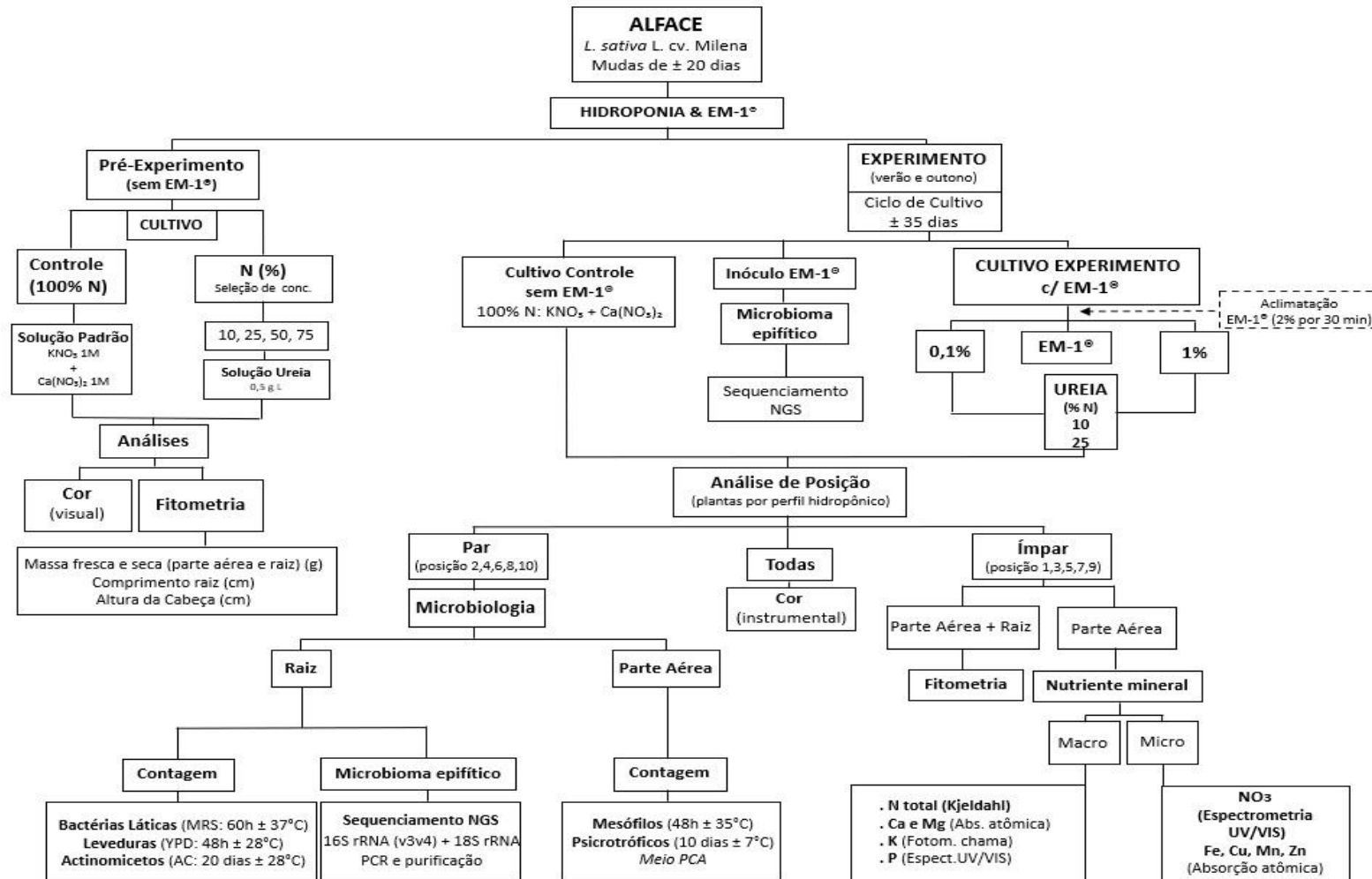
O experimento final com os tratamentos pré-determinados foi dividido em duas etapas:

- Experimento cultivo de verão: janeiro / 2020.
- Experimento cultivo de outono: maio / 2020.

Antes do transplante, as mudas passaram por aclimatação, as quais foram repousadas em recipiente contendo a solução de EM ativo diluído a 2 % em água destilada por 30 minutos, de modo que somente a raiz entrasse em contato direto com a solução.

O fluxograma geral está apresentado na Figura 5.

Figura 5. Fluxograma geral do experimento.



4.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com modelagem mista, considerando a dependência das posições (FARAWAY, 2016).

Cinco tratamentos foram elaborados de acordo com a concentração de nitrogênio e EM ativo, respectivamente: Controle (solução padrão e sem adição de EM), T1 (25 + 0,1 %), T2 (10 + 1 %), T3 (10 + 0,1 %) e T4 (25 + 1 %).

Para todos os tratamentos, as análises foram separadas por posição de canaletas no perfil hidropônico (posição 1 a 10). Análises da posição ímpar (1, 3, 5, 7 e 9) foram destinadas para medidas fitométricas e conteúdo mineral, enquanto que a posição par (2, 4, 6, 8 e 10) destinadas a análises microbiológicas. As análises de cor instrumental foram realizadas em todas as posições.

Cada perfil hidropônico foi constituído de doze posições, sendo a primeira e última descartadas devido ao efeito de bordadura, obtendo assim, dez posições. Cada posição foi considerada uma repetição por tratamento.

4.4. Determinações físico-químicas e microbiológicas

4.4.1. Caracterização Microbiológica de EM ativo

A caracterização microbiológica de EM no produto ativo e puro foi realizado anteriormente à inoculação na solução nutritiva. O produto foi diluído em série no fator de 10 em água peptonada 0,1 % para a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro de produto (UFC/mL), de acordo com método apresentado por Silva et al. (2017).

A contagem de bactérias lácticas foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade (*Pour Plate*) em Ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), incubando-se a 37 °C por 48 h (FORSYTHE, 2013).

A contagem de leveduras e actinomicetos foi realizada por técnica de plaqueamento em superfície com auxílio de alça de Drigalski, em Ágar Yeast Peptone Dextrose (YPD) e Amido Caseína (AC), sendo incubados a 28 °C, respectivamente por 48 h (leveduras) e 20 dias (actinomicetos) (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007; HOPWOOD et al., 1985).

A gentamicina (40 mg/mL) associada à ampicilina (100 mg/mL) foi o antibiótico utilizado no meio YPD para isolar colônias de leveduras, para suprimir diversidade bacteriana

do EM.

As colônias desenvolvidas na placa de Petri foram isoladas e caracterizadas por microscopia óptica (Nikon Eclipse E-200 – Tóquio, JP) e estereoscópico (Bioptika Opton TIM-30, Cotia – SP). A coloração de Gram foi empregada para a caracterização morfo-tintorial bacteriana, seguindo a metodologia de Okura e Siqueira (2008).

4.4.2. Análise Microbiológica de Raiz e Tecido Foliar

Raiz e tecido foliar de cada posição dos diferentes tratamentos foram imediatamente analisados após a colheita quanto aos microrganismos epifíticos (raiz) e contaminantes (parte aérea). Alíquotas de 25g de raiz e folhas (tecido foliar) foram pesadas individualmente e acondicionadas em sacos plásticos estéreis para coleta de amostras, adicionados de 225 mL de água peptonada 0,1 % dentro da capela de fluxo laminar unidirecional (CLFV-09, Veco, Campinas – SP). Em seguida, os sacos com as amostras foram homogeneizados em equipamento stomacher (80 Biomaster Lab Blender – Londres, UK) por 1 minuto. A metodologia foi realizada conforme descrito por Silva et al. (2017).

Para a raiz, a contagem de UFC/mL foi realizada para bactérias lácticas (FORSYTHE, 2013), leveduras (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007) e actinomicetos (HOPWOOD et al., 1985). No tecido foliar, realizou-se a técnica de plaqueamento em superfície em Ágar Padrão de Contagem (PCA). Neste método, as placas foram incubadas a 35 °C / 48 h e 7 °C / 10 dias para os mesófilos e psicotróficos aeróbios, respectivamente (APHA, 2015).

4.4.3. Análises da Solução Nutritiva

4.4.3.1. Análise de Temperatura, pH e Condutividade Elétrica

O acompanhamento diário de temperatura e condutividade elétrica (CE) da solução nutritiva foram aferidas em cada um dos cinco reservatórios.

A temperatura foi monitorada em três horários distintos, sendo 9, 13 e 17 h (termômetro digital TP 101 com capacidade para medidas de -50°C a 300°C).

A CE foi medida em milisiemens (mS cm^{-1}) empregando condutivímetro digital portátil, (modelo HI 96304).

O pH foi medido no início e final do experimento, coletando-se 500 mL de solução

nutritiva de cada reservatório, empregando pHmetro de bancada (AZ[®] 86505, Taichung City – TAIWAN) no Laboratório de Imunorreagentes e Técnicas Moleculares (LIM) do Departamento DCTA, CCA/UEL.

4.4.3.2. Análises microbiológicas

A análise microbiológica semanal da solução nutritiva foi realizada para a checagem da necessidade da reposição de EM. Alíquotas de 25 mL foram coletadas em cada reservatório, diluídas em série de fator 10 em água peptonada 0,1 % para a contagem de UFC/mL de solução. A metodologia foi realizada conforme descrito anteriormente no Tópico 4.4.1.

4.4.4. Análise fitométrica perante Qualidade da Alfaca

4.4.4.1. Cor

A cor da superfície de folhas de alfaca (*L. sativa* L. cv. Milena) foi realizada anteriormente à colheita, utilizando-se o Colorímetro digital portátil CR-400 (Konika Minolta – New Jersey, EUA), com iluminante D65, previamente calibrado em placa de porcelana branca. Utilizou-se a metodologia de Vicentini-Polette et al. (2018) com adaptações. Para cada posição, uma folha central foi dividida em três pontos (alto, médio e baixo) e então, a medida foi aferida. Obteve-se a média para as três posições por folha.

O sistema de medição adotado para obtenção dos dados foi o CIELAB, os parâmetros observados foram L*, a*, b*, e com base nesses valores, a angulação da tonalidade cromática (h°) e o croma (C*) foram calculados pelas seguintes equações, respectivamente:

$$h^{\circ} = \arctg \frac{b'}{a'} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$C^* = \sqrt{(a')^2 + (b')^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

4.4.4.2. Parâmetros Fitométricos

Após a colheita, as plantas foram lavadas em água destilada e secas com o auxílio de

papel toalha. As características comerciais analisadas foram altura da cabeça (ALTCa), massa fresca da parte aérea (MFPa), massa seca da parte aérea (MSPa), comprimento da raiz (CRz), massa fresca da raiz (MFr), massa seca da raiz (MSr) e as medidas foram aferidas em cm com auxílio de régua.

Para obtenção da massa seca, as amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 60 °C até o peso permanecer constante.

4.4.5. Análises Físico-químicas

4.4.5.1. Teor de Nitrogênio, Nitrato e Composição de Macro e Micronutrientes

A determinação de todos os nutrientes foi realizada com as amostras previamente secas, trituradas em micro moinho tipo Willye R-TE – 648 (Tecnal – Ourinhos, SP) e passadas em peneira com malha de 1 mm.

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldhal (BREMNER, KEENEY, 1965) e o nitrato por análise do extrato diluído em ácido salicílico (5 % em ácido sulfúrico concentrado P.A) em espectrofotômetro UV-VIS (Libra S22, Biochrom – Cambridge, UK) (LASTRA, 2003; CATALDO et al., 1975).

O fósforo foi dosado colorimetricamente pelo método de redução do fosfomolibdato pela vitamina C em Espectrômetro UV-VIS (AJX – 1600, Micronal – São Bernardo do Campo, SP) (BRAGA; DEFELIPO, 1974) e o potássio por fotometria de emissão de chama, ambos após mineralização via digestão sulfúrica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1992).

Os demais elementos foram analisados após mineralização pela digestão nítrico-perclórica. O cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica (SILVA, 1999).

Os teores dos nutrientes foram apresentados em g Kg⁻¹ para macronutrientes (Eq. 3) e mg g⁻¹ para micronutrientes (Eq. 4 e 5) de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Abs} \cdot 2500 / 1000 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Abs} \cdot 50 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\text{Nitrato: } x = \frac{(y-0,013)}{0,0016} = R \text{ } \mu\text{g/mL} \rightarrow \text{Relação } \frac{\left(\frac{R \text{ } \mu\text{g/mL}}{0,01 \text{ g/mL}}\right)}{1000} \quad (\text{Eq. 5})$$

onde:

* = Absorbância multiplicada pelos valores correspondentes;

y = valor de absorbância obtido pelo equipamento;

R = resultado da equação em $\mu\text{g/mL}$.

O conteúdo mineral foi calculado, multiplicando os teores de nutrientes pela matéria seca da planta e dividida por mil, sendo o conteúdo de nutrientes dado em g planta (BALDOTTO et al., 2010).

4.4.6. Análises Estatísticas

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade pelo programa R Studio (versão 3.51) (FARAWAY, 2016).

4.5. Taxonomia molecular: Determinação da comunidade microbiana por sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*)

O volume de 25 mL de produto de EM ativo e puro, assim como 25 g de amostra fresca de raiz foram acondicionados em frascos cônicos de 50 mL (livres de DNases, RNases e pirogênicos), sendo estes congelados e armazenados a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ no laboratório LIM – CCA, UEL.

As amostras foram enviadas congeladas acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo seco para a Empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, SP) para extração de DNA, a qual usou o kit DNAeasy PowerSoil QIAGEN (Qiagen; Hilden, Germany) e sequenciamento NGS. O sequenciamento foi realizado usando sistema Illumina MiSeq (Illumina Inc.), com cobertura de 50 mil reads e leituras pareadas de 260 bases (2 x 260 pb). Os primers utilizados para amplificação dos genes foram para as regiões 16S e 18S do RNA ribossômico (rRNA) de procariotos e eucariotos, respectivamente. O preparo das bibliotecas foi realizado seguindo as recomendações do Illumina (<https://support.illumina.com/>), empregando duas PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A primeira foi realizada para amplificação dos genes e a segunda

para ligar os adaptadores Illumina (barcodes) empregando o kit Nextera XT. Realizou-se também etapas de quantificação de DNA, purificação da PCR e normalização das bibliotecas. A descrição completa do processo em Relatório enviado pela empresa está em Anexo B (Página 88).

Para a análise dos dados, as sequências obtidas com a amplificação dos genes do rRNA foram processadas em linguagem R (R Core Team 2019) empregando o pacote DADA2 (versão 1.16), disponíveis através do projeto BioConductor (Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses). DADA2 implementou um pipeline completo para transformar os arquivos fastq obtidos do sequenciamento em sequências ASVs (*Amplicon Sequence Variants*). A descrição completa da Análise dos Dados em Relatório enviado pela Empresa está em Anexo B (Página 89).

Após o processamento inicial dos dados pelo DADA2, taxonomias foram atribuídas a cada ASV com base no banco de dados SILVA (<https://www.arb-silva.de/>) para construção da tabela (Anexo B). As classificações taxonômicas geradas pelo DADA2, e suas quantificações apresentadas em tabela foram importadas (ainda implementada em R) para o programa phyloseq (McMurdie, Holmes, 2013). O pacote phyloseq é uma ferramenta para importar, armazenar, analisar e exibir graficamente dados complexos de sequenciamento filogenético que já foram agrupados em ASVs.

Neste trabalho, o programa Excel (Microsoft) também foi usado como ferramenta para gerar gráficos, e o banco de dados do NCBI foi consultado para alinhar sequências ASVs através da ferramenta Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Anexo C, Página 95).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Determinação dos parâmetros usados no pré-experimento.

O efeito da redução de nitrogênio (N) em alface (*L. sativa* L. cv. Milena) foi avaliado quanto ao crescimento e desenvolvimento de plantas em cultivo hidropônico.

Conforme a Tabela 2, as condições que caracterizaram o cultivo relacionam-se a temperaturas elevadas, com média ambiente de 33,8 °C e de solução nutritiva de 29,9 °C. O pH inicial foi ajustado para 5,5 no início do cultivo para todos os tratamentos, e observou-se grande variação ao longo do ciclo.

A reposição média de nutrientes foi de quatro vezes ao longo de um cultivo de 40 dias.

Tabela 2. Efeito da concentração de nitrogênio na condutividade elétrica e pH em cultivos realizados no pré-experimento da *L. sativa* L. cv. Milena

Condição	Solução Nutritiva			Ambiente	
	N ⁽¹⁾ (%)	CE (mS cm ⁻¹)	T (°C)	pH ⁽⁴⁾	T (°C)
Controle	100 ⁽²⁾	1,35 ± 0,2		7,3	
1	75 ⁽³⁾	1,46 ± 0,1		7,1	
2	50	1,35 ± 0,1	29,9 ± 2,0	6,9	33,8 ± 1,9
3	25	1,31 ± 0,1		7,0	
4	10	1,5 ± 0,1		6,9	

Concentração de Nitrogênio (N); Condutividade elétrica (CE); Temperatura (T). Médias apresentadas seguidas pelo desvio padrão.

⁽¹⁾ Ureia foi usada como fonte de N (0,5 g L⁻¹), exceto para o controle. Concentrações de N

⁽²⁾ Solução controle (estoque): KNO₃ 1 M + Ca(NO₃)₂ 1 M.

⁽³⁾ Percentual de N em relação ao controle.

⁽⁴⁾ pH final da solução.

Conforme a Tabela 3, o crescimento de alface foi prejudicado ao reduzir o fornecimento de nitrogênio na solução nutritiva. O peso fresco da parte aérea (cabeça) foi aproximadamente 3,5 e 6 vezes menor nas condições 3 e 4, em comparação ao controle, respectivamente (p<0,05). Ao avaliar os parâmetros comerciais, a altura da cabeça (AltCa) e comprimento da raiz (CRz) do controle e os demais tratamentos demonstraram diferenças significativas (p<0,05).

Dessa forma, sabe-se que o N é o nutriente que mais contribui para a formação e o crescimento de plantas, devido à atuação direta em seu metabolismo fisiológico. (TEIXEIRA

FILHO et al., 2012).

Tabela 3. Efeito da redução em diferentes concentrações de nitrogênio nos parâmetros de crescimento da *L. sativa* L. cv. Milena no pré-experimento.

Condição	N ⁽¹⁾ (%)	Peso Fresco (g)		Peso Seco (g)	AltCa	CRz
		Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	(cm)	(cm)
Controle	100 ⁽²⁾	151,42 a	43,50 a	7,66 a	19,85 a	40,70 a
1	75	67,07 b	20,55 bc	4,22 b	16,43 b	17,65 b
2	50	60,26 bc	15,50 c	2,98 bc	13,69 c	22,60 b
3	25	43,36 cd	26,10 b	2,76 c	14,06 c	28,20 b
4	10	26,19 d	21,85 bc	2,23 c	9,67 d	18,35 b
CV (%)		24,67	23,86	26,04	11,54	16,94

Altura da cabeça (AltCa); Comprimento da raiz (CRz); Nitrogênio (N). Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si para o Teste Tukey ($p \geq 0,05$).

⁽¹⁾ Ureia foi usada como fonte de N ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), exceto para o controle.

⁽²⁾ Solução controle (estoque): KNO_3 1 M + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M.

⁽³⁾ Percentual de N em relação ao controle.

Devido à diferença significativa de peso fresco da parte aérea e dos parâmetros comerciais avaliados ($p < 0,05$), optou-se em dar continuidade ao experimento com as concentrações de N que mais prejudicaram o desenvolvimento de plantas: 10 e 25 %. Assim, a efetividade real da ação dos Microrganismos Eficazes (EM) poderá ser observada em tratamentos com reduções severas de N.

5.1. Análises do Experimento Final: redução severa de N integrado à tecnologia de EM.

5.1.1. Solução Nutritiva

A análise de temperatura, condutividade elétrica e pH de solução nutritiva e temperatura ambiente do local experimental estão apresentados na Tabela 4.

Ao introduzir o EM no cultivo hidropônico, os ciclos foram realizados em duas épocas distintas do ano: verão e outono. Nota-se a diferença de 10,8 °C na temperatura ambiente e 6,4 °C na temperatura da solução nutritiva entre as estações.

O pH inicial foi ajustado para 5,5 no início do cultivo para todos os tratamentos. Tratamentos com concentrações de 0,1 % de EM resultaram em baixa variação de pH (5 a 5,3) enquanto que em concentrações de 1 % de EM ocorreram maiores variações (4,6 a 4,8) e consequente acidificação das soluções.

A reposição da solução controle ocorreu quatro vezes ao longo do ciclo para ambos os cultivos. Não houve a necessidade de reposição para as plantas tratadas com EM durante todo o ciclo de verão e outono.

Tabela 4. Efeito da redução de nitrogênio associado ao EM na condutividade elétrica e pH da *L. sativa* L. cv. Milena em épocas distintas de cultivo.

Tratamento ⁽¹⁾			Cultivo de verão (Janeiro/2020)				Cultivo de outono (Maio/2020)			
			Solução Nutritiva			Ambiente	Solução Nutritiva			Ambiente
EM (%)	N (%)	Condição	CE (mS cm ⁻¹)	T (°C)	pH ⁽³⁾	T (°C)	CE (mS cm ⁻¹)	T (°C)	pH ⁽³⁾	T (°C)
-	100	Controle ⁽²⁾	1,33 ± 0,2		6,9		1,39 ± 0,3		7,0	
0,1	25	T1	1,51 ± 0,1		5,2		1,52 ± 0,1		5,0	
1	10	T2	1,33 ± 0,1	29,1 ± 1,8	4,8	35,7 ± 2,9	1,38 ± 0,1	22,7 ± 2,2	4,6	24,9 ± 2,6
0,1	10	T3	1,33 ± 0,1		5,3		1,45 ± 0,1		5,1	
1	25	T4	1,4 ± 0,1		4,7		1,8 ± 0,2		4,8	

Microrganismos eficazes (EM); Concentração de Nitrogênio (N); Condutividade elétrica (CE); Temperatura (T). Médias apresentadas seguidas pelo desvio padrão.

⁽¹⁾ Ureia foi usada como fonte de N (0,5 g L⁻¹), exceto para o controle.

⁽²⁾ Solução controle: KNO₃ 1 M + Ca(NO₃)₂ 1 M.

⁽³⁾ pH final da solução.

5.2. Qualidade da Alface

5.2.1. Parâmetros Fitométricos

Os parâmetros de avaliação fitométrica usados neste estudo foram: peso fresco e seco de raiz e parte aérea (cabeça), altura da cabeça (AltCa) e comprimento da raiz (CRz) em cm, comparando o cultivo de verão e outono (Tabela 5).

A efetividade da ação de EM na qualidade de alface hidropônica cultivada com redução de N (75 e 90 %), avaliada num intervalo de 35 dias de cultivo, mostra que o uso de EM na concentração de 0,1 % melhorou o crescimento e desenvolvimento da planta, não ocorrendo o mesmo com a adição de 1 % de EM no sistema NFT (Tabela 5 e Figura 6).

O T1 do cultivo de verão apresentou o peso fresco da parte aérea e raiz, assim como o peso seco da parte aérea significativamente maiores do que o controle ($p < 0,05$). O T3 e T4 não diferiu do controle apenas para o peso fresco da parte aérea. Somente o peso fresco de raiz para o T4 diferiu significativamente do controle ($p < 0,05$).

No cultivo de outono, o T1 não diferiu do controle para o peso fresco da parte aérea, enquanto que o T3 diferiu ($p < 0,05$). Nota-se ainda que o T1 apresentou menor peso fresco de raiz em comparação ao controle e demais tratamentos, estatisticamente diferente apenas do controle ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Devasinghe e Kularathna (2016), avaliando o efeito da pulverização de EM na superfície da folha de alface (*L. sativa*) em sistema hidropônico, não obtiveram diferenças significativas no crescimento, seja em peso fresco como seco.

Não obstante, Prisa (2019a e 2019c) apresentou resultados em concordância com o nosso. O autor obteve aumento significativo no peso fresco de folhas e raiz de planta denominada Mãe-de-milhares (*Kalanchoe daigremontiana*), após inocular dosagens de 1:100 (v/v) de EM diretamente em substrato sólido; em *Aloe barbadensis* Miller e *Aloe arborescens* Miller, após inocular EM (1:100 v/v) em conjunto com 40% de zeólitos chabazíticos ($p < 0,05$). Muthaura et al. (2010) também observou um aumento de 46 % no crescimento de *Amaranthus dubians* pós-inóculo com EM associado ao estrume.

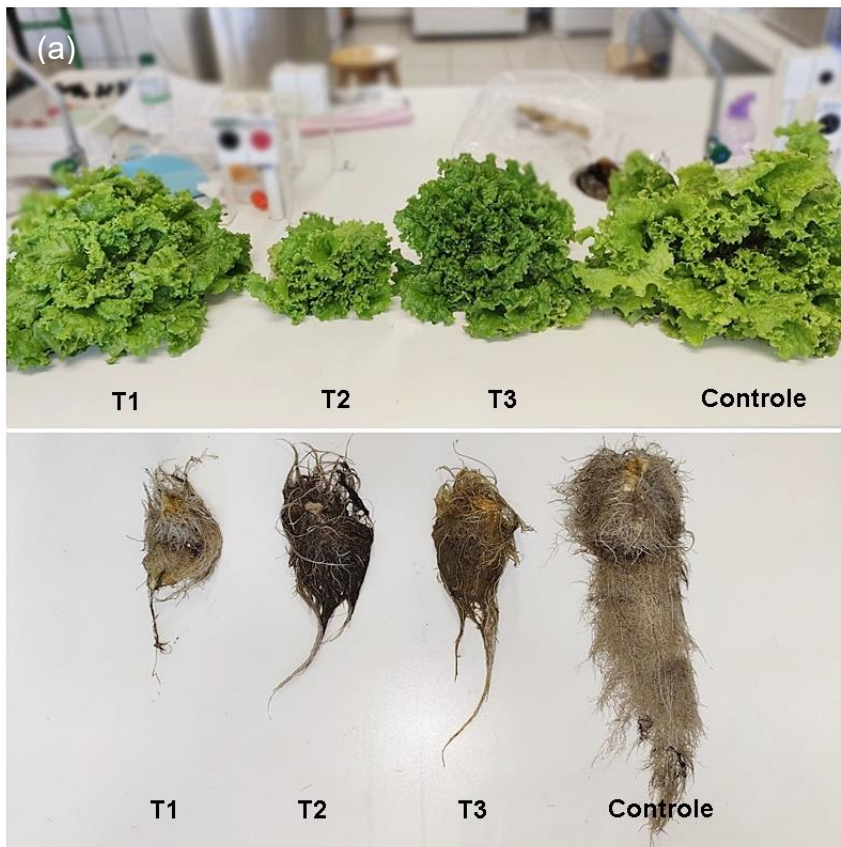
A Tabela 5 também mostra que o T2 apresentou a menor taxa de crescimento em ambos os períodos de cultivo, se comparado aos demais tratamentos. Entretanto, nota-se aumento no peso fresco de raiz no cultivo de outono.

As concentrações de 1 % de EM + 25 % N empregadas no T4 apresentaram-se inadequadas para o desenvolvimento das plantas no cultivo de outono, impossibilitando as

análises subsequentes (Tabela 5, Figura 6). Procedendo o mesmo tratamento em cultivo de verão, não houve diferenças significativas para o peso fresco e seco da parte aérea em comparação ao controle e ainda, apresentou peso fresco de raiz significativamente maior entre os tratamentos controle e T2 ($p < 0,05$).

Em suma, dentre os parâmetros de peso que avaliaram o crescimento das hortaliças, notou-se que o emprego de elevadas concentrações de EM (1 %) afetou negativamente o crescimento e desenvolvimento de alface em hidroponia (Tabela 5), indicando elevada acidez decorrente da exacerbação de crescimento microbiano (Tabela 4). Em contrapartida, o emprego de concentrações de 0,1 % de EM mostraram-se mais eficaz, possibilitando a redução de 75 % de N, mantendo-se o crescimento padrão.

Figura 6. Efeito de Microrganismos Eficazes (EM) no crescimento de Alface Hidropônica (*L. sativa* L. cv. Milena) em Cultivo de Outono.





- (a) Comparação para a parte aérea e raiz entre os tratamentos 1, 2, 3 e controle. (b) Comparação para a raiz entre T4 e controle.
 T1 (25 % N + 0,1 % EM), T2 (10 % N + 1 % EM), T3 (10 % N + 0,1 % EM), T4 (25 % N + 1 % EM) e Controle (Solução Nutritiva completa e sem adição de EM). Nota-se que não houve o pleno desenvolvimento para T4. **Fonte:** Próprio autor.

Contudo, as concentrações de EM pode variar entre culturas e formas de aplicação. Khan, Hossain, Mridha (2014) observaram o aumento significativo da produção de biomassa (peso fresco e seco da parte aérea e raiz) e comprimento de raiz após aplicação direta de EM a 2 %, mas não observaram diferenças significativas após aplicação de 10 % em *Acacia auriculiformis*.

No presente estudo, experimentos conduzidos com aplicações de 5 e 15 % de EM nas alfaces resultou em apodrecimento de mudas em tempo inferior a 10 dias de cultivo, ocasionado por excesso de limo associado ao excesso de microrganismos na raiz (dados não apresentados).

Tabela 5. Efeito da redução de nitrogênio integrado ao uso de EM para os parâmetros fitométricos de *L. sativa* L. cv. Milena.

Tratamento ⁽¹⁾			Cultivo de verão (Janeiro/2020)				
EM (%)	N (%)	Condição	Peso Fresco (g)		Peso Seco (g)	AltCa (cm)	CRz (cm)
			Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea		
-	100	Controle ⁽²⁾	30,61 b	20,18 bc	2,38 b	12,56 b	20,70 ab
0,1	25	T1	98,82 a	31,72 a	8,08 a	16,28 a	25,10 a
1	10	T2	3,65 c	13,17 c	0,48 c	7,86 c	16,34 b
0,1	10	T3	32,74 b	27,03 ab	3,10 b	11,90 b	26,10 a
1	25	T4	30,02 b	33,99 a	2,73 b	12,42 b	19,34 ab
CV (%)			19,47	21,27	27,1	8,55	21,1
Tratamento ⁽¹⁾			Cultivo de outono (Maio/2020)				
EM (%)	N (%)	Condição	Peso Fresco (g)		Peso Seco (g)	AltCa (cm)	CRz (cm)
			Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea		
-	100	Controle ⁽²⁾	254,94 a	39,50 a	13,50 a	24,34 a	26,4 a
0,1	25	T1	203,71 ab	19,09 b	8,99 b	24,26 a	14,60 c
1	10	T2	57,48 c	29,99 ab	3,46 c	19,94 b	21,66 ab
0,1	10	T3	153,12 b	29,77 ab	11,09 ab	20,42 b	16,14 bc
1	25	T4	-	-	-	-	-
CV (%)			18,55	25,84	26,41	7,81	19,13

Microrganismos eficazes (EM); Concentração de Nitrogênio (N); Altura da cabeça (AltCa); Comprimento da raiz (CRz). Não houve o desenvolvimento de plantas para o T4 no cultivo de outono. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si para o Teste Tukey ($p \geq 0,05$).

⁽¹⁾ Ureia foi usada como fonte de N ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), exceto para o controle.

⁽²⁾ Solução controle (estoque): KNO_3 1 M + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M.

A avaliação fitométrica em cultivo de verão, referente à altura da cabeça (AltCa, 16,28 cm) e comprimento da raiz (CRz, 25,1 cm), demonstraram maior desenvolvimento no T1, enquanto que o T3 e T4 não diferiram de controle ($p < 0,05$, Tabela 5). Os maiores CRz ocorreram em T3 (26,1 cm) e T1 (25,1 cm) e o menor em T2 (16,34 cm), enquanto que AltCa de T2 diferiu significativamente de controle e obteve menor valor (7,83 cm) ($p < 0,05$, Tabela 5).

Não obstante, embora apresentassem resultados distintos, o cultivo de outono não ratificou a mesma resposta marcante de EM no desenvolvimento de alface. O T1 não diferiu do controle para AltCa, mas diferiu de controle e demais tratamentos para CRz, observando menor comprimento (14,6 cm); o T3 diferiu do controle em ambos os parâmetros; o T2 diferiu do controle para AltCa ($p < 0,05$). O maior CRz foi observado no T2 (21,66 cm) dentre os tratamentos que receberam EM, mas não diferiu de controle.

Os tratamentos com 0,1 % de EM (T1 e T3) apresentaram os maiores CRz no verão e os menores no outono. O fato provavelmente decorreu pela diferença na temperatura de cultivo relacionada à adesão do microbioma à raiz, diminuindo a superfície de contato para captação de nutrientes.

Khan, Hossain, Mridha (2014) observaram um maior CRz utilizando EM a 2 % em mudas de *Acacia auriculiformis* cultivadas em substrato sólido, assim como Ncube, Minkeni e Brutsch (2011) relataram maior enraizamento e frutificação em tomates.

Higa (1994) introduziu EM no solo de agricultura convencional e postulou crescimento de planta com maior eficiência, com aumento expressivo de fungos, leveduras e bactérias lácticas benéficas. A melhora das condições de saúde do solo, suprimindo os patogênicos reduziu incidência de doenças fúngicas (*Thielaviopsis* spp. e *Verticillium* spp.) e bacterianas (*Xhantomonas* spp., *Erwinia* spp., *Agrobacterium* spp. e *Pseudomonas* spp.) (HIGA, 1998).

Ao inocular o EM, observou-se aumento inicial drástico da população de bactérias fotossintéticas e fixadoras de nitrogênio, atraídas ao local pelo melaço e, aumentando a capacidade de fixação de nitrogênio e taxa fotossintética da planta. A teoria de Higa e Parr (1995) sobre planta mais vigorosa, com aumento da produtividade e melhora da qualidade de produto final tem sido ratificada em trabalhos anteriores (Ruinen, 1970; Pati e Chandra, 1981; Sem Gupta et al., 1982a e 1982b).

Chowdhury et al. (1994) e Lim et al. (1999) relataram interação entre *Rhodopseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces* spp. e *Aspergillus* spp. produzindo substâncias biologicamente ativas no EM, como o ácido indol-acético (AIA) e giberelinas, os hormônios vegetais atuantes importantes no crescimento de raízes.

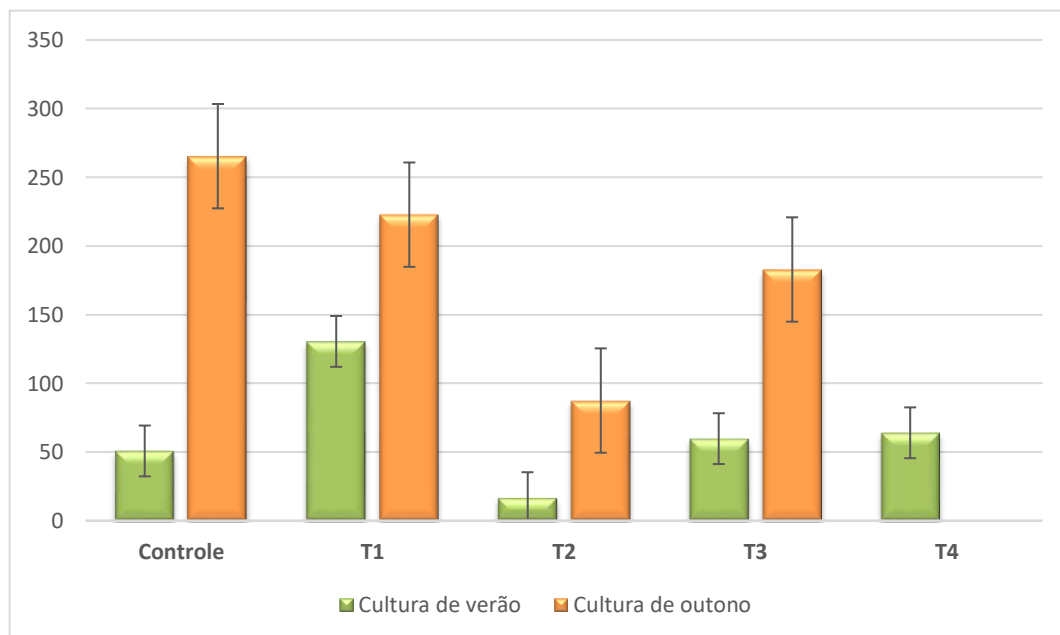
Outrossim, os autores citados relacionaram a ação dos microrganismos por pulverização direta em folhas e/ou por plantio direto em solo. Resh (1997) relatou não haver diferenças fisiológicas entre o cultivo hidropônico e de solo, já que em ambos os sistemas, o fornecimento de nutrientes é via solução/irrigação.

O crescimento de plantas por ação de EM pode estar relacionada ao aumento da competição por nutrientes, principalmente o nitrogênio, entre plantas e microrganismos (MAYER et al., 2010).

Entretanto, ao inocular biofertilizantes, a microbiota inicial do solo difere da água, podendo conduzir a resultados distintos (Figura 4, fluxograma geral). Poucas evidências demonstraram a eficácia da aplicação de EM diretamente na solução nutritiva em sistemas hidropônicos.

Considerando as estações e, que a biomassa de hortaliças consiste da junção entre peso fresco da parte aérea e raiz, a maior efetividade na biomassa de alface ocorreu em temperaturas mais amenas. O aumento considerável de biomassa ocorreu em outono após a aplicação de EM em menor dosagem (0,1 %) e, com média de $24,9 \pm 2,6$ °C (Figura 7).

Figura 7. Valores de biomassa de *L. sativa* L. cv. Milena relacionada à época de cultivo com e sem adição de EM.



Controle (100 % N): KNO_3 1 M + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M. T1: 25 % N + 0,1 % EM; T2: 10 % N + 1 % EM; T3: 10 % N + 0,1 % EM; T4: 25 % N + 1 % EM. **Fonte:** Dados do autor.

Mello e Campagnol (2016) relataram a temperatura ideal para o cultivo de alface

variando entre 20 e 25 °C e, elevações bruscas > 35 °C prejudicam o crescimento e floração, diminuindo a produtividade. A temperatura máxima da solução nutritiva não deve ultrapassar 28 °C, já que valores superiores ocasionam danos à raiz por estresse térmico, prejudicando absorção de nutrientes (LOPES et al., 2011).

A temperatura de cultivo no verão com o ambiente em $35,7 \pm 2,9$ °C e solução nutritiva em $29,1 \pm 1,8$ °C extrapolou os valores máximos, principalmente o primeiro (Tabela 4). Isso pode ter sido o fator principal pelo baixo peso fresco da parte aérea no controle (30,6 g), conduzindo a planta ao modo de sobrevivência, cuja temperatura ambiente variou entre 30 a 50 °C durante o período diurno. O controle do cultivo de outono apresentou peso fresco de parte aérea de 254,94 g sob variação de temperatura diurna de 20 a 28 °C.

Higa (2012) sugere que a ação do EM torna-se mais eficaz em planta sob estresse durante ciclo de crescimento, desencadeando adaptação à situação. A Figura 7 mostra alface consideravelmente maior com 130,5 g no cultivo de verão sob tratamento com 25 % de N e 0,1 % de EM, em comparação ao 50,7 g de controle. Um fator adicional envolvido neste período de estresse foi a longa duração de dias mais claros observado no verão. Filgueira (2013) relacionou melhor adaptação de culturas de alface com dias curtos e temperaturas amenas.

O uso de EM para o cultivo de plantas torna-se mais eficaz em regiões de clima tropical, assim como observado em estudos anteriores (CONDOR, GONZALES E LAKRE, 2007).

Assim, provavelmente o EM proporcionou melhor crescimento em alface hidropônica sob estresse térmico e dias mais longos, aumentando a produtividade (Figura 7, Tabela 5).

5.2.2. Teor de Macro e Micronutrientes

A Tabela 6 apresenta o teor de macro e micronutrientes avaliado em folhas secas de alface. O tratamento controle do cultivo de verão apresentou maior teor de nitrogênio total (34,54 g Kg⁻¹). A oferta de N em forma reduzida a nitrato (NO₃⁻) é diretamente metabolizado pelas raízes e / ou transportado para a parte aérea. A oferta de ureia como fonte de N foi empregada nos tratamentos que receberam EM e a taxa de absorção pelo sistema radicular é menor (MARSCHNER, 1986; MENGEL e KIRKBY, 1987). Ao comparar com o cultivo de outono, o T1 gerou maior massa significativa de nitrogênio orgânico total quando comparado ao controle (49,85 e 39,12 g Kg⁻¹, respectivamente) (p< 0,05).

Entretanto, a redução de 75 e 90 % da oferta de nitrogênio em solução não prejudicou o desenvolvimento de alfaces com a adição de EM, mantendo e/ou aumentando a massa formada em tecido seco.

Ao disponibilizar o nitrogênio em forma de NO₃⁻, este estimula a absorção de cátions, bem como o cálcio (Ca²⁺). Dessa forma, ao observar a concentração de cálcio foliar, o tratamento controle apresentou maior quantidade deste íon em ambos os cultivos, significativamente maior apenas no outono (16,09 g Kg⁻¹) (p< 0,05). Entretanto, no cultivo de verão, o controle não diferiu do T3 tratado com ureia.

O fósforo foliar apresentou resultados positivos ao utilizar o EM em concentrações de 0,1%. O teor no T1 foi significativamente maior em ambos os cultivos (5,97 e 6,13 g Kg⁻¹ respectivamente). O íon K⁺ não diferiu entre tratamentos e épocas de cultivo. O tratamento controle diferiu significativamente para o magnésio (Mg²⁺) no outono (2,53 g Kg⁻¹) e diferiu apenas do T4 (2,21 g Kg⁻¹) no verão.

Xu, Wang e Mridha (2015) relataram aumento significativo no conteúdo de fósforo em tomate ao tratá-los com EM após 50 dias de crescimento. Ao analisar o conteúdo de fósforo no solo, percebeu-se que os microrganismos atuam de forma a facilitar e aumentar a absorção deste íon pelas plantas, reduzindo o conteúdo mineral do solo.

Os microrganismos estão diretamente envolvidos na absorção de fósforo do solo por vários mecanismos, como (1) aumento da área superficial do sistema radicular e/ou aumento dos pelos radiculares (promovidos pela ação de fito-hormônios); (2) transferência de íons fosfato (PO₄³⁻) do solo e incremento de mobilidade de íons de fósforo orgânico e (3) estímulos de processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização do fósforo a partir de formas pouco disponíveis ou inorgânicos, como o P₂O₅, por exemplo (HIGA, 1998; RICHARDSON et al., 2001).

Górski e Kleiber (2010) observaram diminuição significativa no conteúdo de nitrogênio amoniacal (N - NH₄), fósforo, potássio e magnésio em substrato cultivado por plantas como gérberas e rosas. A redução foi associada ao efeito de maior absorção pelas plantas, estimulado pelo maior crescimento e formação de novas folhas.

Ao analisar folhas de tomate, Kleiber et al. (2014) encontrou uma tendência estatística não comprovada para o aumento de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio após inocular o EM diretamente em raiz e pulverizar em folhas. Fraszczak, Kleiber e Klama (2012) observaram o aumento de potássio e nitrogênio em folhas de manjerição ao inocular o EM diretamente no substrato, significativamente maior quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Kleiber, Starzyk e Bosiacki (2013) avaliaram a ação de EM após tratar as sementes de alface (*L. sativa* L c.v. Clotilde) por 30 minutos e submetê-las ao cultivo hidropônico. Houve um aumento significativo no teor de nitrogênio e fósforo e entre potássio, cálcio, magnésio e sódio não deferiu estatisticamente entre o controle. Hu e Qi (2013) observaram aumento estatisticamente significativo para nitrogênio, fósforo e potássio após inocular EM em cultivo de trigo na China devido à maior liberação de nutrientes por meio orgânico e microbiano ($p < 0,05$).

Salama, El-Sayed e El-Gammal (2014) observou aumento significativo em tecido vegetal para nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio após tratar plantas de tamareira “Hayany” em condições de estresse salino com EM e sulfato de potássio (K₂SO₄). Este fato revela que o EM melhora a tolerância das plantas em resposta ao estresse vivido.

A temperatura ambiente no presente estudo sugeriu influenciar na absorção dos macronutrientes, mostrando ser mais efetivo no cultivo de outono, pois estava sob condições em proximidade com a temperatura ideal de cultivo.

Tabela 6. Concentração de macronutrientes primários e secundários em matéria seca de alface (*L. sativa* L. cv. Milena).

Tratamento ⁽¹⁾	Macronutrientes (g Kg ⁻¹)									
	Cultivo de verão (Janeiro/2020)					Cultivo de outono (Maio/2020)				
	N	P	K	Ca	Mg	N	P	K	Ca	Mg
Controle ⁽²⁾	34,54 a	4,44 b	22,50 a	17,28 a	2,60 a	39,12 b	4,89 b	27,25 a	16,09 a	2,53 a
T1	24,88 b	5,97 a	22,50 a	12,02 b	2,35 ab	49,85 a	6,13 a	28,75 a	13,23 b	2,04 b
T2	21,62 c	-	-	-	-	33,58 c	5,09 b	24,75 a	11,55 b	2,15 b
T3	16,28 d	4,10 b	21,50 a	15,57 a	2,60 a	34,44 c	5,20 b	23,75 a	7,98 c	1,69 c
T4	19,36 c	4,05 b	22,00 a	14,07 ab	2,21 b	-	-	-	-	-
CV (%)	6,01	5,64	6,91	12,21	7,59	5,22	8,28	15,39	10,35	7,83

T1: 25% N + 0,1% EM; T2: 10% N + 1% EM; T3: 10% N + 0,1% EM; T4: 25 % N + 1 % EM. Amostras secas obtidas em T2 no cultivo de verão foram insuficientes para realização das análises de P, K, Ca e Mg. Não houve desenvolvimento de plantas para o T4 no cultivo de outono. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si para o Teste Tukey ($p \geq 0,05$).

⁽¹⁾ Ureia foi usada como fonte de N (0,5 g L⁻¹), exceto para o controle.

⁽²⁾ Solução controle 100% N: KNO₃ 1 M + Ca(NO₃)₂ 1 M.

Todos os micronutrientes foram igualmente ofertados na solução nutritiva, com exceção do nitrato (NO_3^-) para os tratamentos com EM. O NO_3^- na solução controle estava prontamente disponível para absorção pela porção radicular da planta, e portanto, presente no tecido foliar em maior quantidade quando comparado aos demais tratamentos (T1, T2, T3 e T4) no verão ($32,69 \text{ mg g}^{-1}$) e outono ($39,43 \text{ mg g}^{-1}$) (Tabela 7).

Cometti et al. (2011) observaram que níveis elevados de nitrato na solução nutritiva aumentou a absorção e acúmulo deste íon em folhas e raízes de alface. Este aumento na oferta pode ocasionar absorção de quantidades acima da capacidade da planta em reduzir NO_3^- a NH_4^+ , acumulando o excedente no tecido, principalmente pelo nitrato estar dissolvido em água, facilitando ainda mais sua absorção (MIYAZAWA, KHATOUNIAN, ODENATH-PENHA 2001).

Dentre os tratamentos que receberam a ureia ($\text{CH}_3\text{N}_2\text{O}$), o T1 apresentou o menor teor foliar de nitrato, $3,99 \text{ mg g}^{-1}$ no verão e $2,72 \text{ mg g}^{-1}$ no outono, diferindo estatisticamente dos demais ($p < 0,05$). O maior teor de nitrato foi observado no T2 para o cultivo de verão ($9,70 \text{ mg g}^{-1}$) e T3 para o outono ($6,09 \text{ mg g}^{-1}$) (Tabela 7).

Wang e Li (2014), estudando o acúmulo de nitrato em vegetais submetidos a diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de amônio, nitrato de sódio, ureia e cloreto de amônio), demonstraram maior acúmulo de nitrato fornecendo nitrato de amônio, diferindo de tratamento com ureia em repolho de Pequim e espinafre ($p < 0,05$). O tratamento com ureia apresentou menor acúmulo de nitrato em espinafre e repolho de Pequim.

No presente estudo, entende-se que o acúmulo de NO_3^- em tecido vegetal, mesmo que em baixas concentrações nos tratamentos com EM (T1, T2, T3 e T4), foi possível devido à ação bacteriana em fixar o N obtido a partir da ureia. Sabe-se que, após a formação de amônio (NH_4^+) em pH inferior a 6,0, a presença de quantidades suficientes de oxigênio proporciona condições favoráveis à ação de diversas bactérias, bem como *Nitrobacter* spp. e *Nitrossomas* spp., dentre outras com a mesma capacidade (LORENZINI, 2012).

Olle e Williams (2015) observaram que a associação de EM resultou em diminuição de 65 % no acúmulo de nitrato em pepino e, em abóboras, não apresentaram resultados significativamente menores em comparação ao controle, havendo menor tendência para o acúmulo. Prisa (2019d) evidenciou diminuição significativa no acúmulo de nitrato em pimenta (Pepper e Chilli) de $3868,34 \text{ mg Kg}^{-1}$ no controle para $2067,92 \text{ mg Kg}^{-1}$ para as plantas tratadas com EM (1:100 v/v) ($p < 0,05$). Ncube e Calistus (2012) relacionam esse efeito devido à imobilização de nitrogênio pelo EM, reduzindo assim, a disponibilidade para plantas.

De acordo com o Regulamento n° 1258/2011 da União Europeia, o limite máximo

permitido de NO_3^- em folhas frescas de alface (*L. sativa* L.) varia entre 3000 e 5000 mg Kg^{-1} (EC, 2011). O tratamento controle diferiu significativamente dos tratamentos que receberam EM, reduzindo em até 6 vezes o teor final em folhas secas e mantendo as características desejadas na hortaliça.

Entretanto, os resultados para o acúmulo de nitrato na literatura brasileira são divergentes. Enquanto alguns autores relatam concentrações excedentes à legislação europeia, outros observaram teores dentro dos limites, tanto para cultivo em solo quanto em hidroponia (BENINNI et al., 2002; FERNANDES et al., 2002, CORREIA et al., 2010).

O ferro foliar aumentou significativamente ao comparar o T1, T3 e T4 com o controle ($p < 0,05$). No cultivo de verão, o T1 apresentou cerca de 3 vezes mais ferro foliar (205,8 mg Kg^{-1}) comparado ao controle (73,64 mg Kg^{-1}). O T3 e T4, apesar de apresentar valores inferiores, representaram aumento de 1 a 2 vezes. Devido ao menor crescimento e formação de matéria seca no T2, as amostras foram insuficientes para realizar análises de ferro, zinco, manganês e cobre. Já no cultivo de outono, a taxa de absorção dobrou entre o T1 (140,8 mg Kg^{-1}) em comparação ao controle (78,75 mg Kg^{-1}) ($p < 0,05$).

A maior concentração de zinco foi observado no T3 (69,7 mg Kg^{-1}) no cultivo de verão e T1 (63,14 mg Kg^{-1}) no outono. O manganês absorveu melhor no verão, apresentando 262,54 mg Kg^{-1} no T3 para o verão ao comparar com o mesmo tratamento no outono, 60,77 mg Kg^{-1} .

O cobre não diferiu estatisticamente entre os tratamentos e épocas de cultivo. No entanto, o alto valor de coeficiente de variação (91,66 e 93,69 % para verão e outono, respectivamente) indica uma maior variabilidade entre as amostras, que por sua vez, não seguiu um padrão. Nesse caso, assume-se que o cobre está presente apenas em traços na amostra, já que sua oferta em solução foi muito baixa.

Górski e Kleiber (2010) observaram aumento no conteúdo de ferro, manganês e cloro ao inocular o EM diretamente na porção radicular de rosas e gérberas. Este fato ocorreu, possivelmente devido a diminuição do pH do solo, aumentando a solubilidade de metais. O teor nutricional nas folhas aumenta de forma significativa ao associar o uso de EM, principalmente para nitrogênio, fósforo, potássio, ferro, manganês e zinco em algodão, resultando em melhor aproveitamento dos nutrientes pelos microrganismos e sistema radicular ($p < 0,05$) (KHALIQ; ABASSI; HUSSAIN, 2006).

Tabela 7. Concentração de micronutrientes em matéria seca de alface (*L. sativa* L. cv. Milena).

Tratamento ⁽¹⁾	Micronutrientes (mg Kg ⁻¹)									
	Cultivo de verão (Janeiro/2020)					Cultivo de outono (Maio/2020)				
	NO ₃ ⁽³⁾	Fe	Zn	Mn	Cu	NO ₃ ⁽³⁾	Fe	Zn	Mn	Cu
Controle ⁽²⁾	32,69 a	73,64 c	27,34 c	135,25 b	8,11 a	39,43 a	78,75 c	33,37 b	115,85 a	5,40 a
T1	3,99 d	205,80 a	46,82 b	158,36 b	4,67 a	2,72 d	140,80 a	63,14 a	76,63 bc	1,20 a
T2	9,70 b	-	-	-	-	5,56 c	91,43 bc	33,15 b	99,99 ab	1,26 a
T3	7,22 bc	132,90 b	69,70 a	262,54 a	8,26 a	6,09 b	125,06 ab	32,52 b	60,77 c	3,52 a
T4	5,52 cd	102,50 c	23,00 c	92,97 c	6,43 a	-	-	-	-	-
CV (%)	14,13	12,85	8,77	11,94	91,66	15,58	20,61	7,99	17,41	93,69

T1 :25% N + 0,1% EM; T2: 10% N + 1% EM; T3: 10% N + 0,1% EM; T4: 25 % N + 1 % EM. Amostras secas obtidas em T2 no cultivo de verão foram insuficientes para realização das análises de Fe, Zn, Mn e Cu. Não houve desenvolvimento de plantas para o T4 no cultivo de outono. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si para o Teste Tukey ($p \geq 0,05$).

⁽¹⁾ Ureia foi usada como fonte de N (0,5 g L⁻¹), exceto para o controle.

⁽²⁾ Solução controle (100 % N): KNO₃ 1 M + Ca(NO₃)₂ 1 M.

⁽³⁾ Valores apresentados para o nitrato (NO₃⁻) estão em mg g⁻¹.

5.2.3. Cor Instrumental pelo método CIELAB

A Tabela 8 apresentou os valores médios das coordenadas cromáticas L^* , a^* , b^* , h° e C para as duas épocas de cultivo e os demais tratamentos.

Através dos resultados, entende-se que a hortaliça possui uma luminosidade média, pois o valor de L^* ficou próximo de 60. Em ambos os cultivos, o T1 apresentou menor luminosidade quando comparado aos demais tratamentos. O T2 e T3 apresentaram cor mais clara no verão (64,25 e 63,82 respectivamente) e não houve diferenças significativas entre o controle e T2 para o cultivo de outono.

Os valores positivos para b^* e negativos para a^* indicam que a tonalidade variou do verde ao amarelo. A cor verde menos intensa foi observada no T2 (-10,76) no cultivo de verão e no T1 (-11) no cultivo de outono. De acordo com o coeficiente de variação, este parâmetro apresentou maior variação no verão e outono.

Para o parâmetro b^* , a hortaliça com maior tendência ao amarelo foi o T2. Ao observar as hortaliças a olho nu, esse fato ficou ainda mais evidente. Este tratamento teve seu crescimento afetado devido à baixa oferta de nitrogênio e a doses mais altas de EM na solução nutritiva. Dentre os tratamentos, o T1 apresentou a menor tendência ao amarelo, o que também se confirmou observando a olho nu.

Os valores obtidos para o croma (C) indicam a saturação da cor, ou seja, a hortaliça é bem pigmentada. As médias variaram entre 22 a 25 para o cultivo no verão e 20 a 24 para o outono. A angulação da tonalidade cromática (h°) apresentou resultados semelhantes entre os tratamentos e em ambas as estações. As médias obtidas entre 178 e 179° resultam em uma alface de coloração muito mais esverdeada, cujo valor máximo é de 180°. Para ambos os cultivos, observou-se a homogeneidade da tonalidade cromática em grande parte das folhas.

A cor determina a aparência dos alimentos, por ser a primeira sensação dos consumidores em relação ao produto (CALVO; DURAN, 1997). Na agricultura, é um atributo de grande importância, especialmente para frutas e hortaliças como indicativo de boa qualidade e para determinar seu valor (ABBOTT, 1999).

A alface cultivar Milena apresenta coloração verde escura brilhante, segundo descrição da empresa Sakata sementes. A clorofila é o pigmento responsável pela coloração verde em plantas (STREIT et al.; 2005). É uma molécula instável e desse modo, a alteração de cor pode levar a redução de qualidade nutricional e valor comercial, modificando a percepção do produto final (CHOEFS, 2002).

Dois estudos recentes realizados por Prisa (2019c, 2019b) com a inoculação de EM em

substrato sólido, conferiu o aumento significativo da taxa foliar de fotossíntese e o conteúdo total de clorofila em *Kalanchoe daigremontiana* e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) ($p < 0,05$).

Apesar de não encontrar diferenças significativas entre plantas tratadas com EM e o controle, Muthaura et al. (2010) e Devasinghe e Kularathna (2016) observaram maior concentração de clorofila foliar (Chl a e b) e aumento na taxa fotossintética, sendo que este último estudo foi conduzido com alface hidropônica. Entretanto, Türk et al. (2017) não encontrou diferença entre as alfaces tratadas com microrganismos e o controle.

Li et al. (2020) encontrou aumento significativo para a taxa fotossintética em tabaco curado após inocular EM associado a carvão vegetal (Biochar), principalmente durante o estágio de crescimento da planta ($p < 0,05$). De forma geral, encontrou também aumento do conteúdo de clorofila tecidual. Xu, Wang e Mridha (2015) observaram um produto de qualidade final superior em comparação ao controle em tomates devido ao aumento da taxa fotossintética em estágios de crescimento, assim como no estudo anterior.

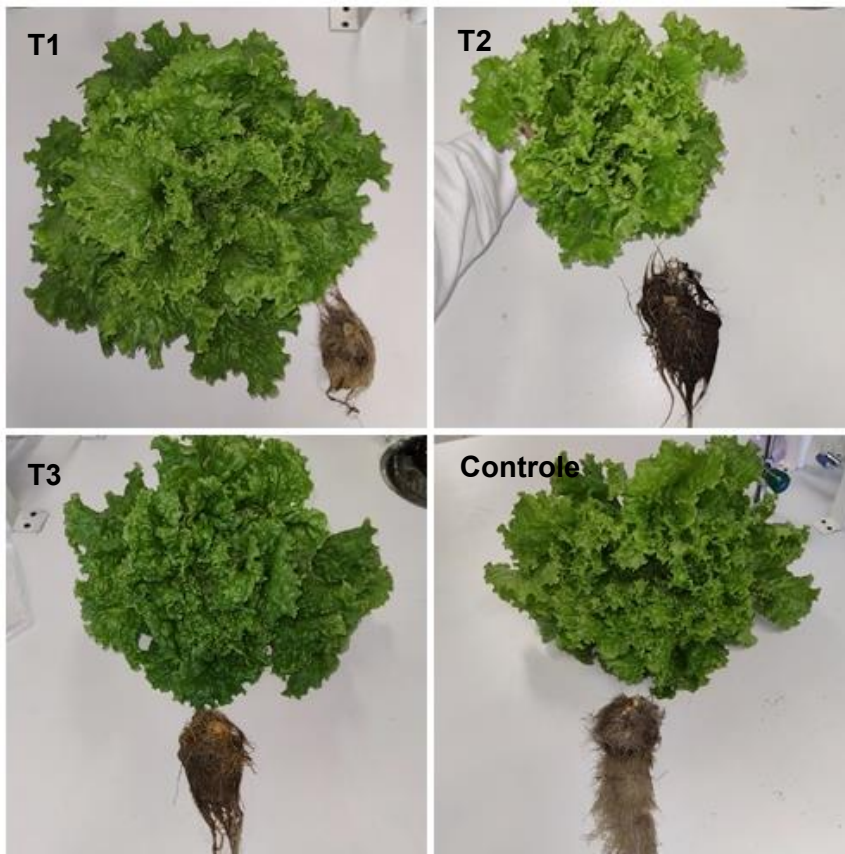
Salama, El-Sayed e El-Gammal (2014) sugere que o aumento no teor de clorofila em folhas pode ser atribuído ao íon potássio, já que desempenha papel fundamental no processo de fotossíntese e osmorregulação.

Os resultados encontrados estão em concordância com o estudo em questão. A coloração mais verde foi observada ao tratar as hortaliças com EM, principalmente no cultivo de outono. A concentração de ureia sugeriu ter maior influência na cor quando comparado aos microrganismos. Observou-se que maiores concentrações de ureia (25 %) tornaram as plantas mais escuras e menos amareladas (Tabela 8, Figura 8).

A taxa fotossintética pode ser influenciada pela ação de microrganismos capazes de realizar a fotossíntese pela presença de bacterioclorofila por meio da captação de energia solar, gerando energia em forma de ATP (BESSA et al., 2015). Bactérias como a *R. palustris* estão relacionadas a essa ação e presentes no EM, o qual proporcionou a melhor coloração das alfaces.

Ainda de acordo com Devasinghe e Kularathna (2016), a submissão de alfaces à análise sensorial indicou maior preferência de cor para as plantas tratadas com EM (1:100 v/v) por meio de pulverização em superfícies de folhas.

Figura 8. Efeito de Microrganismos Eficazes (EM) nos parâmetros de cor de Alface Hidropônica (*L. sativa* L. cv. Milena) em Cultivo de Outono.



T1 (25 % N + 0,1 % EM), T2 (10 % N + 1 % EM), T3 (10 % N + 0,1 % EM), T4 (25 % N + 1 % EM) e Controle (Solução Nutritiva completa e sem adição de EM). **Fonte:** Próprio autor.

Tabela 8. Parâmetros de cor instrumental: análise em três regiões (alto, médio e baixo) por folha de alface *L. sativa* L. cv. Milena.

Tratamento ⁽¹⁾	Cor Instrumental									
	Cultivo de verão (Janeiro/2020)					Cultivo de outono (Maio/2020)				
	L*	a*	b*	h°	C	L*	a*	b*	h°	C
Controle ⁽²⁾	58,33 ±	-12,69 ±	21,92 ±	178,94 ±	25,37 ±	61,75 ±	-12,24 ±	19,15 ±	178,96 ±	22,75 ±
	2,24 bc	1,44 a	2,24 ab	0,02 a	2,6 ab	1,77 ab	1,41 ab	2,35 ab	0,01 a	2,72 ab
T1	56,3 ±	-12,3 ±	18,77 ±	179 ±	22,56 ±	59,88 ±	-11 ±	16,77 ±	178,98 ±	20,11 ±
	1,57 c	1,44 ab	2,6 c	0,05 a	2,66 b	1,74 b	1,26 b	1,54 b	0,03 a	1,88 b
T2	64,25 ±	-10,76 ±	23,35 ±	178,85 ±	25,8 ±	61,66 ±	-13,43 ±	20,66 ±	178,99 ±	24,69 ±
	2,38 a	1,1 b	1,62 a	0,04 a	1,81 a	1,46 ab	1,54 a	2,43 a	0,01 a	2,84 a
T3	63,82 ±	-11,6 ±	22,67 ±	178,89 ±	25,48 ±	62,12 ±	-12,92 ±	20,36 ±	178,96 ±	24,14 ±
	1,81 a	1,24 ab	1,11 ab	0,03 a	1,47 a	1,12 a	1,42 ab	2,45 a	0,01 a	2,78 a
T4	59,43 ±	-12 ±	20,7 ±	178,94 ±	23,96 ±	-	-	-	-	-
	2,21 b	1,14 ab	2,06 bc	0,02 a	2,28 ab	-	-	-	-	-
CV (%)	3,36	10,84	9,29	0,02	8,99	2,52	11,43	11,59	0,01	11,29

Luminosidade (L*), Cor Verde (a* negativo), Cor Amarelo (b* positivo), Angulação da Tonalidade Cromática (h°), Cromo (C). T1 :25% N + 0,1% EM; T2: 10% N + 1% EM; T3: 10% N + 0,1% EM; T4: 25 % N + 1 % EM. Não houve desenvolvimento de plantas para o T4 no cultivo de outono. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si para o Teste Tukey ($p \geq 0,05$). Médias apresentadas seguidas pelo desvio padrão.

⁽¹⁾ Ureia foi usada como fonte de N ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), exceto para o controle.

⁽²⁾ Solução controle (100% N): KNO_3 1 M + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M.

5.3. Caracterização Microbiológica do EM

5.3.1. Análise microbiológica da solução do EM ativo

A solução de EM puro e ativo apresentou concentração de microrganismos semelhantes entre as duas épocas de cultivo. A contagem média foi de $2,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ para bactérias lácticas, $2,9 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ para leveduras e contagem insuficiente para actinomicetos, o qual estava presente de forma reduzida.

Namasivayam e Kirithiga (2010) encontraram contagem menor de bactérias lácticas, leveduras e actinomicetos ($21,2 \times 10^3$, 11×10^2 e $43,3 \times 10^2$ UFC mL⁻¹, respectivamente) na solução de EM puro. Entretanto, houve o aumento na contagem de microrganismos após misturar o EM com farelo de arroz, melão de cana e óleo para $12,1 \times 10^6$, $15,1 \times 10^4$ e $21,3 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, respectivamente.

Conforme a Tabela 9, a necessidade de reposição semanal de EM na solução nutritiva ocorreu após avaliar a redução de 2 a 4 ciclos log na primeira semana e de 1 a 3 ciclos log nas semanas seguintes.

Kleiber, Starzyk e Bosiacki (2013) encontraram contagem de 10^5 UFC mL⁻¹ na solução de EM para bactérias totais, actinobactérias e oligotróficos (bactérias com capacidade de crescimento em concentrações muito baixas de nutrientes). Ao comparar a contagem da solução nutritiva no início e final da semeadura, houve a diminuição de todos os microrganismos presentes, porém mantendo a ordem de grandeza em 10^5 .

Tabela 9. Viabilidade de bactérias lácticas e leveduras na solução nutritiva destinada para ensaio com EM.

Tratamento		Ensaio	Bactérias Lácticas (UFC mL ⁻¹)							
EM-1	N		1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana	
(%)	(%)		1º dia	7º dia	1º dia	7º dia	1º dia	7º dia	1º dia	7º dia
0,1	25	T1	8,1x10 ⁵	1,3x10 ²	6,7x10 ³	2x10 ³	1,3x10 ⁴	1,3x10 ³	1,5x10 ⁴	1x10 ³
1	10	T2	3,7x10 ⁷	1,6x10 ³	3,4x10 ⁵	4,1x10 ³	9,9x10 ⁶	1,2x10 ⁴	8,3x10 ⁶	2,5x10 ⁴
0,1	10	T3	7,2x10 ⁵	6,5x10 ²	6,9x10 ³	5,6x10 ²	1,3x10 ⁴	6,3x10 ²	4,3x10 ⁴	9,7x10 ²
1	25	T4	5,7x10 ⁷	4,7x10 ³	7,8x10 ⁶	1,4x10 ³	2,8x10 ⁶	2,4x10 ³	4,2x10 ⁶	3,4x10 ⁴
			Leveduras (UFC mL ⁻¹)							
0,1	25	T1	5,1x10 ⁴	4,3x10 ²	6x10 ⁴	3x10 ⁴	7,1x10 ³	1,5x10 ³	2,5x10 ⁴	7x10 ²
1	10	T2	1,7x10 ⁵	2,9x10 ³	1,1x10 ⁵	3,5x10 ⁴	1,5x10 ⁶	5x10 ⁴	5,9x10 ⁵	1,9x10 ⁴
0,1	10	T3	2,9x10 ⁴	1,3x10 ²	2,8x10 ⁴	5,9x10 ³	7,5x10 ³	7x10 ³	2,2x10 ⁴	1x10 ²
1	25	T4	3,5x10 ⁵	1,9x10 ³	2,9x10 ⁵	3,8x10 ⁴	1,9x10 ⁶	3,8x10 ⁴	4,4x10 ⁵	1,5x10 ³

T1: 25% N + 0,1% EM; T2: 10% N + 1% EM; T3: 10% N + 0,1% EM; T4: 25 % N + 1 % EM.

5.4. Análise Microbiológica de Raiz e Tecido Foliar

A Tabela 10 apresentou a contagem de microrganismos presentes externamente à raiz e tecido foliar. Avaliou-se a porção epifítica para verificar a adesão dos microrganismos contidos na solução de irrigação. A confirmação dos microrganismos foi realizada por meio de microscopia óptica e estereoscópio.

A cultura de verão apresentou maior contagem para o grupo de bactérias láticas no T2 e T4 (10^7 UFC g^{-1}) e menor no T1 e T2 (10^5 UFC g^{-1}). O grupo de leveduras não diferiu de forma logarítmica e todos os tratamentos apresentaram-se em 10^5 UFC g^{-1} . No entanto, o T1 diferiu significativamente dos demais, apresentando maior concentração ($7,9 \times 10^5$ UFC mL^{-1}) ($p < 0,05$).

A contagem de bactérias láticas e leveduras no tratamento controle foi inferior a 3 UFC g^{-1} de raiz em ambos os cultivos. Não houve adição de EM-1[®] neste tratamento, portanto, a baixa contagem foi esperada.

Higa e Widina (1998) observaram aumento de 61% na contagem de bactérias, 39,8% para actinomicetos e 113% para fungos ao pulverizar a solução de EM e melão diretamente no solo. Posteriormente, o aumento expressivo para todos os microrganismos foi observado em folhas de nabo.

Em relação ao tecido foliar, observou-se o aumento significativo da carga microbiana para mesófilos e psicrotróficos aeróbios nas plantas tratadas com EM em comparação ao controle e, posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos no cultivo de outono ($p < 0,05$). O T2 apresentou maior contagem para os mesófilos e psicrotróficos aeróbios (5×10^9 UFC mL^{-1} e $9,2 \times 10^7$ UFC mL^{-1} , respectivamente) na cultura de verão, diferindo significativamente do controle e demais tratamentos ($p < 0,05$). O controle apresentou menor contagem para ambos os microrganismos. Já no cultivo de outono, o T3 apresentou maior contagem para mesófilos aeróbios ($8,3 \times 10^8$ UFC mL^{-1}), diferindo apenas do controle, e maior contagem para psicrotróficos aeróbios ($4,3 \times 10^6$ UFC mL^{-1}), o qual diferiu do controle e demais tratamentos ($p < 0,05$).

Embora a legislação brasileira não determine os limites para a contagem total de mesófilos e psicrotróficos aeróbios em hortaliças “*in natura*”, adotam-se valores máximos entre 10^5 e 10^6 UFC g^{-1} . Estes valores estão associados à carga microbiana necessária para a ocorrência de deterioração em alimentos, superiores a 10^7 UFC g^{-1} , visto que, valores superiores a 10^9 UFC g^{-1} ocasionam mudanças estruturais definitivas (FRANCO e LANDGRAF, 2016;

MORTON, 2001). O grupo de microrganismos psicrotróficos, especificamente, se tornam prejudiciais por resistir às temperaturas de refrigeração, reduzindo a vida útil do produto (VITTI et al., 2004).

Bruno et al. (2005) e Silva et al. (2007) encontraram valores de contagem para mesófilos e psicrotróficos aeróbios superiores a 10^6 UFC g^{-1} em diversos alimentos minimamente processados, tais como frutas frescas, legumes crus e vegetais em geral.

A microbiota dos vegetais assemelha-se à microbiota do local de cultivo, seja no solo ou na água. Dessa forma, a contagem total de bactérias em hortaliças indica a carga microbiana presente, independentemente de a ação ser benéfica ou maléfica (JAY, 2005).

As altas incidências destes microrganismos podem estar associadas aos fatores intrínsecos das hortaliças, bem como a alta atividade de água, valores de pH favoráveis para o amplo crescimento de bactérias e fungos e o potencial de oxirredução alto (FRANCO e LANDGRAF, 2016).

No entanto, sugere-se que o aumento de mesófilos aeróbios no T1, T2, T3 e T4 relacionam-se ao uso de EM, que certamente, atrai outros microrganismos para o local. Além disso, os lactobacilos presentes podem aumentar a contagem de mesófilos, já que apresentam a mesma faixa de temperatura ótima de crescimento (30 a 45 °C).

A cultura de outono apresentou resultados opostos em relação ao grupo de bactérias lácticas e leveduras em comparação ao verão. A contagem média de bactérias lácticas foi de 10^5 UFC g^{-1} e de leveduras foi de 10^7 UFC g^{-1} . Sugere-se que a temperatura de cultivo pode ter influenciado a multiplicação dos microrganismos, de modo que temperaturas mais quentes ($35,7 \pm 2,9$ °C) favoreceram as bactérias lácticas e temperaturas mais amenas ($24,9 \pm 2,6$ °C), as leveduras, considerando suas faixas ótimas de crescimento.

O desenvolvimento de plantas do T4 no outono pode ter sido prejudicado pelo excesso de microrganismos na raiz, com contagem elevada para bactérias lácticas e leveduras (10^8 e 10^{10} UFC g^{-1} , respectivamente). Após o término do ciclo de crescimento, a raiz apresentou características de odor desagradável, excesso de limbo e degradação dos pelos radiculares.

Tabela 10. Microbiota da raiz e tecido vegetal de alface *L. sativa* L. cv. Milena cultivados em hidroponia com e sem EM.

Tratamento ⁽¹⁾			Contagem Microbiana (UFC g ⁻¹)							
			Cultivo de verão (Janeiro/2020)				Cultivo de outono (Maio/2020)			
			Raiz		Tecido Foliar		Raiz		Tecido Foliar	
EM-1 (%)	N (%)	Ensaio	BL	LV	MA	PA	BL	LV	MA	PA
-	100	Controle ⁽²⁾	< 5x10 ¹	< 5x10 ¹	1,4x10 ⁷ c	6x10 ⁴ c	< 5x10 ¹	< 5x10 ¹	7x10 ⁵ b	9,7x10 ⁴ c
0,1	25	T1	4,1x10 ⁵ c	7,9x10 ⁵ a	6,9x10 ⁶ c	1,1x10 ⁶ b	2,2x10 ⁴ c	1,7x10 ⁷ c	2,4x10 ⁷ a	3,9x10 ⁵ bc
1	10	T2	3,8x10 ⁷ b	4,9x10 ⁵ b	5x10 ⁹ a	9,2x10 ⁷ a	7,4x10 ⁵ b	3,2x10 ⁸ b	1,8x10 ⁷ a	5,8x10 ⁵ b
0,1	10	T3	4,4x10 ⁵ c	3,2x10 ⁵ b	1,5x10 ⁷ b	2,4x10 ⁶ b	4,7x10 ⁵ b	1x10 ⁷ d	8,3x10 ⁸ a	4,3x10 ⁶ a
1	25	T4	8,1x10 ⁷ a	4,8x10 ⁵ b	7,3x10 ⁷ b	1,8x10 ⁶ b	1,8x10 ⁸ a	4,3x10 ¹⁰ a	-	-

Bactéria láctica (BL); levedura (LV); mesófilo aeróbio (MA) e psicrotrófico aeróbio (PA). Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

A contagem para BL e LV no tratamento controle foi < 5 UFC g⁻¹. Não houve desenvolvimento de plantas para o T4 no cultivo de outono. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si para o Teste Tukey (p ≥ 0,05).

⁽¹⁾ Ureia foi usada como fonte de N (0,5 g L⁻¹), exceto para o controle.

⁽²⁾ Solução controle (estoque): KNO₃ 1 M + Ca(NO₃)₂ 1 M.

5.5. Taxonomia Molecular da Comunidade Microbiana

5.5.1. Comunidade bacteriana

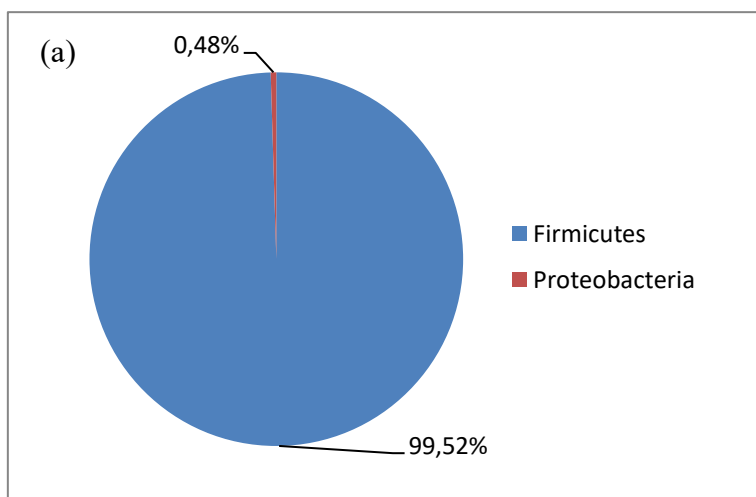
O sequenciamento realizado pelo Illumina MiSeq apresentou resultados para duas amostras distintas: produto comercial EM-1[®] puro e ativo e a região radicular de *L. sativa* L. cv. Milena tratado com 0,1 % de EM + 25 % N (T1). A escolha do T1 da cultura de verão foi devido ao melhor desempenho nos diferentes parâmetros estudados.

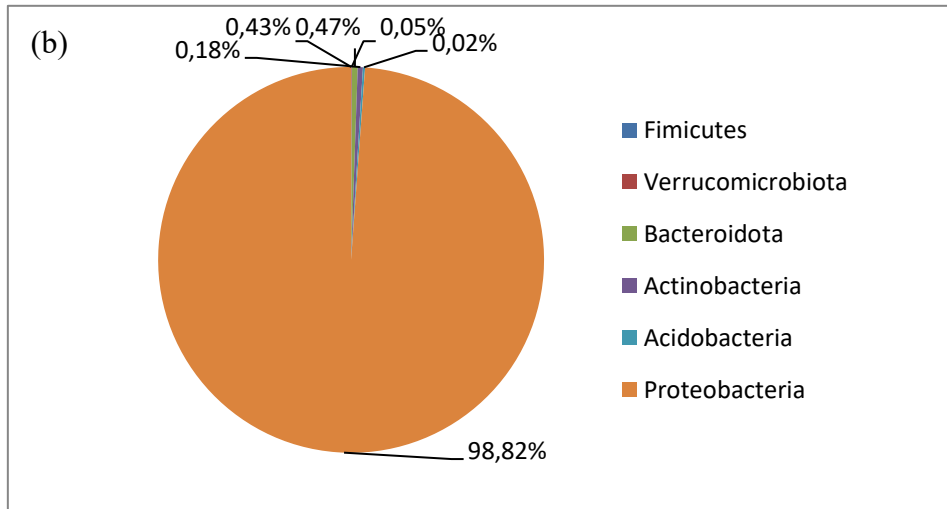
A avaliação da porção radicular é importante visto que este órgão é responsável pela sustentação, absorção de água e nutrientes e também pela produção de exsudatos, isto é, substâncias produzidas e liberadas na rizosfera (SPRICIGO et al., 2009). Esses compostos exsudatos incluem a secreção de íons, oxigênio livre, água, enzimas, mucilagem e metabólitos primários e secundários com carbono em sua composição (BERTIN, YANG, WESTON, 2003). Devido à presença de inúmeros compostos na rizosfera, a interação entre plantas e microrganismos pode ser benéfica.

A região v3v4 do gene 16S rRNA de bactérias apresentou 41.511 sequências no EM e 23.934 sequências na raiz. Dessa forma, a abundância relativa indicou a composição de 99,52 % de *Lactobacillus* spp. e 0,48 % de *Acetobacter* spp. no produto puro.

A raiz apresentou grande diversidade de bactérias, no entanto, 98,82 % integram o filo das proteobactérias e apenas 0,02 % pertencem ao filo firmicutes (Figura 9).

Figura 9. Comunidade bacteriana do produto comercial EM-1[®] e porção radicular de *L. sativa* L. cv. Milena em cultivo hidropônico, análise da região v3v4 do gene 16S rRNA.





(a) Comunidade bacteriana presente no produto comercial EM-1[®] puro e ativo. (b) Comunidade bacteriana presente na porção radicular de *L. sativa* L. cv. Milena. **Fonte:** Dados do autor.

A Tabela 11 especifica os gêneros de microrganismos encontrados em cada filo (Figura 9).

Tabela 11. Gêneros de comunidade bacteriana na porção radicular de *L. sativa* L. cv. Milena em cultivo hidropônico, analisada na região v3v4 do gene 16S rRNA.

Filo	Gênero	
Acidobacteriota (0,1 %)	<i>Edaphobacter</i> spp.	<i>Acidipila</i> spp.
Actinobacteriota (0,03 %)	<i>Amnibacterium</i> spp.	<i>Leifsonia</i> spp.
	<i>Mycobacterium</i> spp.	
Bacteroidota (0,4 %)	<i>Taibaiella</i> spp.	<i>Sphingobacterium</i> spp.
	<i>Flavobacterium</i> spp.	
Firmicutes (0,02 %)	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
	<i>Sphingomona</i> spp.	<i>Cellvibrio</i> spp.
	<i>Sphingobium</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Allorhizobium</i> spp.	<i>Stenotrophomonas</i> spp.
	<i>Rhodopseudomonas</i> spp.	<i>Thermomonas</i> spp.
Proteobacteria (98,82 %)	<i>Afipia</i> spp.	<i>Luteibacter</i> spp.
	<i>Brevundimonas</i> spp.	<i>Rhodanobacter</i> spp.
	<i>Labrys</i> spp.	<i>Methylophilus</i> spp.
	<i>Hyphomicrobium</i> spp.	<i>Pandoraea</i> spp.

	<i>Candidatus bealeia</i> spp.	<i>Castellaniella</i> spp.
	<i>Acetobacter</i> spp.	<i>Bordetella</i> spp.
	<i>Acidisoma</i> spp.	<i>Thiomonas</i> spp.
	<i>Panteoa</i> spp.	<i>Pseudorhodofera</i> spp.
	<i>Burkholderia</i> spp.	
Verrucomicrobiota	<i>Candidatus</i>	<i>Luteolibacter</i> spp.
(0,05 %)	<i>protochlamydia</i>	

A identificação das espécies de microrganismos foi por meio da ferramenta Blast (NCBI). Os gêneros pertencentes ao filo Firmicutes são lactobacilos e bacilos. A espécie de lactobacilos identificada foi o *Lactobacillus parafarraginis* (MT604695. 1; MT045881. 1; MN784681. 1; MK605951. 1). Entre os bacilos, *Bacillus cereus* (MN814015.1) e *Bacillus albus* (MT903005. 1), com 100 % de similaridade para os três microrganismos em questão.

A espécie *L. parafarraginis* foi identificada primeiramente por Endo e Okada (2007), isolados de resíduos destilados de shochu, silagem, vegetais fermentados e grãos de kefir. Zheng et al. (2020) demonstrou que essa espécie complementa o grupo de *L. buchneri*, o qual provem de silagens. Estes são microrganismos heterofermentativos, anaeróbicos facultativos e catalase negativo. O mesmo autor se refere a essa classe de microrganismos de origem ambiental.

As bactérias lácticas estão envolvidas com processos fermentativos e relacionadas à preservação de produtos vegetais. Há evidências de que sua presença é capaz de inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e responsáveis pela decomposição de matéria orgânica (LYNCH, 1988). Na agricultura, seu uso torna-se necessário já que é capaz de produzir hormônios vegetais, especialmente o ácido indol-acético (AIA) (SIMON, 2011).

Telmoudí, Hamdouche, Hassouna (2015) isolaram e identificaram 150 cepas de bactérias lácticas em alface. Todas as cepas produziram substâncias inibitórias contra bactérias patogênicas, visto que a maior capacidade foi para *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e capacidade média para *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Este fato se deve a produção de ácido orgânico como mecanismo inibitório em cepas de *Lactobacillus plantarum*. Resultados similares foram observados por Quattrini et al. (2018) ao relatar a atividade antifúngica de *L. plantarum* e a produção de metabólitos capazes de promover a germinação e auxiliar no crescimento de plantas.

Os bacilos estão associados ao crescimento de plantas e antagonismo de microrganismos

patogênicos por produzir hormônios e ácidos orgânicos (KUMAR, DUBEY, MAHESHWARI, 2012).

As proteobactérias mais importantes identificadas foram *Rhodopseudomonas palustris* (AB498820. 1), *Rhodopseudomonas faecalis* (LC066638. 1) (99,5 e 99,25 % de similaridade, respectivamente) e *Rhodanobacter rhizosphere* (MN904901. 1) (97,65 % de similaridade).

As proteobactérias são formadas por microrganismos importantes para o setor agrícola pela capacidade de produzir substâncias promotoras de crescimento, sideróforos e exo-heteropolissacarídeos (RING, ZENTELLA, SIERRA, 2016). Os compostos que mais auxiliam no crescimento vegetal são as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e compostos com atividade hormonal, incluindo estrigolactonas e brassinosteroides, produzidos por microrganismos (SANTNER; ESTELLE, 2009).

As rizobactérias promotoras de crescimento atuam por meio da fixação de nitrogênio, controle de fatores estressantes, extração de nutrientes do solo, competição com patógenos e produção de hormônios vegetais (PIETERSE et al., 2012).

A *Rhodopseudomonas palustris* é uma bactéria gram-negativa púrpura não sulfurosa que apresenta flexibilidade em alternar em quatro modos distintos de metabolismo: fotoautotrófico, fotoheterotrófico, quimioautotrófico e quimioheterotrófico (LARIMER et al., 2004). Além disso, possui genes que codificam proteínas que compõem complexos coletores de luz e centros de reação fotossintética, normalmente presentes em plantas verdes. Contudo, a capacidade de modulação de fotossíntese de acordo com a quantidade de luz disponível foi observada (HIRAISHI et al., 1992; WONG et al., 2014). As bacterioclorofilas presentes nessas bactérias são A e B e absorvem luz em comprimentos de onda diferentes àqueles absorvidos pela clorofila a (TORTORA, FUNKE, CASE, 2016).

Nota-se que grande parte dos gêneros de bactérias identificadas no presente estudo integra o grupo de Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP), bem como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Acetobacter*, entre outras. Em conjunto, sua atuação se torna vital para a saúde de plantas. Lee e Lee (2015) listaram os principais microrganismos benéficos para hidroponia, em concordância com os microrganismos já citados.

Ao inocular os MPCP em solução nutritiva de trigo, batata e soja de cultivos hidropônicos, Sheridan et al. (2016) observaram que os níveis de colonização pelos microrganismos na rizosfera foram baixos, visto que apenas 1 % das rizobactérias inoculadas aderiram com sucesso a porção radicular. Entretanto, apesar da baixa abundância relativa, os MPCP contribuíram positivamente para o crescimento de plantas e melhoraram a comunidade

microbiana em geral de plantas analisadas.

Dentre os compostos produzidos por esse grupo de microrganismos, o AIA é o mais abundante e bem caracterizado (ZHAO et al., 2010). Embora a via de biossíntese não esteja totalmente elucidada, as rizobactérias sintetizam AIA a partir de concentrações de triptofano encontrados nos exsudatos radiculares (WOODWARD; BARTEL, 2005). Além de proporcionar o crescimento e desenvolvimento vegetal por atuar na divisão celular, a iniciação e diferenciação das raízes é observado, levando a maior proliferação de raiz e formação de pelos radiculares. Dessa forma, o aumento de superfície de contato promove maior absorção de nutrientes e água pela planta (KORASICK et al., 2013).

As citocininas são responsáveis pela divisão celular e atuam diretamente na raiz, por meio da indução da proliferação de pelos radiculares, inibição de raízes laterais e alongação de raízes primárias (DAVIES, 2010; SANTNER; ESTELLE, 2009). De acordo com Murray et al (2007), as bactérias produtoras de citocinina estimulam o crescimento da parte aérea de alface, reduzindo a razão raiz/parte aérea.

As giberelinas atuam na divisão e alongação celular, estimulam a germinação de sementes, crescimento do tubo polínico e florescimento de plantas. A substância mais conhecida é o ácido giberélico e sua produção foi documentada por microrganismos do gênero *Azospirillum* e *Bacillus* (BOTTINI, CASSÁN, PICCOLI, 2004).

Outras substâncias classificadas como fito-hormônios estão envolvidas aos estresses bióticos e abióticos, como a inibição da germinação das sementes, florescimento em resposta aos estresses por seca, salinidade e metais tóxicos. Outros se relacionam à arquitetura de plantas, regulando o crescimento de parte aérea e raiz e sinalizadoras por via endógena e exógena em resposta a estímulos como luminosidade, nutrientes e temperatura, bem como o ácido abscísico (ABA) e estrigolactona, respectivamente (SMYTH, 2011; PANDEY, SHARMA, PANDEY, 2016). Outros autores demonstram que *Pseudomonas* spp tem ação antagonista e antifúngica contra *Fusarium graminearum* e contribui de forma preventiva à podridão da raiz em hidroponia, principalmente em culturas de tomate, alface, pepino e batata (BENIZRI, COURTADE, GUCKERT, 1995; RAAIJMAKERS et al., 2010).

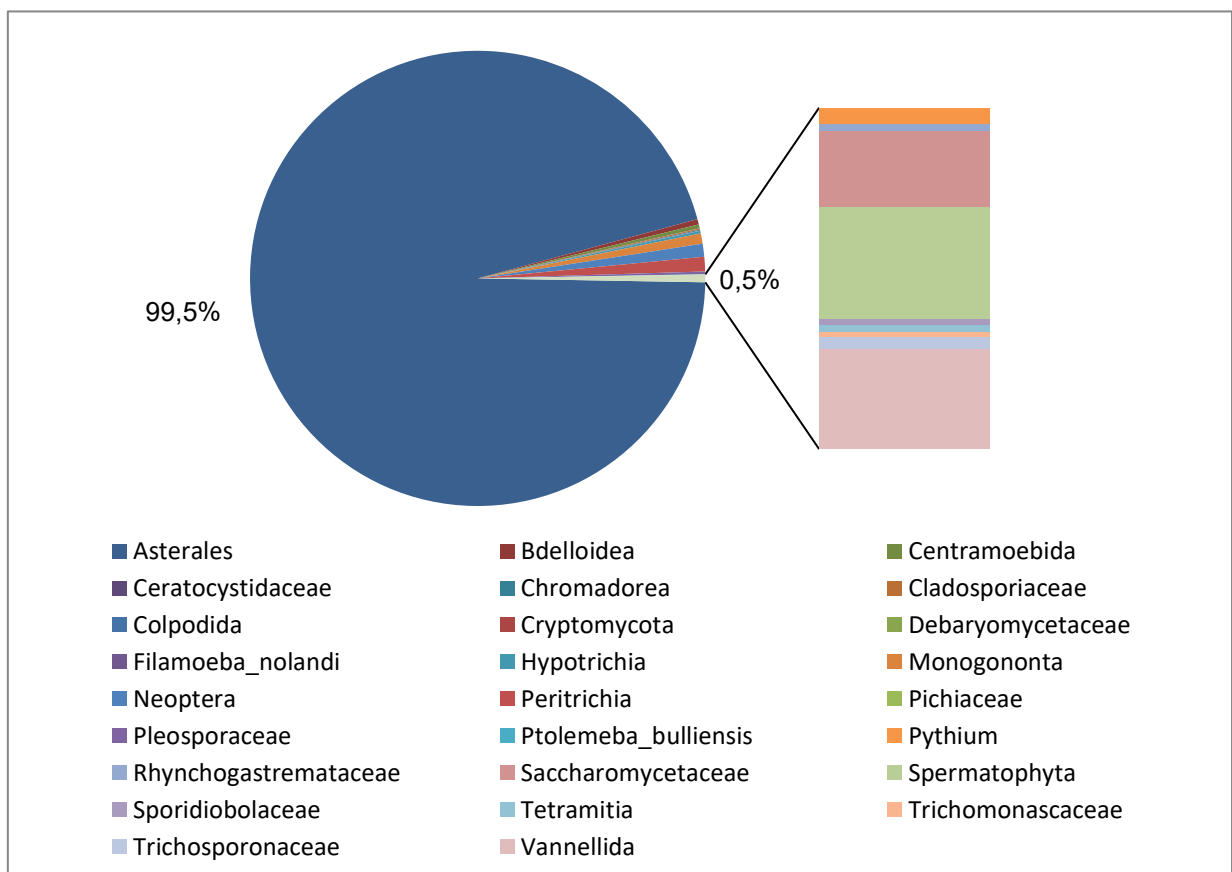
5.5.2. Comunidade de fungos e leveduras

A região ITS do gene 18S do rRNA de eucariontes apresentou 61.436 sequências de DNA para o EM-1[®] e 82.597 sequências para a raiz, onde somente 431 se referem a fungos e

leveduras.

A abundância relativa de microrganismos no produto puro indicou a presença de 99,63% de *Saccharomyces* spp. e 0,37 % de *Brettanomyces* spp. Resultados distintos foram encontrados para a raiz (Figura 10). A abundância relativa indicou 99,5 % de seqüências de outros DNAs, bem como protozoários, parasitas, plantas e insetos. Apenas 0,5 % corresponderam ao total de fungos e leveduras.

Figura 10. Comunidade eucariótica da porção radicular de *L. sativa* L. cv. Milena em cultivo hidropônico, análise da região ITS do gene 18S rRNA.



Fonte: Dados do autor.

Destes 0,5 %, a abundância relativa foi de 67,5 % para fungos e 32,5 % para leveduras.

Os fungos presentes nas amostras de alface estão relacionados a patógenos vegetais, como a *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Ceratocystis* spp e *Pythium* spp. (Figura 11a) e, sua presença é indesejada. Dentre os gêneros citados, a alternariose é a doença que mais afeta as hortaliças. Os sintomas mais comumente associados são lesões foliares necróticas de formato circular, apresenta coloração escura e afeta folhas, caule e pecíolo (MUNIZ et al., 2018).

Em hortaliças de cultivo hidropônico, o *Pythium* spp. é o principal patógeno causador

de podridão de raiz, especialmente em culturas de alface (PINTO et al., 2011). A doença pode afetar também a qualidade do produto final, reduzindo o seu crescimento e produtividade. A colonização do sistema radicular causa o escurecimento e degradação de pelos radiculares, relacionados à altas temperaturas de cultivo (>35°C) e de solução nutritiva (>30°C) e também, a baixa oxigenação dentro das canaletas (SUTTON et al., 2006). No presente estudo, foi observado baixa abundância deste patógeno, correspondendo a 0,012 % do total de sequências de DNA identificadas. Estudo realizado por Charoenrak et al. (2019) avaliou a efetividade de aplicação de produto biológico “Vermicompost” associado com *Trichoderma asperellum* em alface var. manteiga. Observaram a diminuição da colonização de raiz por *Pythium* spp. e, por ser um produto biológico, proporcionou aumento significativo de peso fresco e seco, número e diâmetro de folhas em comparação ao controle ($p < 0,05$).

Dessa forma, a baixa incidência de *Pythium* spp. na raiz de alface (*L. sativa* L. cv. Milena) pode estar relacionada ao uso de EM, o qual desempenhou função semelhante ao agente de biocontrole. Estudos semelhantes estão de acordo com os achados neste estudo. Utkhede, Lévesque e Dinh (2000) e McGehee et al. (2019) verificaram menor incidência de podridão de raiz após tratar hortaliças com biofertilizantes e biofungicidas constituídos por *Bacillus subtilis* GB03, *Bacillus amyloliquefaciens* D747, *Trichoderma harzianum* KRL-AG2 e *Trichoderma virens* G-41 promovendo atração de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, aumentando a produtividade de hortaliças como alface, couve, rúcula, rabanete e mostarda em cultivos hidropônicos.

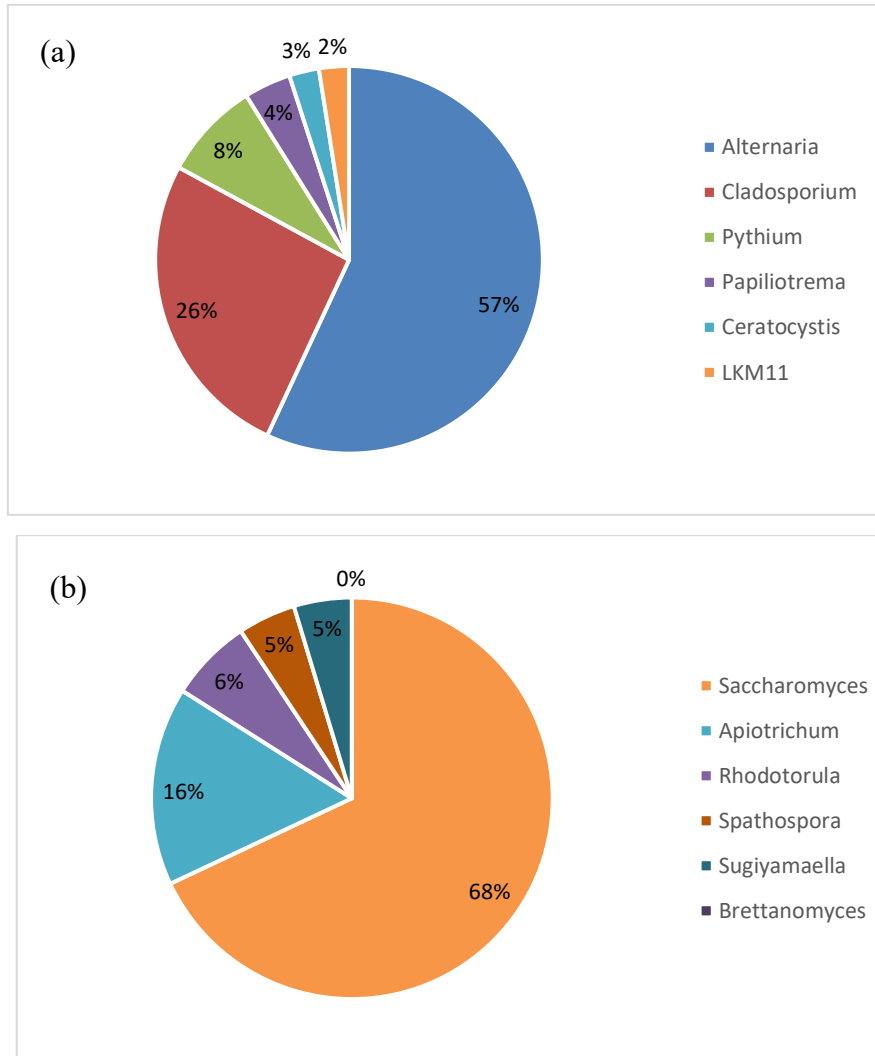
Dentre as leveduras presentes na amostra, 68 % são *Saccharomyces* spp., espécie *S. cerevisiae* (CP046092. 1) e *S. pastorianus* (CP049009. 1; CP048993. 1) (99,41 % de similaridade) e 2 % *Spathospora* spp. (*Candida* sp. HM161753.1; HM161750.1 apresentando 100 % de similaridade) (Figura 11b).

Karajeh (2013) verificou ação benéfica ao inocular *S. cerevisiae* no combate a infecções causadas por nematoides em raiz de pepino, controlando eficazmente o aparecimento de fungos patogênicos. O mecanismo de atividade de biocontrole da levedura pode envolver competição por nutrientes, exclusão de local, parasitismo e resistência induzida e/ou formação de solo físico e químico propriedades inadequadas para patógenos de plantas. Muller e Leopold (1966) relataram que o efeito de aumento do crescimento da aplicação de leveduras pode ser devido à produção de citocininas responsável por aumentar a produção e acúmulo de metabolitos solúveis, promovendo o crescimento e desenvolvimento de plantas e também por reduzir o tempo de germinação (SHALABY, EL-NADY, 2008).

Leveduras do gênero *Candida* spp. são capazes de produzir AIA e atuam diretamente

no crescimento vegetal ao ser inoculada em sementes de arroz (AMPRAYN et al., 2012).

Figura 11. Abundância relativa de fungos e leveduras na porção radicular de *L. sativa* L cv. Milena em cultivo hidropônico.



(a) Distribuição de fungos e (b) leveduras na porção radicular de *L. sativa* L. cv. Milena.
Fonte: Dados do autor.

Resultados similares encontrados por Santos et al. (2020) ao sequenciar o EM-1[®] demonstraram a constituição de 72 % firmicutes, 10 % actinobactéria, 12 % proteobacteria e 3 % acidobactéria. Embora o percentual de firmicutes fosse muito maior para o estudo em questão, ambos estão de acordo com estudos iniciais propostos por Higa (1992) e Bonfim et al. (2011), onde a composição majoritária de microrganismos envolvem bactérias lácticas e leveduras.

O EM proporcionou melhores condições adaptativas para o crescimento de plantas. Em contato, estimula o aumento da população nativa de microrganismos eficazes de ocorrência natural ali presentes e também, a comunidade microbiana na rizosfera. Dessa forma, ocorre a promoção do equilíbrio da microflora e um ecossistema balanceado (NAMASIVAYAM; KIRITHIGA, 2010). O EM pode ser considerado um biofertilizante pela composição de microrganismos que atuam de forma benéfica ao crescimento e desenvolvimentos de plantas e raízes, além da atração de outros microrganismos.

6. CONCLUSÃO

O uso de microrganismos eficazes (EM) diretamente na solução nutritiva em sistema hidropônico se mostrou vantajoso devido à possibilidade de redução do uso de fertilizantes nitrogenados à base de nitrato, reduzindo seu acúmulo em tecido foliar.

Considerando a importância do nitrogênio para o desenvolvimento fisiológico de hortaliças e, que a alface apresenta maior exigência para este íon, a redução de 75 % de N em solução foi possível ao associar o uso de EM sem prejuízos à cultura.

O emprego de 25 % de N com 0,1 % de EM em solução de irrigação apontou melhor resultado nas duas épocas de cultivo (verão e outono) para os parâmetros avaliados. Sugere-se que o crescimento mais vigoroso foi na cultura de verão devido à melhor adaptação de hortaliças proporcionado pelo EM em resposta ao estresse pelo calor.

Além de reduzir o acúmulo de nitrato em tecido vegetal de forma significativa ($p \leq 0,05$), o EM auxiliou em maior captação de nutrientes como magnésio, fósforo, ferro e manganês e proporcionou melhor coloração da hortaliça.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, J. A. Quality measurement of fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v.15, 1999.
- AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied Environmental Microbiology**, v.6, 1990.
- AMPRAYN, K.; ROSE, M.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H.; KENNEDY, I. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v.61, 2012.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v.6, 2004.
- ANDRADE, F. M. C. **Caderno de microrganismos eficientes (EM)**. Viçosa, MG, 2009.
- ANDRADE, F. M. C. **Caderno dos microrganismos eficazes (EM):** Instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. 2ª edição. Viçosa, p.32, 2011.
- ANJANA, S.; IQBAL, M. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.27, 2007.
- AOI, Y. In Situ identification of microorganisms in biofilm communities. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94, 2002.
- APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association**. 5th ed., Washington: 2015.
- APRÍGIO, A.; REZENDE, R.; FREITAS, P.; COSTA, A.; SOUZA, R. Teor de nitrato em alface hidropônica em função de vazões e períodos de pós-colheita. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.9, 2012.
- BALACHANDAR, D.; SANDHIYA, G.; SUGITHA, T.; KUMAR, K. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.22, 2006.
- BALDOTTO, L. E.; BALDOTTO, M. A.; CANELLAS, L. P.; BRESSANS SMITH, R.; OLIVARES, F. L. Growth promotion of pineapple 'Vitória' by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.5, 2010.
- BENINNI, E. R.; TAKAHASHI, H. W.; NEVES, C. S.; FONSECA, I. C. Teor de nitrato em alface cultivada em sistemas hidropônico e convencional. **Horticultura Brasileira**, v.20, 2002.
- BENIZRI, E., COURTADE, A., GUCKERT, A. Fate of two microorganisms in maize simulated rhizosphere under hydroponic and sterile conditions. **Soil Biol. Biochem**,

v.27, 1995.

BERTIN, C.; YANG, X. H.; WESTON, L. A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil**, The Hague, v.256, 2003.

BESSA, L. P.; VIEIRA, L. M.; SILVA, F. T.; FERREIRA, J. S.; VICELMA, L. C.; BATISTA, F. R. Determinação da bacterioclorofila e da concentração celular das bactérias púrpuras não sulfurosas *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodopseudomonas palustres*. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, v.1, n.3, UNICAMP, 2015.

BEZERRA NETO, F.; BARROS JÚNIOR, A. P.; SILVA, E. O.; NEGREIROS, M. Z.; OLIVEIRA, E. Q.; SILVEIRA, L. M.; CÂMARA, M. J. T.; NUNES, G. H. S. Qualidade nutricional de cenoura e alface cultivadas em Mossoró-RN em função da densidade populacional. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.24, n.4, 2006.

BONFIM, F. P.; HONORIO, I. C.; REIS, I. L.; PEREIRA, A. J.; SOUZA, D. B. **Caderno dos Microrganismos Eficientes (EM):** Instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. 2. ed. Viçosa: Imprensa da UFV, 2011.

BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.65, 2004.

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. **Rev. Ceres**, v.21, n.113, 1974.

BREMNER, J. M.; KEENEY, D. R. Steam distillation methods for determination of ammonia, nitrate and nitrite. **Anal. Chem. Acta**, Amsterdam, v.32, 1965.

BRUNO, L. M.; QUEIROZ, A. A.; ANDRADE, A. P.; VASCONCELOS, N. M.; BORGES, M. F. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em fortaleza (CE). **B. Ceppa**, v.23, n.1, 2005.

CALVO, C.; DURÁN, L. Propiedades Físicas II - Ópticas y color. **Temas en Tecnología de Alimentos**. México: Ed. Instituto Politécnico Nacional, v.1, 1997.

CARDOSO, E. J.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia de Solo**. 2ª Edição. Piracicaba: SP, 2016.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.; YOUNGS, V. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commun, soil science and plant analysis**, v.6, n.1, 1975.

CENCI, S. A. **Boas Práticas de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças**. Recomendações básicas para a aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, v.1, p.67-80, 2006.

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Esalq/USP. HORTIFRUTI/CEPEA 2019. Disponível em <<https://www.hfbrasil.org.br/br/hortifruti-cepea-alta-produtividade-reduz-custos-em-2017.aspx>> Acesso em 02/02/2019.

CHAROENRAK, P.; CHAMSWARNG, C.; INTANOO, W.; KEAWPRASERT, N. The effects of vermicompost mixed with *Trichoderma asperellum* on the growth and Pythium root rot of lettuces. **International Journal of GEOMATE**, v. 17, 2019.

CHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, 2002.

CHOW, K. K.; PRICE, T. V.; HANGER, B. C. Effects of Nitrogen, Potassium, Calcium Concentrations and Solution Temperatures on the Growth and Yield of Strawberry cv. Redgauntlet in a Nutrient Film (NFT) Hydroponic System. **Acta Hort**, XXVI IHC – Protected Cultivation, 2004.

COMETTI, N. N.; MARTINS, M. Q.; BREMENKAMP, C. A.; NUNES, J. A. Nitrate concentration in lettuce leaves depending on photosynthetic photon flux and nitrate concentration in the nutrient solution. **Horticultura Brasileira**, v.29, 2011.

COMMISSION REGULAMENTATION (EC): Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. (EC) n°1258/2011 of the European Parliament and of the Council.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim Hortigranjeiro**, n. 12, v. 5, Dezembro/2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim Hortigranjeiro**, n. 2, v. 6, Fevereiro/2020.

CONDOR, A.; GONZALEZ, P.; LAKRE, C. Effective microorganisms: Myth or reality? **The Peruvian Journal of Biology**, v.14, 2007.

CORALES, R.; HIGA, T. Rice Production with effective microorganisms: impact on rice and Soil. **SANGKKARA Seventh International Conference on Kyusei Nature Farming**. Christchurch Polytechnic, Christchurch, New Zeland, 2002.

CORREIA, M.; BARROSO, A.; BARROSO, M.; SOARES, D. Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. **Food Chemistry**, v.120, n.4, 2010.

CPR - Centro Paranaense de Referência em Agroecologia. Disponível em <http://www.cpra.pr.gov.br/arquivos/File/Alface.pdf> - Acesso em 10/02/2019.

DAVIES, P. J. Regulatory factors in hormone action: level, location and signal transduction. **Plant hormones**. Dordrecht: Springer, 2010.

DEVASINGHE, U.; KULARATHNA, L. Effect of Effective Microorganisms and Vermiwash on Yield and Quality of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Hydroponic Cultivation. **International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS)**, v.4, n.1, 2016.

DU, S. T.; ZHANG, Y. S.; LIN, X. Y. Accumulation of Nitrate in Vegetables and Its Possible Implications to Human Health. **Agricultural Sciences in China**, v.6, n.10, 2007.

ENDO, A.; OKADA, S. *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis*

sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.57, 2007.

EZBIOCLOUD. Disponível em: <https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>. Acesso em 20 de dezembro de 2020.

FAQUIN, V. et al. Crescimento e concentração de nitrato em alface sob influência da relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e cloro na solução nutritiva e do horário de colheita. **Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas**, 21, 1994.

FAQUIN, V.; ANDRADE, A. **Nutrição mineral e diagnose do estado nutricional de hortaliças**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004.

FAQUIN, V.; FURLANI, P. Cultivo de hortaliças de folhas em hidroponia em ambiente protegido. **Informe agropecuário**, v.20, 1999.

FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. **Acúmulo de nitrato (NO-3) em alface: mito?** NOTESALQ, Piracicaba, n.5, p.4-5, 1996.

FARAWAY, J. J. **Extending the Linear Model with R: Generalized Linear, Mixed Effects and Nonparametric Regression Models**. 2ª Edição, University of Bath, UK, 2016.

FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E.; PEREIRA, P. R.; FONSECA, M. C. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, v.20, 2002.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 3ª. Ed, 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª Edição. Artmed, 2013.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

FRAZÃO, J. J.; SILVA, A. R.; OLIVEIRA, V. A.; CORRÊA, R. S. Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada e ureia na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.18, n.12, p. 1262-1267, 2014.

FRAŹSZCZAK, B.; KLEIBER, T.; KLAMA, J. Impact of effective microorganisms on yields and nutrition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) and microbiological properties of the substrate. **African Journal of Agricultural Research**, v.7, n.43, 2012.

FURLANI, P. R. **Cultivo de alface pela técnica de hidroponia - NFT**. Campinas: IAC, 1995. (IAC. Documentos, 55).

FURLANI, P. R.; SILVEIRA, L. C.; BOLONHEZI, D; FAQUIN, V. Cultivo Hidropônico de Plantas. Parte 1, Solução Nutritiva. **Infobibos – Informações Tecnológicas**, 2009a.

FURLANI, P. R; SILVEIRA, L. C. P; BOLONHEZI, D; FAQUIN, V. Cultivo Hidropônico de Plantas. Parte 2, Conjunto Hidráulico. **Infobibos – Informações Tecnológicas**, 2009b.

- GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. **Plos One**, San Francisco, v.7, 2012.
- GOEL, R.; SUYAL, D.; DASH, B.; SONI, R. Soil Metagenomics: a tool for sustainable agriculture. **Mining of Microbial Wealth and MetaGenomics**. Springer, Singapore, 2017.
- GÓRSKI, R.; KLEIBER, T. Effect of effective microorganisms (EM) on nutrient contents in substrate and development and yielding of rose (*Rosa x hybrida*) and gerbera (*Gerbera jamesonii*). **Ecological chemistry and engineering**, v.17, n.4, 2010.
- GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, The Hague, v.280, 2007.
- HENDRY, G. A.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman & Hall, 1993.
- HENZ, G.; SUINAGA, F. Tipos de Alface Cultivados no Brasil. **Comunicado Técnico 75**, Brasília – DF, 2009.
- HIGA, T. Effective microorganisms: a new dimension for nature farming. **Proceedings of the 2nd international nature farming conference**. U.S. Department of Agriculture; Washington, DC, USA, 2004.
- HIGA, T. Nature Farming and Environmental Management Through Effective Microorganisms – The Past, Present and Future (2012): http://www.infrc.or.jp/english/KNF_Data_Base_Web/7th_Conf_KP_2.html
- HIGA, T. Studies on the application of microorganisms in nature farming. The practical application of effective microorganisms in Japan. **Unpublished**, 1998.
- HIGA, T. **What is EM Technology**. College of Agriculture, University of Ryukyus, Okinawa, Japan, 1995.
- HIGA, T.; PARR, J. Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment . **Atami: International Nature Farming Research Center**, 2008.
- HIGA, T.; PARR, J. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. **International Nature Farming Research Center**, 1994.
- HIGA, T.; WIDIDANA, G. Concept and theories of effective microorganisms. **Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming**, US Department of Agriculture, Washington, DC, USA, 1991.
- HIRAISHI, A.; SANTOS, T. S.; SUGIYAMA, J.; KOMAGATA, K. "*Rhodopseudomonas rutila* is a Later Subjective Synonym of *Rhodopseudomonas palustris*". **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.42, 1992.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. **The water culture method for growing plants without soil.** Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950.

HOPWOOD, D. A.; BIBB, M. J.; CHATER, K. F.; KIESER, T.; BRUTON, C. J.; KIESER, H. M.; LYDIATE, D. J.; SMITH, C. P.; WARD, J. M.; SCHREMPF, H. Genetic manipulation of *Streptomyces*. **A laboratory Manual.** The John Innes Institute, Norwich, United Kingdom, 1985.

HU, C.; QI, Y. Long-term effective microorganisms application promote growth and increase yields and nutrition of wheat in China. **European Journal of Agronomy**, v.46, 2013.

IAC: **Instituto Agronômico de Campinas.** Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos.** Editora Artmed, 2005.

JEANNEQUIN, B. Soilless cultivation systems in market gardening. **Soilless crops.** Paris: INRA, 1987.

JONES, J. B. Hydroponics: Its history and use in plant nutrition studies. **Journal of Plant Nutrition**, v.5, n.8, 1982.

JÓZWIAKOWSKI, K.; CZERNAŚ, K.; SZCZUROWSKA, A. Preliminary results of studies on the purification of water in a pond using the SCD Probiotics technology. **Ecology and Hydrobiology**, v.9, n.2-4, 2009.

KAMINSKY, L. M.; TREXLER, R. V.; MALIK, R. J.; HOCKETT, K. L.; BELL, T. H. The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants. **Trends in Biotechnology**, v.1, 2018.

KARAJEH, M. R. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* on controlling the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infection and promoting cucumber growth and yield under laboratory and field conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.46, n.20, 2013.

KHALIQ, A.; ABBASI, K.; HUSSAIN, T. Effects of integrated use of organic and inorganic nutrient sources with effective microorganisms (EM) on seed cotton yield in Pakistan. **Bioresource Technology**, v.97, n.8, 2006.

KHAN, B. M.; HOSSAIN, M. K.; MRIDHA, M. A. Improving *Acacia auriculiformis* seedlings using microbial inoculant (Beneficial Microorganisms). **Journal of Forestry Research**, v.25, n.2, 2014.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. **Anuário brasileiro de horticultura 2019.** Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018.

KLEIBER, T.; STARZYK, J.; GÓRSKI, R.; SOBIERALSKI, K.; SIWULSKI, M.; REMPULSKA, A.; SOBIAK, A. The studies on applying of effective microorganisms (EM) and CRF on nutrient contents in leaves and yielding of tomato. **Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus**, v.13, n.1, 2014.

KLEIBER, T.; STARZYK, J.; BOSIACKI, M. Effect of nutrient solution, effective microorganisms (EM-A), and assimilation illumination of plants on the induction of the growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponic cultivation. **Acta Agrobotanica**, v.66, n.1, 2013.

KORASICK, D. A.; ENDERS, T. A.; STRADER, L. C. Auxin biosynthesis and storage forms. **Journal of Experimental Botany**, London, v.64, 2013.

KUMAR, P.; DUBEY, R.; MAHESHWARI, D. Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, Bethesda, v.167, n.8, 2012.

LARIMER, F.; CHAIN, P.; HAUSER, L.; LAMERDIN, J.; MALFATTI, S.; DO, L.; LAND, M.; PELLETIER, D.; BEATTY, T.; LANG, A.; TABITA, R.; GIBSON, J.; HANSON, T.; BOBST, C.; TORRES, J.; PERES, C.; HARRISON, F.; GIBSON, J.; HARWOOD, C. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. **Nature Biotechnology**, v.22, 2004.

LANA, M. M.; MOITA, A. W. Visual quality and waste of fresh vegetables and herbs in a typical retail market in Brazil. **Horticultura Brasileira**, v.37, 2019.

LASTRA, O. C. Derivative Spectrophotometric Determination of Nitrate in Plant Tissue. **J AOAC**, v.86, n.6, 2003.

LEE, S.; LEE, J. Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems: Types and characteristics of hydroponic food production methods. **Scientia Horticulturae**, n.195, 2015.

LI, X.; SHAO, X.; DING, F.; YUAN, Y.; LI, R.; YANG, X.; GAO, C.; MIAO, Q. Effects of effective microorganisms biochar-based fertilizer on photosynthetic characteristics and chlorophyll content of flue-cured tobacco under water-saving irrigation strategies. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.80, n.3, 2020.

LOPES, C. C.; TSURUDA, J.; IANCKIEVIEZ, A.; KIKUCHI, F.; RODINI, I.; BASSO, J.; TAKAHASHI, H. Influência do horário de colheita no teor de nitrato em alface hidropônica. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.1, 2011.

LUZ, G. L.; MEDEIROS, S.; MANFRON, P.; AMARAL, A. D.; MÜLLER, L.; TORRES, M.; MENTGES, L. A questão do nitrato em alface hidropônica e a saúde humana. **Revista de Ciência Rural**, v.38, n.8, 2008.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do Estado Nutricional de Plantas: princípios e aplicações**. 2ª Edição. Potafós, 1992.

MAYER, J.; SCHEID, S.; WIDMER, F.; FLIEßBACH A.; OBERHOLZER, H. R. How

effective are ‘Effective microorganisms® (EM)’? Results from a field study in temperate climate. **Applied Soil Ecology**, 2010.

MELLO, S.; CAMPAGNOL, R. **Olericultura: Cultivo Hidropônico**. Curitiba: SENAR – PR, 2016.

MENEGAES, J. F.; FILIPETTO, J. E.; RODRIGUES, A.; SANTOS, O. Produção sustentável de alimentos em cultivo hidropônico. **Revista Monografias Ambientais**, v.14, n.3, 2015.

MENEZES, L. N.; SANTOS, O. S.; SCHMIDT, D. Produção de sementes de alface em cultivo hidropônico. **Ciência Rural**, v.31, n.4, 2001.

MISRA, S.; PANDEY, S.; DIXIT, V.; MISHRA, S. K.; KHAN, M. H.; AGARWAL, L.; CHAUHAN, P. S. Soil microbiome for enhanced crop productivity. **Mining of Microbial Wealth and Metagenomics**. Springer, Singapore, 2017.

MITSUIKI, C. **Efeitos de sistemas de preparo de solo e do uso de Microrganismos Eficazes nas propriedades físicas do solo, produtividade e qualidade da batata**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MIYAZAWA M.; KHATOUNIAN, C. A.; ODENATH-PENHA, L. A. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. **Agroecologia Hoje**. n.7, 2001.

MOHAN, B. Evaluation of organic growth promoters on yield of dryland vegetable crops in India. **Journal of Organic Systems**, n.3, 2008.

MULLER K.; LEOPOLD A. C. **Correlative aging and transport of p32 in corn leaves under the influence of kinetin plant**, v.68, 1966.

MUNIZ, P. H. P. C.; MARQUES, M. G.; PEIXOTO, G. H. S.; SIMÃO, K. G.; CARVALHO, D. D. C. Caracterização morfológica de *Alternaria alternata* associado a sementes de alface americana cv. ‘Astra’. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v.5, n.1, 2018.

MURRAY, J. D.; KARAS, B. J.; SATO, S.; TABATA, S.; AMYOT, L.; SZCZYGLOWSKI, K. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. **Science**, Washington, v.315, 2007.

MUTHAURA, C.; MUSYIMI, D.; OGUR, J.; OKELLO, S. Effective microorganisms and their influence on growth and yield of pigweed (*Amaranthus dubians*). **ARPN Journal of Agricultural and Biological Science**, n.1, v.5, 2010.

MCGEHEE, C. S.; RAUDALES, R. E.; ELMER, W. H.; MCAVOY, R. J. Efficacy of biofungicides against root rot and damping-off of microgreens caused by *Pythium* spp. **Crop Protection**, v.121, 2019.

NAMASIVAYAM, K.; KIRITHIGA, R. Effect of formulation of effective microorganism (EM) on post treatment persistence, microbial density and soil macronutrients. **Science and Technology**, v.2, n.5, 2010.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIERAMELLARA, G. e RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v.54, 2003.

NASCIMENTO, M. V.; SILVA JUNIOR, R. L.; FERNANDES, L. R.; XAVIER, R. C.; BENETT, K. S. S.; SELEGUINI, A.; BENETT, C. G. S. Manejo da adubação nitrogenada nas culturas de alface, repolho e salsa. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v.4, n.1, 2017.

NCUBE, L.; MINKENI, P. N. S.; BRUTSCH, O. Agronomic suitability of effective microorganisms for tomato production. **African Journal of Agricultural Research**, v.6, 2011.

NCUBE, N.; CALISTUS, B. Effects of the integrated use of effective micro-organisms, compost and mineral fertilizer on greenhouse-grown tomato. **African Journal of Plant Science**, v.6, 2012.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, São Paulo, v.26, 2003.

OKADA, K.; INOUE, Y.; SATOH, K.; KATOH, S. Effects of light on degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached rice leaves. **Plant cell physiology**, v.33, n.8, 1992.

OKURA, M.; SIQUEIRA, K. Enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em água de abastecimento e de minas. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, n.135, 2008.

OLLE, M.; WILLIAMS, H. Effective microorganisms and their influence on vegetable production: a review. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.88, n.4, 2013.

OLLE, M.; WILLIAMS, H. The Influence of Effective Microorganisms on the Growth and Nitrate Content of Vegetable Transplants. **Journal of Advanced Agricultural Technologies**, v.2, n.1, 2015.

PANDEY, A.; SHARMA, M.; PANDEY, G. K. Emerging roles of strigolactones in plant responses to stress and development. **Frontiers in Plant Science**, New Haven, v.7, n.434, 2016.

PATI, B. R.; CHANDRA, A. K. Effect of spraying nitrogen fixing microorganisms. **Plant and Soil**, v.33, 1981.

PAULO, R. L.; SERRA, J. C. Estudo de caso envolvendo uma indústria de fertilizantes na cidade de porto nacional/TO. **Sistemas & Gestão**, v.10, 2015.

PEGORER, A. P. R.; FRANCH, C. M. C.; FRANCH, J. L.; SIQUEIRA, M. F. B.; MOTTA, S. D. Informações sobre o uso do E.M. (Microrganismos Eficazes) – Apostila. **Agricultura natural messiânica** - Fundação Mokiti Okada – Rio de Janeiro, 1995.

PIETERSE, C. M. J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEONREYES, A.; VAN

WEES, S. C. M. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.28, 2012.

PINTO, Z. V.; CIPRIANO, M. A.; GALVÃO, J. A.; BETTIOL, W.; PATRÍCIO, F. R.; SANTOS, A. S. Podridão de raízes causada por *Pythium aphanidermatum*, em cultivares de alface produzidas em sistema hidropônico. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v.37, n.4, 2011.

PÔRTO, M.; ALVES, J. C.; SOUZA, A.; ARAÚJO, R.; ARRUDA, J.; JÚNIOR, U. Doses de nitrogênio no acúmulo de nitrato e na produção de alface em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v.30, 2012.

PRISA, D. Effect of chabazitic-zeolites and effective microorganisms on growth and chemical composition of *Aloe barbadensis* Miller and *Aloe arborescens* Miller. **International Journal of Agricultural Research, Sustainability, and Food Sufficiency (IJARSFS)**, v.6, n.1, 2019 (a).

PRISA, D. Effect of natural zeolites and zeolites added with microorganisms for the growth of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata L.). **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v.4, n.1, 2019 (b).

PRISA, D. Effective microorganisms for germination and root growth in *Kalanchoe daigremontiana*. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v.3, n.3, 2019 (c).
PRISA, D. Improvement quality and content of pepper and chilli nitrates influenced by the effective microorganisms. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences**, v.53, n.1, 2019 (d).

QUATTRINI, M.; BERNARDI, C.; STUKNYTÈ, M.; MASOTTI, F.; PASSERA, A.; RICCI, G.; VALLONE, L.; NONI, I.; BRASCA, M.; FORTINA, M. Functional characterization of *Lactobacillus plantarum* potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. **Food Research International**, v.106, 2018.

RAAIJMAKERS, J.; DE BRUIJN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiol. Rev.** 34, 2010.

RASHID, M. T.; WEST, J. **Dairy Wastewater Treatment with Effective Microorganisms and Duckweed for Pollutants and Pathogen Control. Wastewater Reuse–Risk Assessment, Decision-Making and Environmental Security**, 2007.

RESH, H. M. **Hydroponic food production**. 5th ed. Califórnia, EUA, Woodbridge Press Publishing Company, 1997.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J.; McNEILL, A. M.; PRIGENTCOMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v.321, n.1, 2009.

RING, H. J. B.; ZENTELLA, L. M. C.; SIERRA L. G. T. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v.19, 2016.

RUINEN, J. The grass sheet, a habitat for nitrogen fixing microorganisms. **Plant and Soil**, v.33, 1970.

RYDER, E. J.; WHITAKER, T. N. **Lettuce**. SIMMONDS, N. W. Evolution of crop plants. New York: Longman Group, 1976.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. A Evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, 2005.

SALAMA, A. S; EL-SAYED, O; EL-GAMMAL, O. H. Effect of Effective Microorganisms (EM) and Potassium Sulphate on Productivity and Fruit Quality of "Hayany" Date Palm Grown Under Salinity Stress. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v.7, n.6, 2014.

SANTANA, C. V. S.; ALMEIDA, A. C.; FRANÇA, F. S.; TURCO, S. H. N.; DANTAS, B. F.; ARAGÃO, C. A. Influência do sombreamento na produção de alface nas condições climáticas do semiárido nordestino. **Congresso Brasileiro de Olericultura**, Fortaleza: SOB, 2005.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. **Nature**, London, v.459, 2009.

SANTOS, L. F. DOS; LANA, R. P.; SILVA, M. C. S. DA; VELOSO, T. G. R.; KASUYA, M. C. M.; RIBEIRO, K. G. Effective microorganisms inoculant: Diversity and effect on the germination of palisade grass seeds. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.92, 2020.

SCHMIDT, D.; SANTOS, O.; BONNECARRÈRE, R.; MARIANI, O.; MANFRON, P. Desempenho de soluções nutritivas e cultivares de alface em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, 2001.

SHALABY, E. M. A. Prospects of effective microorganisms technology in wastes treatment in Egypt. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.1, n.3, 2011.

SHALABY, M.; EL NADY, M. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against Fusarium infection of sugar beet plants. **Acta Biologica Szegediensis**, v.52, n.2, 2008.

SHERIDAN, C.; DEPUYDT, P.; DE RO, M.; PETIT, C. Microbial Community Dynamics and Response to Plant Growth-Promoting Microorganisms in the Rhizosphere of Four Common Food Crops Cultivated in Hydroponics. **Microb Ecol**, v.16, n.1, 2016.

SILVA, F. C. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes**. EMBRAPA, 1999.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. E. A.; TANIWAKI, M.; GOMES, R.; OKAZAKI, M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água**. São Paulo: Varela, 2017.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. E. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, 2007.

SIMON, S.; PETRÁSEK, J. Why plants need more than one type of auxin. **Plant Science**, v.180, n.3, 2011.

SOLOMON, K. V.; HAITJEMA, C. H.; THOMPSON, D. A.; O'MALLEY, M. A. Extracting data from the muck: deriving biological insight from complex microbial communities and non-model organisms with next generation sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v.28, 2014.

SOUSA, C.; BONETTI, A. M.; FILHO, L. R.; MACHADO, J.; LONDE, L.; BAFFI, M.; RAMOS, R.; VIEIRA, C.; KERR, W. **Divergência genética entre genótipos de alface por meio de marcadores AFLP**. *Bragantia*, Campinas, v.66, n.1, 2007.

SU, C.; LEI, L.; DUAN, Y.; ZHANG, K. Q.; YANG, J. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.93, n.3, 2012.

SUBLETT, W. L.; BARICKMAN, T. C.; SAMS, C. E. The Effect of Environment and Nutrients on Hydroponic Lettuce Yield, Quality and Phytonutrients. **Horticulturae**, v.4, 2018.

SUTTON, J. C.; SOPHER, C. R.; OWEN-GOING, T. N.; LIU, W.; GRODZINSK, B.; HALL, J. C.; BENCHIMOL, R. L. Etiology and epidemiology of Pythium root rot in hydroponic crops: Current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v.32, n.4, 2006.

SPRICIGO, P. C.; BERTINI, V. A.; FERREIRA M. D.; CALBO, A. G.; TAVARES, M. Avaliação da pós-colheita de alface hidropônica, em função da quantidade de raízes, utilizando o equipamento Wiltmeter®. **Horticultura Brasileira**, v.27, 2009.

STAGE, D; EICKBUSH, T. Sequence variation within the rRNA gene loci of 12 *Drosophila* species. **Genome Research**, v.17, 2007.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, 2005.

SZYMANSKI, N.; PATTERSON, R. A. Effective Microorganisms (EM) and Wastewater Systems. Future Directions for On-site Systems: Best Management Practice. **Proceedings of On-site '03 Conference by Patterson**. University of New England, 2003.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre : Artmed, 2004.

TALAAT, N. B. Effective microorganisms modify protein and polyamine pools in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, v.190, 2015.

TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; ARF, O.; ALVAREZ, R. C. F.; MAEDA, A.S.; DE SÁ, M. E. Response of wheat cultivars to nitrogen with and without fungal treatment.

Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife, v.7, n.4, 2012.

TELMOUDI, A.; HAMDUCHE, Y.; HASSOUNA, M. Isolation, Characterization and Identification of Lactic acid Bacteria from Lettuce and their Efficacy against Pathogenic Bacteria. **Society for Plants Research**, v.28, n.3, 2015.

TORTORA, G; FUNKE, B; CASE, C. **Microbiologia**. 12^a edição. Editora: Artmed, 2016.

TURAZI, C; JUNQUEIRA, A. M; OLIVEIRA, S; BORGIO, L. Acúmulo de nitrato em alface em função da adubação, horário de colheita e tempo de armazenamento. **Horticultura Brasileira**, v.24, 2006.

TÜRK, B.; ASÇIOGUL, T.; GÜLES, A.; OKSAR, R. Effects of Plant Growth Promoting Microorganisms on Yield and Quality Parameters of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Applied Biological Sciences**, v.11, n.3, 2017.

UTKHEDE, R. S.; LÉVESQUE, C. A.; DINH, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Can. J. Plant Pathol**, v.22, 2000.

VICENTINI-POLETTE, C, M.; SALA, F, C.; SPOTO, M. H. F.; FERREIRA, M. D.; BORBA, K. R.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Avaliação das características físico-químicas e aceitação da alface crocanta produzida em sistema hidropônico na cidade de Araras, São Paulo. **Demetra**, v.13, n.3, 2018.

VIEIRA, G. **Gap dynamics in managed Amazonian forest**: Structural and ecophysiological aspects. 1996. 162f. Tese (Doutorado em Ecologia Tropical) - University of Oxford, Grã-Bretanha, 1996.

VITTI, M. C.; KLUGE, R.A.; GALLO, C.R.; SCHIAVINATO, M.A.; MORETTI, C.L.; JACOMINO, A.P. Aspectos fisiológicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, 2004.

VON ELBE, J. H. Colorantes. FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, 2000.

WANG, Z.; LI, S. Effects of Nitrogen and Phosphorus Fertilization on Plant Growth and Nitrate Accumulation in Vegetables. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, n.3, 2014.

WONG, W. T.; TSENG, C.; HSU, S-H.; LUR, H.; MO, C.; HUANG, C.; HSU, S-C.; LEE, K.; LIU, C-T. Promoting Effects of a Single *Rhodopseudomonas palustris* Inoculant on Plant Growth by *Brassica rapa chinensis* under Low Fertilizer Input. **Microbes Environ**, v.0, n.0, 2014.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, London, v.95, 2005.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v.15, n.7, 2006.

XU, H. L.; WANG, R.; MRIDHA, A. Effects of Organic Fertilizers and a Microbial Inoculant

on Leaf Photosynthesis and Fruit Yield and Quality of Tomato Plants. **Journal of Crop Production**, v.3, n.1, 2015.

YAN, Q.; DUAN, Z.; MAO, J.; LI, X.; DONG, F. Effects of root-zone temperature and N, P, and K supplies on nutrient uptake of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings in hydroponics. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.58, 2012.

YURI, J. E.; MOTA, J. H.; RESENDE, G. M. de; SOUZA, R. S. de. Nutrição e adubação da cultura da alface. **Nutrição e adubação de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/CNPQ, 2016.

ZAKARIA, Z.; GAIROLA, S.; SHARIFF, N M. Effective Microorganisms (EM) Technology for Water Quality Restoration and Potential for Sustainable Water Resources and Management. **International Congress on Environmental Modelling and Software Modelling for Environment's Sake**, 5, 2010

ZEN, H. D.; BRANDAO, J. B.; ARBAGE, A. P. Análise da produção e comercialização de hortaliças hidropônicas na região central do rio grande do sul. 6º Fórum Internacional Ecoinovar, 2017, Santa Maria. **6º FÓRUM INTERNACIONAL ECOINOVAR - ANAIS DO EVENTO**, 2017.

ZHAO, L.; DENG, Z.; YANG, W.; CAO, Y.; WANG, E.; WEI, G. Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.33, 2010.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C.; HARRIS, H.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIZ, G.; GÄNZLE, M.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.70, 2020.

ANEXOS

**ANEXO A – COMPOSIÇÃO DOS MICRONUTRIENTES DA SOLUÇÃO
NUTRITIVA (HOAGLAND e ARNON, 1950)**

1. Preparo de Micronutrientes (500 mL, 1M, 100% pureza)

Nutrientes	Volume (g)
Ácido Bórico (H_3BO_3)	1,43
Cloreto de Manganês ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,905
Cloreto de Zinco ($ZnCl_2$)	0,050
Sulfato de Cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0,038
Molibdato de Sódio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,013

2. Preparo do Ferro – EDTA (500 mL)

Nutrientes	Volume (g)
Cloreto de Ferro ($FeCl_3$)	3,244
EDTA (100% pureza)	7,445

Adicionar 200 mL água destilada para cada componente separadamente. A solução com o EDTA deve ser mantida em agitador magnético e adicionar NaOH 1M até completa dissolução. Em seguida, misturar ambas as soluções para obter a solução final e completar com água para 500 mL.

ANEXO B – RELATÓRIO DO SEQUENCIAMENTO FORNECIDO PELA EMPRESA NGS SOLUÇÕES GENÔMICAS

1. Preparo de Biblioteca e Sequenciamento

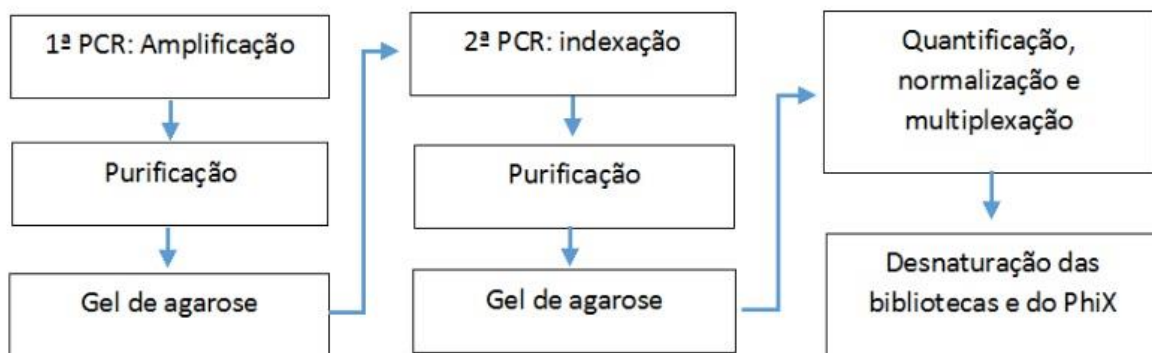
O preparo das bibliotecas foi realizado seguindo as recomendações Illumina (Figura 1). Os primers utilizados para amplificação locus-específica de eucariotos ou bactérias flanqueiam regiões específicas do 16S rRNA ou 18S rRNA. A sequência overhang de adaptadores está incluída nos primers locus-específicos. As sequências de adaptadores Illumina, que foram hibridizadas com as sequências imobilizadas na lâmina de sequenciamento são:

Forward overhang: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[sequência locus-específica]

Reverse overhang: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[sequência locus-específica]

O sequenciamento foi realizado no sistema Illumina MiSeq, conforme descrito na Figura 1, e as leituras pareadas produzidas foram de 260 bases (2x260bp).

Figura 1



A primeira PCR foi realizada para amplificação locus-específica. Em seguida, AMPure XP beads foram utilizadas para purificação da reação de PCR, e o tamanho dos fragmentos gerados na reação de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose. A segunda PCR foi realizada para ligar os barcodes do kit Nextera XT, e novas etapas de purificação da PCR e validação das bibliotecas foram realizadas. Posteriormente, as bibliotecas foram quantificadas,

para que todas as amostras/bibliotecas fossem unidas de maneira equimolar em um único pool.

Para introduzir complexidade ao sequenciamento, um controle heterogêneo, o fago phi-X, foi combinado com o pool de amplicons. Por fim, foi feita a desnaturação das bibliotecas e do phi-X, para permitir o sequenciamento.

2. Análise de dados

Os dados foram analisados conforme previamente publicado [1], usando um conjunto de pacotes implementados na linguagem R [2] e disponíveis através do projeto BioConductor [3][4]: Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses

O pacote DADA2 [5], um pacote de código aberto do R/BioConductor, implementa um pipeline completo para transformar os arquivos fastq do sequenciador em sequências de amostras inferidas, desmembradas, e sem quimeras. DADA2 não agrupa sequências em operational taxonomic units (OTUs), ao invés disso, implementa o conceito de amplicon sequence variants (ASVs) [6]. Estudos mostram que em várias comunidades simuladas, DADA2 identificou mais variantes reais e produziu menos sequências espúrias que outros métodos [5].

Primeiro, o programa `bcl2fastq` (Illumina, https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/bcl2fastqconversion-software.html) atribuiu as leituras multiplexadas para suas respectivas amostras biológicas, de acordo com o barcode de cada amostra. Em seguida, DADA2 [5] foi utilizado para remoção de primers, filtragem de qualidade, modelagem e correção de erros nos amplicons. A filtragem de arquivos fastq foi realizada para cortar as sequências dos primers de PCR e filtrar as extremidades 3' das leituras devido ao decaimento da qualidade ($Q < 30$), mas mantendo a sobreposição para posterior junção das leituras e remontagem do fragmento da região amplificada.

O algoritmo DADA2 faz uso de um modelo de erro paramétrico e cada conjunto de dados de amplicon tem um conjunto diferente de taxas de erro. O método `learnErrors` aprende esse modelo de erros a partir dos dados, alternando a estimativa das taxas de erro e a inferência da composição da amostra até que eles convirjam para uma solução consistente. Como em muitos problemas de aprendizado de máquina, o algoritmo deve começar com um palpite inicial, para o qual são usadas as taxas de erro máximas possíveis nesses dados (as taxas de erro se apenas a sequência mais abundante estiver correta e todo o restante for erros). Depois, a etapa

de remoção de erros (denoising) é realizada para se obter uma lista detalhada de sequências únicas e suas abundâncias, e produzir pontuação de qualidade de posição do consenso para cada sequência única, tomando a média das qualidades posicionais das leituras componentes. Diferentemente de outros pipelines, DADA2 realiza a fusão de paired-end reads após a etapa denoising. Isso ocorre porque o algoritmo de denoising usa a relação empírica entre o índice de qualidade e as taxas de erro, atingindo maior precisão através do desmembramento antes da fusão, embora com alto custo computacional. Como a fusão ocorre após a etapa de denoising, é necessária sobreposição exata, sem mismatches, uma vez que se espera que quase todos os erros de substituição já tenham sido removidos. Em seguida, sequências quiméricas são removidas.

Após o processamento inicial dos dados de sequenciamento pelo DADA2, as taxonomias foram atribuídas a cada ASV utilizando uma implementação do programa DADA2 do método de classificador bayesiano ingênuo para essa finalidade [7]. A função `assignTaxonomy` toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de sequências de referência com taxonomia conhecida, e atribui taxonomias com base neste banco. O banco de dados SILVA foi utilizado como referência [8].

As classificações taxonômicas geradas pelo DADA2, e suas quantificações, foram importadas para o programa `phyloseq` [9], também implementado no R. O pacote `phyloseq` é uma ferramenta para importar, armazenar, analisar e exibir graficamente dados complexos de sequenciamento filogenético que já foram agrupados em ASVs. Este pacote aproveita muitas das ferramentas disponíveis em R para ecologia e análise filogenética - como `VEGAN` [10], `ade4` [11], `ape` [12], `Picante` [13], enquanto também usa sistemas gráficos avançados e flexíveis do `ggplot2` [14] para produzir facilmente gráficos de alta qualidade.

3. Resultados de Abundância Relativa: Taxonomias identificadas em ASVs pelo Banco de Dados SILVA

A classificação das espécies foi realizada utilizando o banco de dados SILVA [8]. A sequência de bases do SSU rRNA nem sempre contém informação suficiente para a classificação em nível de espécie, uma limitação da técnica de sequenciamento de rRNA. Portanto, as ASVs (Variantes de Sequenciamento de Amplicon) foram classificados a nível de gênero.

Referências:

1. Callahan BJ, Sankaran K, Fukuyama JA, McMurdie PJ, Holmes SP. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000Research*. 2016;5:1492.
2. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2019. <https://www.R-project.org/>.
3. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology*. 2004;5:R80.
4. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with bioconductor. *Nature methods*. 2015;12:115–21.
5. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nature methods*. 2016;13:581–3.
6. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*. 2017;11:2639–43.
7. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73:5261.
8. Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, et al. 25 years of serving the community with ribosomal rna gene reference databases and tools. *Journal of biotechnology*. 2017;261:169–76.
9. McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An r package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*. 2013;8:e61217.
10. Dixon P. VEGAN, a package of r functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*. 2003;14:927–30.
11. Dray S, Dufour A-B, others. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software*. 2007;22:1–20.
12. Paradis E, Schliep K. Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in r. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2019;35:526–8.
13. Kembel SW, Cowan PD, Helmus MR, Cornwell WK, Morlon H, Ackerly DD, et al. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics*. 2010;26:1463–4.
14. Wickham H. Ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag New York; 2016. doi:10.1007/978-0-387-98141-3.

Região V3V4 do gene 16S rRNA

	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Em1.v3v4	T01P11.v3v4
ASV1	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0	0,00029247
ASV5	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	0,99520609	0
ASV22	Bacteria	Verrucomicrobiota	Chlamydiae	Chlamydiales	Parachlamydiaceae	Candidatus_Protochlamydi	0	0,00016713
ASV29	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Taibaiella	0	0,00016713
ASV30	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	0	0,00087741
ASV31	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	0	0,00367678
ASV34	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Amnibacterium	0	0,00071029
ASV35	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Leifsonia	0	0,0031754
ASV36	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	0	0,0004596
ASV37	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae_(Sut	Edaphobacter	0	0,00137879
ASV38	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae_(Sut	Acidipila	0	0,00050138
ASV39	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Rubritaleaceae	Luteolibacter	0	0,00033425
ASV42	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Mitochondria	#N/D	0	0,07658561
ASV44	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	0	0,02937244
ASV45	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	0	0,00129523
ASV46	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	#N/D	0	0,00054316
ASV47	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Allorhizobium-Neorhizobiu	0	0,00125345
ASV49	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	#N/D	0	0,00660149
ASV52	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	#N/D	0	0,00497201
ASV53	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Rhodopseudomonas	0	0,00108632
ASV54	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Afipia	0	0,0020473
ASV56	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	0	0,00050138
ASV57	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Labraceae	Labrys	0	0,00020891
ASV58	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	0	0,00442885
ASV59	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Rickettsiaceae	#N/D	0	8,3563E-05
ASV60	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Holosporales	Holosporaceae	Candidatus_Bealeia	0	0,00012534
ASV61	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Acetobacter	0,00479391	0
ASV65	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	#N/D	0	0,01057074
ASV66	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Acidisoma	0	0,00781315
ASV67	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwinjiaceae	Pantoea	0	0,0011281
ASV68	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	#N/D	0	0,00083563
ASV69	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	Cellvibrio	0	0,00033425

ASV70	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0	0,00012534
ASV71	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	0	0,00100276
ASV72	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Thermomonas	0	0,00083563
ASV75	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Luteibacter	0	0,00041782
ASV76	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	#N/D	0	0,2010529
ASV80	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Rhodanobacter	0	0,16737695
ASV83	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Methylophilaceae	Methylophilus	0	0,00263224
ASV89	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Pandoraea	0	0,00480488
ASV95	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	#N/D	0	0,02494359
ASV98	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Castellaniella	0	0,00376034
ASV99	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	#N/D	0	0,00029247
ASV103	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Bordetella	0	0,17736275
ASV105	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Thiomonas	0	0,00288293
ASV106	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pseudorhodoferrax	0	0,00054316
ASV114	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia-Caballeronia-	0	0,25043871

Região ITS do gene 18S do rRNA

	Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Em1.18S	T01P11.18S
ASV21	Eukaryota	Nematoda	Chromadorea	Rhabditida	#N/D	Rhabditida	0	4,84279E-05
ASV22	Eukaryota	Discosea	Longamoebia	Centramoebida	Centramoebida_undef	Acanthamoeba	0	0,002736177
ASV24	Eukaryota	Gracilipodida	Gracilipodida_undef	Gracilipodida_undef	Gracilipodida_undef	Filamoeba_nolandi	0	4,84279E-05
ASV29	Eukaryota	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Vorticella	0	0,01037568
ASV30	Eukaryota	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Pseudoplatyophrya	0	0,000181605
ASV31	Eukaryota	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpoda	0	0,000423744
ASV32	Eukaryota	Phragmoplastophyta	Embryophyta	#N/D	#N/D	Magnoliophyta	0	0,001864474
ASV33	Eukaryota	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Stylonychia	0	0,000338995
ASV34	Eukaryota	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	#N/D	0	0,000774847
ASV35	Eukaryota	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Gonostomum	0	7,26419E-05
ASV36	Eukaryota	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Oxytricha	0	0,000702205
ASV38	Eukaryota	Phragmoplastophyta	Embryophyta	Asterales	#N/D	#N/D	0	0,954744119
ASV48	Eukaryota	Peronosporomycetes	Peronosporomycetes_1	Peronosporomycetes_1	Peronosporomycetes	#N/D	0	0,00027846
ASV50	Eukaryota	Schizoplasmodiida	Tubulinea	Echinamoebida	Phryganellina	Ptolemeba_bulliensi	0	0,000217926
ASV53	Eukaryota	Heterolobosea	Tetramitia	Tetramitia_undef	Tetramitia_undef	Naegleria	0	0,000169498
ASV55	Eukaryota	Dictyostelia	Discosea	Vannellida	#N/D	uncultured	0	0,001610228
ASV57	Eukaryota	Arthropoda	Insecta	Diptera	#N/D	Diptera	0	0,009249731
ASV60	Eukaryota	Rotifera	Monogononta	Ploimida	#N/D	Ploimida	0	0,007385256
ASV61	Eukaryota	Rotifera	Bdelloidea	Adinetida	#N/D	Adinetida	0	0,003837912
ASV64	Eukaryota	Basidiomycota	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae	Rhodotorula	0	0,00012107
ASV65	Eukaryota	Cryptomycota	#N/D	#N/D	#N/D	LKM11	0	8,47488E-05
ASV69	Eukaryota	Basidiomycota	Tremellomycetes	Trichosporonales	Trichosporonaceae	Apiotrichum	0	0,000290567
ASV70	Eukaryota	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	0	0,000133177
ASV72	Eukaryota	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Pichiaceae	Brettanomyces	0,00366	0
ASV74	Eukaryota	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Saccharomyces	0,99634	0,001234912
ASV79	Eukaryota	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Debaryomycetaceae	Spathospora	0	8,47488E-05
ASV82	Eukaryota	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	0	0,001937116
ASV83	Eukaryota	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium	0	0,000883809
ASV84	Eukaryota	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Ceratocystidaceae	Ceratocystis	0	8,47488E-05
ASV85	Eukaryota	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Trichomonascaceae	Sugiyamaella	0	8,47488E-05

ANEXO C - PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM NÍVEL DE ESPÉCIE POR MEIO DA PLATAFORMA BLAST

1) No site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, clicar em “Nucleotide BLAST”.

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide ▶ nucleotide

blastx
translated nucleotide ▶ protein

tblastn
protein ▶ translated nucleotide

Protein BLAST
protein ▶ protein

BLAST Genomes

Enter organism common name, scientific name, or tax id **Search**

Human Mouse Rat Microbes

2) Colar a sequência desejada no quadro “Enter Query Sequence: Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)”.

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information

BLAST » blastn suite

Standard Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCCGGAGAAGGGCATCGGAAACCCGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAG
TGGAAC
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCCGCTGTCTGTTCTGTAAC
T
GACGCTG
AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAAC

Clear Query subrange

From

To

Or, upload file **Escolher arquivo** Nenhum arquivo selecionado

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

- 3) Na opção “Program Selection”, selecionar “Optimize for Somewhat similar sequences (blastn)”

Limit to
Optional
Entrez Query
Optional

Sequences from type material

[YouTube](#) [Create custom database](#)

Enter an Entrez query to limit search [?](#)

Program Selection

Optimize for

Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm [?](#)

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)

Show results in a new window

[+ Algorithm parameters](#)

- 4) Marcar a opção “Show results in a new window” e clicar em “Blast”.

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)

Show results in a new window

[+ Algorithm parameters](#)

- 5) Uma nova página será aberta com o resultado.
- 6) Na aba “Descriptions”, avaliar os resultados quanto:
- Max e Total Score: avaliar valores mais altos;
 - E value: deve ser próximo à zero;
 - Percentual de Identidade: mostra o nível de similaridade.
 - Accession: número de acesso que identifica a espécie selecionada.

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

New Select columns

Show

100

?

select all 1 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain 2197 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	1444	MT604695.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain RKG 1-400 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	775	MT045881.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain 1502 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	1427	MN784681.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain OCLP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	1486	MK605951.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured Lactobacillus sp. clone 16S_19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Lactobacillus sp.	767	767	100%	0.0	100.00%	949	MK256701.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain CQ117-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	1443	MG646896.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain CQ82-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	1429	MG646832.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain CQ80-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	1435	MG646828.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain CQ73-1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	1439	MG646812.1
<input type="checkbox"/>	Lactobacillus parafarraginis strain CQ71-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus parafarraginis	767	767	100%	0.0	100.00%	1443	MG646809.1

7) Na aba “Taxonomy”, é possível verificar as informações taxonômicas da sequência selecionada.

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) **[Taxonomy](#)**

Reports [Lineage](#) [Organism](#) **[Taxonomy](#)**

1 sequences selected

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
Lactobacillus parafarraginis	1	1	Lactobacillus parafarraginis hits

NCBI Taxonomy Browser

Search for as complete name lock

Display levels using filter:

Lactobacillus parafarraginis

Taxonomy ID: 390842 (for references in articles please use NCBI:taxid390842)
 - current name
Lactobacillus parafarraginis Endo and Okada 2007
 type strain of *Lactobacillus parafarraginis*: [DSM:18390](#), [JCM:14109](#), [NRIC:0677](#)

NCBI BLAST name: **firmicutes**
 Rank: **species**
 Genetic code: [Translation table 11 \(Bacterial, Archaeal and Plant Plastid\)](#)

Lineage (full)
 cellular organisms; Bacteria; Terrabacteria group; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactilactobacillus

Entrez records			
Database name	Subtree links	Direct links	Links from type
Nucleotide	2,204	676	989
Protein	14,458	8,323	-
Genome	1	1	-
Popset	12	12	-
PubMed Central	23	23	-
SRA Experiments	2	-	-
Protein Clusters	1,577	1,577	-
Identical Protein Groups	8,122	5,799	-
Bio Project	4	2	-
Bio Sample	6	2	2
Assembly	5	2	2
Taxonomy	3	1	-

Comments and References:

[Endo A & Okada S \(2007\)](#)
 Endo, A., and Okada, S. "Lactobacillus farraginis sp. nov. and Lactobacillus parafarraginis sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2007) 57:708-712.