



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

António Manuel Vieira Mendes

Utilização de microrganismos eficientes (EM) em horticultura biológica

Mestrado em Agricultura Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professora Doutora Isabel de Maria Cardoso Gonsalves Mourão
Professora Doutora Maria Luísa Roldão Marques Moura

Novembro 2023

Índice

Índice	i
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Quadros	xi
1. Introdução	1
1.1. A importância da agricultura biológica na atualidade	1
1.2. Microrganismos Eficientes (EM)	3
1.3. Cultura da alface	8
1.4. Objetivos do trabalho	9
2. Material e métodos	10
2.1. Localização e época do ano em que decorreram os ensaios	10
2.2. Caracterização das cultivares, do solo e dos fertilizantes orgânicos	10
2.3. Desenho experimental e caracterização dos EM e doses de aplicação	11
2.4. Monitorização da temperatura do ar	13
2.5. Avaliação da doença causada pelo nemátode-das-galhas-radiculares	14
2.6. Métodos analíticos	15
2.7. Análise molecular do microbioma do solo e do EM 1	16
2.8. Análise estatística	17
3. Resultados	18
3.1. Primeiro ensaio - final do inverno	18
3.2. Segundo ensaio - primavera	20
3.2.1. Crescimento das plantas	20
3.2.2. Teor de nutrientes das plantas	20
3.3. Características químicas do solo inicial e final do segundo ensaio de vasos	21
3.4. Microbioma do solo e do EM 1	24
3.4.1. Distribuição do número de sequências obtidas por amostra	24
3.4.2. Composição taxonómica das comunidades do solo e de EM1	25
3.4.3. Diversidade e estrutura do microbioma do solo e do EM1	34
4. Discussão	37
4.1. Crescimento da alface com e sem aplicação de EM	37

4.2. Influência dos EM no microbioma do solo	38
5. Conclusões	40
Referências bibliográficas	42

Agradecimentos

Agradeço às Professoras Isabel Mourão e Luisa Moura, orientadoras da minha dissertação, todo o apoio, incentivo, disponibilidade e amizade.

Ao Rui Pinto e Cláudia Correia, bolsheiros de investigação, e ao José Durão e Virgílio Peixoto, toda a colaboração e dedicação nos trabalhos de campo e de laboratório.

À Prof. Isabel Henriques, da Universidade de Coimbra, pelo seu cuidado nas análises microbiológicas e ensinamentos transmitidos.

A todos os Professores e colaboradores da Escola Superior Agrária/IPVC, que contribuíram para o meu percurso durante o mestrado em Agricultura Biológica, em particular aos professores Raul Rodrigues e Miguel Brito.

Aos meus colegas de turma do MAB13, a atenção e companheirismo que perdura.

À minha Família, a quem devo tudo.

Resumo

No âmbito dos processos e fatores de produção em agricultura biológica, os microrganismos do solo assumem um papel fundamental, e incluem a utilização de ‘microrganismos eficientes’ (EM). Os EM são culturas mistas de microrganismos de ocorrência natural, como bactérias fotossintéticas, lactobacilos, leveduras, actinomicetos e fungos filamentosos, que apresentam diversos benefícios para o solo e para as plantas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar no crescimento da alface, o efeito da aplicação de EM em conjunto com fertilizantes orgânicos (F) (Monterra no primeiro ensaio e compostado no segundo ensaio). Os ensaios realizados em vasos, decorreram no final do inverno e na primavera, com quatro blocos casualizados e cinco tratamentos. Três tratamentos com F e com EM: (i) certificado EMRO/Japão (EM1), (ii) Herdade Freixo do Meio (não comercial) (EM2) e (iii) Bioprana/Pontevedra/Espanha (EM3), e dois tratamentos sem EM: (iv) com F (EM0) e (v) sem F (EM0sF).

Os EM foram aplicados uma vez por semana na água de rega ($0,5 \cdot L \text{ vaso}^{-1}$) e as doses de aplicação seguiram as recomendações dos fabricantes: 150, 50 e 30 mL $5 \cdot L^{-1}$ água, respetivamente para EM1, EM2 e EM3, com exceção do EM2 com 100 mL $5 \cdot L^{-1}$ água no 2º ensaio. O 1º ensaio no final do inverno, decorreu com $15,5^\circ\text{C}$ de temperatura média do ar, as alfaces (cv. Folha-de-carvalho) foram plantadas no dia 11/3/2022 em vasos com 8 kg de solo com pH de 5,5 e 1,7% de matéria orgânica (MO), com aplicação de Monterra ($3 \cdot t \cdot ha^{-1}$), calcário (Physiolith, $2 \cdot t \cdot ha^{-1}$) e rega semanal, tendo as plantas apresentado sintomas de *Meloidogyne* spp. à colheita, 53 dias após plantação (DAP). No 2º ensaio, na Primavera, com temperatura média de $20,2^\circ\text{C}$, as alfaces (cv. Clerac) foram plantadas no dia 28/4/22, num solo com pH 6,0 e MO 3,6%, com aplicação de um compostado de bagaço e engaço de uva ($20 \cdot t \cdot ha^{-1}$), com duas regas semanais e colheita 32 DAP. A análise das comunidades microbianas dos solos do 2º ensaio e do EM1, foram realizadas utilizando a técnica de sequenciação de nova geração (NGS). A região do 16S rDNA amplificada foi a região V3-V4 e a sua sequenciação foi realizada com o sequenciador Illumina MiSeq®.

No 1º ensaio, apesar dos tratamentos com e sem EM e com Monterra apresentarem valores de número de galhas e massas de ovos planta⁻¹ semelhantes e inferiores em comparação com EM0sF, o peso seco da alface foi superior em EM3 em comparação com EM2, e sem diferenças significativas em comparação com os restantes tratamentos. No 2º ensaio, o peso seco das alfaces foi superior e semelhante para todos os tratamentos com e sem EM e com compostado, em comparação com EM0sF.

A análise taxonómica do microbioma dos solos mostrou que os quatro Filos mais abundantes são Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria e Chloroflexi. A aplicação de EM1 não alterou significativamente a abundância relativa dos Filos. As Famílias mais representativas em todas as amostras de solo com e sem EM1 são Nitrosomonadaceae, Gemmatimonadaceae, Chthoniobacteraceae e Xanthobacteraceae, enquanto no EM1 predominava a família Lactobacillaceae. Apesar do Género *Lactobacillus* ser dominante na composição de EM1, e estar

ausente no solo inicial, a sua adição ao solo não aumentou significativamente a abundância relativa nos solos tratados, não tendo tido assim o efeito esperado. O microbioma do EM1 é distinto do microbioma dos solos, predominando o Filo Firmicutes (83,58%) seguido de Proteobacteria (8,45%).

A aplicação de EM1 não alterou a diversidade e riqueza das comunidades, que se mantiveram elevadas até ao final do ensaio. A diversidade β avaliada através da análise de *clusters*, mostrou que a aplicação de EM1 ou do fertilizante orgânico, mantém a estrutura das comunidades a níveis muito próximos da dos solos sem EM1 e sem fertilizante, ou mesmo do das amostras sem planta, sendo todos distintos da estrutura da comunidade do solo inicial.

Conclui-se que a aplicação de EM1, para além de não ter influenciado o crescimento das plantas, não influenciou significativamente a composição global das comunidades microbianas, nomeadamente, na diversidade e riqueza das comunidades do solo, sendo importante a continuidade da investigação.

Palavras-chave: alface, aplicação EM na rega, fertilizantes orgânicos, *Meloidogyne* spp., microbioma do solo.

Abstract

Use of efficient microorganisms (EM) in organic horticulture

Among the processes and production factors used in organic agriculture, soil microorganisms play a key role, and include the use of 'efficient microorganisms' (EM). EM are mixed cultures of naturally occurring microorganisms, such as photosynthetic bacteria, lactobacilli, yeasts, actinomycetes and filamentous fungi, which have several benefits for soil and plants. This study aimed to evaluate on lettuce growth, the effect of EM application together with organic fertilizers (F) (Monterra in the 1st experiment and compost in the 2nd). The two experiments took place at the end of winter and spring and were carried out in pots, with four randomized blocks and five treatments. Three treatments with F and with EM: (i) EMRO/Japão certificate (EM1), (ii) Herdade Freixo do Meio (non-commercial) (EM2) and (iii) Bioprana/Pontevedra/Spain (EM3); and two without EM: (iv) with F (EM0) and (v) without F (EM0sF).

The EM were applied once a week through irrigation (0.5·L pot⁻¹) and the application doses followed the manufacturers' recommendations: 150, 50 and 30 mL 5·L⁻¹ water, respectively for EM1, EM2 and EM3, with the exception of EM2 with 100 mL 5·L⁻¹ water in the 2nd experiment. The 1st experiment at the end of winter, ran with an average temperature of 15.5°C, the lettuces (cv. Folha-de-carvalho) were planted on 3/11/2022 in pots with 8 kg of soil with a pH of 5.5 and 1, 7% organic matter (OM), with application of Monterra (3·t·ha⁻¹), limestone (Physiolith, 2·t·ha⁻¹) and weekly irrigation, with the plants showing symptoms of *Meloidogyne* spp. at harvest, 53 days after planting (DAP). In the 2nd experiment in spring, the mean air temperature was 20.2°C, the lettuces (cv. Clerac) were planted on 4/28/22, in a soil with pH 6.0 and MO 3.6%, with application of a composted grape pomace and stalks (20·t·ha⁻¹), twice weekly irrigated and harvested 32 DAP. The analysis of the microbial communities of the soils of the 2nd trial and EM1 was carried out using the next generation sequencing (NGS) technique. The region of 16S rDNA amplified was the V3-V4 region and its sequencing was carried out with the Illumina MiSeq® sequencer.

In the 1st experiment, despite the plant treatments with and without EM and with Monterra had ¹similar and lower number of galls and egg mass plant⁻¹, compared to EM0sF, the dry weight of lettuce was higher in EM3, compared to EM2, without significant differences compared to the other plant treatments. In the 2nd experiment, the dry weight of lettuces was similar for all plant treatments with and without EM and with compost, and the mean was higher compared to the lettuce dry weight of EM0sF.

Taxonomic analysis of the soil microbiome showed that the four most abundant Phylum were Proteobacteria Acidobacteria, Actinobacteria and Chloroflexi. The application of EM1 did not significantly change the relative abundance of Phylum. The most representative families in all soil samples with and without EM1 were Nitrosomonadaceae, Gemmatimonadaceae, Chthoniobacteraceae and Xanthobacteraceae, while in EM1 the Lactobacillaceae family predominated. Despite the Genus *Lactobacillus* being dominant in the composition of EM1, and

being absent in the initial soil, its addition to the soil did not significantly increase the relative abundance in the treated soils, thus not having the expected effect. The EM1 microbiome is distinct from the soil microbiome, with the Firmicutes phylum predominating (83.58%) followed by Proteobacteria (8.45%).

The application of EM1 did not change the diversity and richness of the communities, which remained high until the end of the trial. The β diversity assessed through cluster analysis, showed that the application of EM1 or organic fertilizer maintains the structure of the communities at levels very close to that of soils without EM1 and without fertilizer, or even that of samples without plants, all of which are clearly distinct from the initial soil community structure.

It is concluded that the application of EM1 did not significantly influence the global composition of microbial communities, and did not have a significant impact on the diversity and richness of soil communities, requiring continued investigation.

Keywords: EM irrigation application, lettuce, *Meloidogyne* spp. organic fertilizers, microbiomes.

Lista de Figuras

- Figura 2.1 - (a) Primeiro ensaio de vasos de alface após a plantação, que decorreu no dia 11/3/2022. (b) Termístor colocado a cerca de 50 cm acima da cultura e protegido por um escudo de radiação solar. 12
- Figura 2.2 - Segundo ensaio de vasos de alface (a) 15 dias após a plantação que decorreu no dia 28/4/22 e (b) no dia da colheita, 32 dias após a plantação. 13
- Figura 2.3 - Temperatura média diária do ar ($^{\circ}\text{C}$) da plantação à colheita de alface, durante (a) o primeiro ensaio de 11/3/2022 a 3/5/2022, com temperatura média de $15,2^{\circ}\text{C}$ e (b) o segundo ensaio de 28/4/22 a 30/5/2022, com temperatura média de $20,2^{\circ}\text{C}$. 14
- Figura 2.4 - (a) Sintoma da doença causada pelo nemátode-das-galhas-radiculares (NGR) (*Meloidogyne* spp.) nas raízes das alfaces; (b) Galhas e massas de ovos após lavagem, secagem e coloração das raízes com Floxina B. 14
- Figura 3.1 - (a) Peso seco da alface (g planta^{-1}) e percentagem de matéria seca (%), e (b) número de galhas e massas de ovos (planta^{-1}), para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra) e com: (EM1) certificado EMRO/Japão, (EM2) Herdade Freixo do Meio, (EM3) Bioprana/Pontevedra, (EM0) sem EM, e (EM0sF) sem EM e sem fertilização orgânica. Letras diferentes em cima das colunas dos gráficos (a) e (b), indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). 19
- Figura 3.2 - Raízes de alfaces com (a) menor e (b) maior número de galhas e massas de ovos (planta^{-1}), causadas pelo nemátode-das-galhas-radiculares (*Meloidogyne* spp.). 19
- Figura 3.3 - (a) Peso fresco da alface (g planta^{-1}) e (b) Peso seco da alface (g planta^{-1}) e percentagem de matéria seca (%), para os tratamentos com fertilização orgânica (compostado) e com: (EM1) certificado EMRO/Japão, (EM2) Herdade Freixo do Meio, (EM3) Bioprana/Pontevedra, (EM0) sem EM, e (EM0sF) sem EM e sem fertilização orgânica. Letras diferentes em cima das colunas dos gráficos (a) e (b), indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). 20
- Figura 3.4 - Acumulação de nutrientes na matéria seca da alface (g kg^{-1}), designadamente, (a) N, K e Ca e (b) P e Mg, para os tratamentos com fertilização orgânica (compostado) e com: (EM1) certificado EMRO/Japão, (EM2) Herdade Freixo do Meio, (EM3) Bioprana/Pontevedra, (EM0) sem EM, e (EM0sF) sem EM e sem fertilização orgânica. Letras diferentes por cima das colunas dos gráficos (a) e (b), indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). 21
- Quadro 3.1 - Características químicas do solo inicial e final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com: (EM1+F) EMRO/Japão, (EM2+F) Herdade Freixo do Meio, (EM3+F) Bioprana; sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta) (média \pm desvio padrão, $\bar{\sigma}$). Letras diferentes em cada linha, representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$). 22
- Figura 3.5 - Teores de MO (g kg^{-1}), P_2O_5 , Mg, K_2O e Ca (mg kg^{-1}), do solo inicial e final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com: (EM1+F) EMRO/Japão, (EM2+F) Herdade Freixo do Meio, (EM3+F) Bioprana; sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta) (média \pm desvio padrão, $\bar{\sigma}$). Letras diferentes em cada coluna, de cada nutriente, representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$). 23

Figura 3.6 - Distribuição do número de sequências obtidas nas amostras de solo inicial (S1, S2, S3) e de EM1 (S16, S17, S18), e para os tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica - S/EM+S/F (4, 5, 6); sem EM1 e com fertilização orgânica - S/EM+F (7, 8, 9); com EM1 e com fertilização orgânica - EM1+F (10,11,12), e com EM1 e sem planta -EM1 s/planta (13,14,15). A amostra de solo inicial foi colhida antes da plantação das alfaces (28/04/22) e as restantes no fim do ensaio (32 DAP). 24

Figura 3.7 - Curvas de rarefação das amostras de solo inicial e (S1, S2, S3) e de EM1 (S16, S17, S18), e para os tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica - S/EM+S/F (4, 5, 6); sem EM1 e com fertilização orgânica - S/EM+F (7, 8, 9); com EM1 e com fertilização orgânica - EM1+F (10,11,12), e com EM1 e sem planta -EM1 s/planta (13,14,15). A amostra de solo inicial foi colhida antes da plantação das alfaces (28/04/22) e as restantes no fim do ensaio (32 DAP). 25

Figura 3.8 - Abundância relativa a nível do Filo. Valor médio para cada tratamento: solo inicial, tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta). Dado que uma grande parte das leituras pertenciam a Filos não-dominantes, uma categoria designada *Others* foi incluída para maior clareza. 26

Figura 3.9 - Composição da comunidade do solo a nível taxonómico do filo (%), no início e no final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com o EM EMRO (EM1+F); sem EM (s/EM+F); sem EM e sem F (s/EM +s/F), e com EM1+F sem planta (EM1+F s/Planta). **(a)**: Efeito ao longo do tempo; **(b)**: Efeito da aplicação de EM1; **(c)**: Efeito da planta; **(d)**: Efeito da aplicação de Fertilizante. 28

Figura 3.10 - Abundância relativa a nível de Família. Valor médio nas amostras de solos (solo inicial, tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta). Dado que uma grande parte das leituras pertenciam a Famílias não-dominantes, uma categoria designada *Others* foi incluída para maior clareza. 30

Figura 3.11 - Abundância relativa a nível de Género. Valor médio nas amostras de solos (solo inicial, tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta). Dado que uma grande parte das leituras pertencentes a géneros não-dominantes, uma categoria designada *Others*. 32

Figura 3.12 - Boxplot de métricas de diversidade alfa: índice de Shannon e riqueza para o solo inicial e para os tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F), e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta). 34

Figura 3.13 - Análise de diversidade beta: alterações estruturais no microbioma do solo inicial, e para os tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta), representadas na análise de coordenadas principais (PCoA) mapeando cada amostra usando o índice Bray-Curtis. Resultados de três repetições (n = 3) são apresentados para o solo inicial e para o solo de cada tratamento. A amostra de solo inicial foi colhida antes da plantação das alfaces (28/04/22) e as restantes no fim do ensaio (32 DAP). 35

Figura 3.14 - 8. Análise de diversidade beta: Alterações estruturais no microbioma do solo inicial e nos tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta), representadas na análise de agrupamento (Cluster) para cada amostra usando o índice de Bray-Curtis para cálculo de dissimilaridade e o método de Ward para construção do dendrograma. Resultados de três repetições (n = 3) são apresentados para o solo inicial e para as amostras de solo de cada tratamento. A amostra de solo inicial foi colhida antes da plantação das alfaces (28/04/22) e as restantes no fim do ensaio (32 DAP). 36

Lista de Quadros

Quadro 2.1 - Características químicas do solo do primeiro e do segundo ensaios de vasos, e do compostado sem revolvimento após 260 dias de compostagem, do segundo ensaio (média \pm desvio padrão). 11

Quadro 2.2 - Designação dos tratamentos dos ensaios de vasos de alface, com aplicação de fertilizante orgânico (F) e com três EM: certificado EMRO/Japão (EM1), Herdade Freixo do Meio (EM2) e Bioprana (EM3), e dois tratamentos sem EM: um com F (EM0) e outro sem F (EM0sF). 11

Quadro 3.1 - Características químicas do solo inicial e final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com: (EM1+F) EMRO/Japão, (EM2+F) Herdade Freixo do Meio, (EM3+F) Bioprana; sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta) (média \pm desvio padrão, $\bar{\sigma}$). Letras diferentes em cada linha, representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$). 22

Quadro 3.2 - Composição da comunidade do EM1 e do solo a nível taxonómico do Filo (%), no início e no final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com o EM EMRO (EM1+F); sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta). Letras diferentes em cada linha (excluindo a primeira coluna EM), representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$). 27

Quadro 3.3 - Composição da comunidade do solo a nível taxonómico da Família (%), no início e no final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com o EM EMRO (EM1+F); sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta). Letras diferentes em cada linha (excluindo a primeira coluna EM), representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$). 31

Quadro 3.4 - Composição da comunidade do solo a nível taxonómico do Género (%), no início e no final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com o EM EMRO (EM1+F); sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta). Letras diferentes em cada linha (excluindo a primeira coluna EM), representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$). 33

1. Introdução

1.1. A importância da agricultura biológica na atualidade

Atualmente assistimos a uma profunda transformação mundial, com um aumento da população principalmente em meio urbano e com alterações significativas a nível climático e energético, o que tem aumentado a atenção das principais entidades mundiais com responsabilidade nestes setores, que têm elaborado programas específicos para minimizar os respetivos riscos (ONU, 2023).

Em Portugal, tal como na Europa, preconiza-se a agricultura biológica como um sistema de gestão sustentável do solo e das culturas agrícolas, e como uma forma de adaptar a agricultura ao aumento da temperatura e à diminuição da precipitação, em consequência das alterações climáticas (ENAB, 2017; LIFE, 2019; EEA, 2019; Ripple et al., 2020). Outras medidas a nível da exploração agrícola, recomendadas para a adaptação às alterações climáticas (LIFE, 2019; EEA, 2019) são, na sua essência, estratégias desde sempre adotadas pela agricultura biológica. Também a estratégia ‘Do prado ao prato – Para um sistema alimentar justo, saudável e ambientalmente amigável’ (*From farm to fork*), é uma componente essencial do Pacto Ecológico Europeu para 2021-2027 e pretende expandir a agricultura biológica, a par das ações de mitigação das alterações climáticas (UE, 2019, 2020).

A área total cultivada com agricultura biológica na UE continua a aumentar e, em 2021, cobria 15,9 milhões de ha de terras agrícolas, representando 9,9% da superfície agrícola utilizada total (SAU), valor consideravelmente superior aos 9,5 milhões de ha em 2012 (Eurostat, 2023). Em 2021, a área de culturas arvenses biológicas representou mais de metade da área agrícola biológica total em 14 países da UE e o efetivo pecuário era de 5 milhões de bovinos, cerca de 6,6% do total de bovinos (Eurostat, 2023).

Considerando o contributo da atividade agrícola para as emissões antropogénicas de gases com efeito de estufa (GEE), a escolha do sistema e das práticas de produção dos alimentos, nomeadamente de produtos hortícolas, pode ser um problema ou uma solução no combate às alterações climáticas. Neste sentido, a agricultura biológica (AB), em comparação com a agricultura convencional, tem um menor impacto nas alterações climáticas, em consequência do baixo consumo de energia (em grande parte devido à não utilização de adubos de síntese) e das práticas de gestão do solo, que ajudam a reduzir as emissões de

GEE e sequestram carbono no solo, designadamente através da incorporação de matéria orgânica (MO) no solo, da integração de plantas Fabáceas na rotação das culturas e em culturas de cobertura e do uso de sistemas agrícolas mistos de produção animal e vegetal (Mourão, 2020). A conversão para a AB representa, no entanto, uma parte da solução, sendo essencial uma mudança mais geral do desenvolvimento económico e social, nomeadamente no que respeita ao consumo de energia e de recursos naturais em geral, incluindo uma mudança de comportamento e alterações estruturais nos sistemas alimentares, nas cadeias de abastecimento e no consumo de alimentos.

Em acréscimo à mitigação das alterações climáticas, os sistemas de AB proporcionam outros serviços de ecossistema, benefícios socioeconómicos e de sustentabilidade, que lhe são inerentes e que têm de ser devidamente valorizados. A AB fornece serviços para o ambiente (redução de utilização de combustíveis fósseis, conservação da fertilidade do solo e da qualidade da água, diminuição da poluição e preservação da biodiversidade); para a saúde humana (limitando a exposição a substâncias químicas nocivas); e para a preservação da biodiversidade e da paisagem (pela eliminação de agroquímicos sintéticos).

A produtividade das culturas biológicas é cerca de 17-30% inferior em comparação com a produtividade das culturas convencionais, embora esta diferença diminua quando se estabelecem limites ecológicos sustentáveis, como por exemplo, quando se aplica uma quantidade equivalente de azoto, em que essa diferença é de apenas cerca de 9% (Ponisio et al., 2015). Os preços dos produtos hortícolas biológicos no mercado poderão ser 5 a 20% mais elevados, refletindo a menor produtividade das culturas e, ainda, a maior utilização de mão-de-obra e o custo do sistema de certificação, mas em contrapartida, poderão contribuir para diminuir as despesas de saúde das famílias e da descontaminação ambiental. Os preços mais baixos dos produtos hortícolas convencionais são compensados por produtividades normalmente mais elevadas, mas não pagam os prejuízos que potencialmente podem causar na saúde e na da qualidade dos recursos naturais (poluição do ar, do solo e da água e perda de biodiversidade). Se assim fosse, estes produtos seriam mais caros do que os produtos biológicos, que têm um menor impacto ambiental. De facto, não se contabiliza a ecoeficiência da produção, ou seja, a razão entre o valor dos produtos e os custos totais de produção, incluindo os custos ambientais. Por estes motivos, a concorrência dos alimentos biológicos com os alimentos convencionais, não é imparcial.

Embora nos países desenvolvidos a diferença de produtividade entre a produção agrícola biológica e a produção convencional seja, normalmente, negativa, nos países em desenvolvimento, normalmente com falta de água e com solos pobres, a diferença de produtividade entre a produção agrícola biológica e a produção convencional é positiva (Wilbois e Schmidt, 2019). A AB pode, assim, contribuir substancialmente para alimentar o mundo, pois permite aumentar a produtividade das culturas em países em desenvolvimento, onde esses aumentos contribuem para a segurança alimentar e a autossuficiência das comunidades locais.

Nos países desenvolvidos, a AB procura definir as suas prioridades de investigação para o futuro, no sentido de aumentar a produtividade das culturas, abordando os fatores mais limitantes como a disponibilidade de azoto e o controlo de infestantes, de pragas e doenças das culturas (Wilbois e Schmidt, 2019). Com investigação adequada e focando a eficiência dos processos de transformação dos recursos naturais em vez do aumento de inputs, a produção biológica pode aumentar a produtividade e, assim, desempenhar um papel cada vez maior na agricultura sustentável global e na produção de alimentos no futuro. No conjunto dos processos e fatores de produção utilizados em AB, os microrganismos do solo assumem um papel essencial e têm sido vitais para a evolução da vida na Terra, nomeadamente os biofertilizantes como os ‘microrganismos eficientes’ (EM).

1.2. Microrganismos Eficientes (EM)

Atualmente existe a necessidade de utilização de novas ferramentas e tecnologias de proteção das culturas recorrendo a agentes biológicos, para o controlo de pragas e doenças endémicas, emergentes ou invasoras, e de uma melhor compreensão das interações planta - agente patogénico - microbioma. A investigação destes temas pode incluir o melhoramento de populações de microbiomas e de cultivares, que incrementem a resistência ao stresse biótico e abiótico. Em acréscimo, o uso de aditivos biológicos específicos, como compostados, bio-estimulantes e agentes de proteção biológica, devem ser investigados para aumentar a utilização de nutrientes e a resiliência contra stresses bióticos e abióticos das culturas em diferentes condições edafoclimáticas.

O conceito de Microrganismos Eficientes (EM), surgiu no Japão, através do Professor e investigador japonês Dr. Teruo Higa, no início dos anos 80 do século XX, e consiste em culturas mistas de microrganismos de ocorrência natural (Higa, 1996). Os EM incluem bactérias lácticas (ex., *Lactobacillus plantarum* L. *casei* e *Streptococcus lactis*), leveduras

(ex. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*), bactérias fotossintéticas (ex., *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*), Actinomycetes (ex., *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus*) e fungos filamentosos (ex., *Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*) (Higa e Parr, 1994; Córdor et al., 2007; Javaid, 2010; Joshi et al., 2019; Xu, 2000; Koskey, 2021).

Este conjunto de microrganismos aeróbios e anaeróbios pode ser aplicado ao solo como inoculante para aumentar a diversidade e atividade microbiana, contribuindo para uma maior disponibilidade de nutrientes para a planta e redução de problemas fitossanitários por aumentarem a atividade antimicrobiana do solo (Córdor-Golec et al., 2007). As bactérias fotossintéticas sintetizam aminoácidos, ácidos nucleicos, substâncias bioativas e açúcares, as leveduras e Actinomycetes sintetizam substâncias antimicrobianas úteis para o crescimento das plantas (hormonas e enzimas), a partir de aminoácidos e açúcares libertados pelas bactérias fotossintéticas, pela decomposição da matéria orgânica do solo e pelas raízes de plantas. Os fungos filamentosos decompõem a matéria orgânica produzindo álcool, ésteres e substâncias antimicrobianas (Córdor-Golec et al., 2007; Joshi et al., 2019; Kuzyakov e Razavi, 2019).

As designadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) estimulam o crescimento das plantas hospedeiras, através de mecanismos diretos e indiretos (Elnahal et al., 2022). Os mecanismos diretos incluem a produção de fito-hormonas, fixação de N, solubilização de fosfatos e aumento da absorção de nutrientes, como o ferro (sideróforos). Os indiretos incluem a produção de compostos orgânicos voláteis e não voláteis (Actinomycetes), que atuam como antibióticos; a competição nutricional; o parasitismo; a inibição da ação/ produção de toxinas patogénicas e a resistência sistémica induzida (Elnahal et al., 2022). Os fungos produzem também metabolitos que interferem no crescimento e atividade dos agentes patogénicos, como as enzimas líticas (quebram compostos como quitina, proteína, DNA, hemiceluloses e celulose), por ex. produzidas *Trichoderma* spp., e outros como a glomalina (glicoproteína), produzida por fungos micorrízicos arbusculares, associada à formação e estabilidade dos agregados do solo. (Elnahal et al., 2022).

A resistência sistémica adquirida ou induzida, e diversas hormonas desempenham papéis fundamentais na regulação da rede de sinalização, proporcionando à planta capacidade de regular a sua resposta imune e conseqüente resistência da planta a microrganismos

fitopatogénicos (Pieterse et al., 2009). Os agentes patogénicos, por outro lado, podem manipular a rede de sinalização de defesa da planta para seu próprio benefício, afetando as fito-hormonas, para anular a resposta imune do hospedeiro (Pieterse et al., 2009). A resistência sistémica adquirida (SAR) é tipicamente ativada em tecidos sistémicos saudáveis de plantas localmente infetadas. Após a infeção do agente patogénico, um sinal móvel percorre o sistema vascular para ativar as respostas de defesa nos tecidos distais. O ácido salicílico (SA) é uma molécula sinalizadora essencial para o início da SAR, pois é necessário para a ativação de um conjunto de genes, que codificam proteínas relacionadas com a patogénese (PRs) com propriedades antimicrobianas (Pieterse et al., 2009). A resistência sistémica induzida (ISR) é tipicamente ativada após a colonização das raízes das plantas por microrganismos benéficos. Como o SAR, um sinal de longa distância viaja através do sistema vascular para ativar a imunidade sistémica em partes da planta acima do solo. A ISR é comumente regulada por vias de sinalização dependentes de ácido jasmónico (JA) e etileno (ET) e normalmente não está associada à ativação direta de genes PR. Em vez disso, as plantas que expressam ISR são preparadas para a expressão acelerada de genes dependentes de JA e ET, que se torna evidente somente após o ataque do agente patogénico. Tanto o SAR quanto o ISR são eficazes contra um amplo espectro de agentes patogénicos de plantas virulentas (Pieterse et al., 2009).

Diversos estudos de utilização de EM diferem nos resultados obtidos. Por exemplo, numa revisão bibliográfica (Olle e Williams, 2013), entre 22 trabalhos sobre os efeitos dos EM em culturas hortícolas, referiu que a produtividade aumentou em 84%, diminuiu em 4% e em 12% não se encontraram diferenças significativas (Olle e Williams, 2013). A incorporação de EM tem também sido responsável por melhorias das propriedades físicas e químicas do solo, nomeadamente, por aumentar a atividade biológica do solo, contribuindo para uma rápida humificação da matéria orgânica fresca, melhoria da retenção de água e da capacidade de troca catiónica, utilizando como indicadores a presença de exopolissacarídeos e das enzimas fosfatase alcalina e esterase (Valarini et al., 2003). Para além da aplicação de EM através da rega, outros autores referem a sua utilização como aditivo de compostados. Por exemplo, Sharma et al. (2017), na Índia (Nova Deli), reportaram um aumento do húmus do solo, do teor em azoto disponível e em carbono orgânico, em consequência da adição de EM ao compostado, que foi aplicado entre 5 e 20 t ha⁻¹, respetivamente para a produção de flores de calêndula e cravos-túnicos, avaliado

pelo aumento da atividade enzimática do solo (fosfatase ácida desidrogenase, β -glicosidase).

No projeto SureVeg “Produção intensiva de culturas hortícolas em linhas/faixas alternadas e reciclagem de resíduos e de biomassa vegetal”, coordenado pela Dinamarca (U. Aarhus), com outros 5 países da UE, teve por objetivo desenvolver sistemas de produção de culturas hortícolas em linhas/faixas, fertilizantes produzidos com resíduos de plantas e tecnologias inteligentes para a gestão das culturas (Robô SureVeg) e, ainda, avaliar os efeitos na biodiversidade, na fertilidade do solo e na eficiência de recursos (Shanmugam et al., 2021; Trinchera et al., 2021). Os ensaios realizados em diferentes países da UE, mostraram que a cultura em faixas resulta na dinâmica dos grupos microbianos do solo em direção à predominância da comunidade de fungos ou bactérias, desempenhando um papel fundamental nas culturas selecionadas. Por exemplo, as comunidades de fungos do solo promovem a simbiose das raízes e aumentam a imobilização microbiana de N e P mais do que as bactérias. No sistema de cultivo de feijão-tomate em faixas (Itália), a relação C/N microbiano do solo foi menor sob a cultura de leguminosas, mostrando a predominância de comunidades de bactérias de crescimento rápido, enquanto, sob o tomate, as espécies de fungos dominaram, tendo também aumentado a micorrização radicular (Trinchera et al., 2021). De igual modo, no sistema beterraba-repolho (Dinamarca), a colonização micorrízica da raiz aumentou, incluindo no repolho, que, sendo uma Brassicacea, tem sido reconhecido como uma espécie não-micorrízica. No sistema de aipo-alho Francês (Bélgica), o cultivo em faixas promoveu a predominância de fungos sob o aipo e de bactérias sob o alho Francês. A capacidade reduzida do sistema de monocultura de conservar a matéria orgânica do solo em comparação com o cultivo em faixa foi confirmada no ensaio de couve-de-feijão (Letónia), onde a respiração microbiana do solo sob repolho em monocultura foi mais elevada (Trinchera et al., 2021). Em síntese, com produtividades superiores ou comparáveis, em função da localização e das espécies, o cultivo em faixas pode ser introduzido em sistemas de produção de culturas hortícolas biológicas, para modular a diversidade do microbiomas do solo, em favor de grupos de microrganismos no solo capazes de reduzir a perda de matéria orgânica e reter nutrientes de N e P. Em acréscimo, no referido projeto, a caracterização genética do microbioma da rizosfera também mostrou uma diminuição na abundância relativa de algumas bactérias e fungos patogénicos (Shanmugam et al., 2021; Trinchera et al., 2021).

A utilização de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que aumentam o acesso das plantas a água e a nutrientes como o P e o N, contribuindo para melhorar a produtividade das culturas, foi desenvolvido para a cultura de cenoura num projeto na Califórnia, onde se correlacionaram variáveis de clima, solo e cultivares e se caracterizaram os perfis microbianos do solo, em particular dos FMA, com o objetivo de selecionar cultivares e recomendar rotações de culturas que contribuam para a existência de comunidades benéficas de fungos no solo, que aumentem a tolerância das culturas a condições de stresse (OFRF, 2020).

Os EM não substituem outras práticas de gestão dos sistemas agrícolas destinadas a promover os microbiomas, garantindo a estabilização dos serviços de ecossistema microbianos, nomeadamente no solo (Tebbe e Liu, 2020; Labouyrie et al., 2023). No entanto, podem otimizar as melhores práticas do solo e da produção de culturas, como a rotação e a diversidade de culturas (que suporta a diversidade microbiana, inibindo o aumento de agentes patogénicos do solo); a inclusão de Fabáceas; a incorporação de MO no solo; a não fertilização azotada sem adicionar carbono orgânico (para estabilizar os processos microbianos e o eventual excesso de N ser armazenado temporariamente na biomassa microbiana); a mobilização mínima (que contribui para a preservação da estrutura do solo); a reciclagem de resíduos das culturas e o controlo biológico de pragas e doenças (Higa e Wididana, 1991; Tebbe e Liu, 2020).

O estudo e análise do microbioma das plantas e do solo beneficiaram de forma significativa com as tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS) que permitem sequenciar elevadas quantidades de DNA a um custo muito reduzido. Estas tecnologias recorrem à utilização de plataformas que incorporam o uso de várias etapas no fluxo de trabalho NGS, incluindo preparação de amostras ou bibliotecas, geração de clusters, sequenciação e análise de dados (Slatko et al., 2018) e permitem a cobertura de sequenciação para uma região selecionada ou para todo o genoma de um organismo. Nos últimos anos, esta tecnologia tem sido utilizada para análise detalhada da complexa composição filogenética das comunidades microbianas que mostraram ser úteis para avaliar o efeito de vários fatores (bióticos e abióticos) nessas comunidades. Numerosos trabalhos publicados como os estudos de Labouyrie et al. (2023) evidenciam a utilização desta tecnologia para o estudo de padrões da diversidade microbiana do solo em 24 países da Europa, bem como os

estudos de Knief (2014) sobre análise das interações microrganismo-planta na era das tecnologias de sequenciação da nova geração.

1.3. Cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta hortícola herbácea anual da família Asteraceae e o seu ciclo cultural inclui a germinação, a formação da roseta de folhas e o crescimento da parte vegetativa, com ou sem a formação do repolho, de acordo com as cultivares. Em cultura protegida, estas fases decorrem normalmente de 6 a 8 semanas no período primavera-verão e de 10 a 12 semanas no período outono-inverno (Almeida, 2006).

A alface possui um sistema radicular fasciculado, pouco desenvolvido e relativamente superficial. É uma planta sensível à geada, mas tolera uma luminosidade baixa. As condições mais favoráveis são fotoperíodo de 10 h, temperaturas diurnas de 15-20 °C e noturnas de 8-12 °C (Almeida, 2006). Nas condições climatéricas do Entre Douro e Minho a alface é cultivada durante todo o ano, em estufa, de preferência de setembro a abril e ao ar livre, de março a setembro (DGPC, 2006).

A cultura da alface adapta-se a diversos tipos de solo. Contudo, tem preferência por solos frescos e bem drenados, com 40 a 50 cm de profundidade, de textura franco-arenosa, ricos em MO, com pH entre 6,5 e 7,5 e CE inferior a 1,3 dS m⁻¹. A alface é uma planta sensível à acidez do solo (Maynard & Hochmuth, 2007) e, embora pouco exigente em nutrientes, necessita que estes estejam facilmente disponíveis no solo, devido à pequena profundidade das suas raízes. A quantidade de MO e o tipo de composto a incorporar no solo para fornecer os nutrientes em quantidades requeridas pela alface, deve evitar o excesso de nitratos nas folhas e as perdas de N por lixiviação ou por volatilização (Manojlovic et al., 2010).

Num ensaio de vasos com aplicação de composto de resíduos vinícolas, numa mistura de 2:1 de lamas de águas residuais de lavagem e engaço de uva, o peso fresco da alface aumentou 13% em comparação com o tratamento testemunha sem aplicação de fertilizante, e a acumulação de N, P e K também aumentou com a incorporação do composto em comparação com o tratamento testemunha (Pinto et al., 2021). Já com um composto derivado de resíduos orgânicos domésticos, o peso fresco da alface aumentou 63% com a aplicação de composto em comparação com o tratamento testemunha (Brito et al., 2014). A alface é uma planta que reflete o potencial agronómico dos compostos após a sua

incorporação ao solo, num período de tempo curto, tornando-se adequada para a realização de ensaios de avaliação de compostos que se pretendem utilizar como corretivos orgânicos do solo, nomeadamente em agricultura biológica.

1.4. Objetivos do trabalho

Considerando que os microrganismos do solo estão envolvidos em vários processos de grande interesse agrónómico, em particular para a agricultura biológica, é importante avaliar a utilização de microrganismos eficientes (EM) em horticultura.

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o crescimento de alface no final do período de inverno e na primavera, em ensaios de vasos com aplicação semanal de três formulações de EM, através da água de rega, em conjunto com uma fertilização orgânica (Monterra ou compostado).

Um objetivo específico foi a avaliação dos efeitos na diversidade das comunidades microbianas do solo, em resultado da aplicação de um dos EM - EMRO/Japão certificado, no solo inicial e final do segundo ensaio de vasos na primavera, através de análises microbiológicas do solo por extração de DNA e análise molecular/Metabarcoding.

2. Material e métodos

2.1. Localização e época do ano em que decorreram os ensaios

Realizaram-se dois ensaios de vasos com alface (*Lactuca sativa* L.), numa estufa não climatizada na Escola Superior Agrária/IPVC, em Ponte de Lima (41°47'30''N e 8°32'24''W e 50 m de altitude).

Os dois ensaios destinaram-se a replicar o estudo no final do período de inverno, com a plantação realizada no dia 11/3/2022 e, em plena primavera, tendo a plantação decorrido no dia 28/4/2022. Doravante, estes dois ensaios serão designados por “primeiro ensaio” e “segundo ensaio”.

A duração do ciclo cultural do primeiro ensaio foi de 53 dias (colheita no dia 3/5/2022), e foi de 32 dias após a plantação (DAP) no segundo ensaio (colheita no dia 30/5/2022).

2.2. Caracterização das cultivares, do solo e dos fertilizantes orgânicos

No primeiro ensaio, as alfaces de folhas da cv. Folha-de-carvalho (Biodiversus), foram plantadas em vasos com 8 kg de solo com pH de 5,5 e 2,0% de matéria orgânica (MO) (quadro 2.1). O solo foi recolhido entre 0 e 20 cm de profundidade numa parcela de solo pobre na exploração agrícola da ESA-IPVC. Foi adicionado ao solo o fertilizante orgânico Monterra (ECOVEG), certificado para a AB, na dose de $2 \cdot t \cdot ha^{-1}$, com NPK de 13-0-0, 87% de MO, 90% de matéria seca, óxido de cálcio 1,2% e magnésio 0,2%. Aplicou-se ainda calcário Physiolith (Timac AGRO), na dose de $2 \cdot t \cdot ha^{-1}$.

No segundo ensaio, as alfaces de folha frisada da cv. Clerac (Seminis Vegetable Seeds), foram plantadas em vasos com 8 kg de solo com pH 6,0 e MO 3,3% (quadro 2.1). O solo foi recolhido entre 0 e 20 cm de profundidade numa parcela da exploração agrícola da ESA-IPVC. Aplicou-se ao solo um compostado na dose de $20 \cdot t \cdot ha^{-1}$, resultante da mistura de engaço e bagaço de uva branca, produzido sem revolvimento, após 260 dias de compostagem, com 89,0% de MO e relação C/N de 24 (quadro 2.1). Aplicou-se também calcário Physiolith (Timac AGRO), na dose de $2 \cdot t \cdot ha^{-1}$.

Quadro 2.1 - Características químicas do solo do primeiro e do segundo ensaios de vasos, e do compostado sem revolvimento após 260 dias de compostagem, do segundo ensaio (média \pm desvio padrão).

	Unidade	1º ensaio	2º ensaio	Compostado
		Solo	Solo	
MS	(%)	-	-	37,6 \pm 0,7
pH		5,5 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1	7,4 \pm 0,03
CE	(dS m ⁻¹)	0,04 \pm 0,004	0,09 \pm 0,01	0,5 \pm 0,1
MO	(g kg ⁻¹)	20 \pm 2	36 \pm 0,2	890 \pm 22
N	(g kg ⁻¹)	-	-	20,9 \pm 1,5
C	(g kg ⁻¹)	-	-	495 \pm 12,1
C/N		-	-	24 \pm 1,2
P	(g kg ⁻¹)	-	-	1,7 \pm 0,2
K	(g kg ⁻¹)	-	-	26,7 \pm 5,0
*P ₂ O ₅	(mg kg ⁻¹)	102 \pm 27	206 \pm 8	-
*K ₂ O	(mg kg ⁻¹)	267 \pm 24	407 \pm 9	-
N-NH ₄ ⁺	(mg kg ⁻¹)	-	-	8,2 \pm 1,4
N-NO ₃ ⁻	(mg kg ⁻¹)	-	-	6,5 \pm 1,3

Os teores de MO, C, N, P e K do compostado refere-se à matéria seca.

*Método de Egnér-Riehm

2.3. Desenho experimental e caracterização dos EM e doses de aplicação

Os dois ensaios foram conduzidos com um delineamento experimental de blocos casualizados, e incluiu 4 repetições e cinco tratamentos: três com fertilizante (F) e com EM: (i) EMRO, certificado, Japão (EM1), (ii) Herdade Freixo do Meio (não comercial) (EM2) e (iii) Bioprana, Pontevedra, Espanha (EM3); e dois tratamentos sem EM, (iv) com F (EM0) e (v) sem F (EM0sF) (quadro 2.2).

Quadro 2.2 - Designação dos tratamentos dos ensaios de vasos de alface, com aplicação de fertilizante orgânico (F) e com três EM: certificado EMRO/Japão (EM1), Herdade Freixo do Meio (EM2) e Bioprana (EM3), e dois tratamentos sem EM: um com F (EM0) e outro sem F (EM0sF).

Tratamentos	Designação
EM1 - EMRO/Japão + F	EM1
EM2 - Herdade Freixo do Meio + F	EM2
EM3 - Bioprana + F	EM3
Sem EM + F	EM0
Sem EM e sem F	EM0 s/F

Os fertilizantes orgânicos e o calcário foram cuidadosamente misturados com o solo e posteriormente, os vasos foram distribuídos na bancada aleatoriamente, em blocos casualizados (Fig. 2.1 e 2.2).

No segundo ensaio também se incluiu um tratamento sem planta, com aplicação de fertilizante orgânico e de EM1 (EM1 s/P), para avaliação do efeito da planta no microbiomas do solo.

Os EM foram aplicados uma vez por semana na água de rega ($0,5 \cdot L \text{ vaso}^{-1}$) e as doses de aplicação seguiram as recomendações dos fabricantes: 150, 50 e 30 mL $5 \cdot L^{-1}$ água, respetivamente para EM1, EM2 e EM3, com exceção do EM2, onde se aplicaram 100 mL $5 \cdot L^{-1}$ água no 2º ensaio.

No primeiro ensaio, no final do inverno, a rega decorreu semanalmente, mas no segundo ensaio na primavera, para impedir o défice hídrico das plantas, foi necessário regar duas vezes por semana, embora os EM apenas tenham sido aplicados numa das regas.

As plantas infestantes foram retiradas manualmente de modo a evitar a competição com as alfaces.

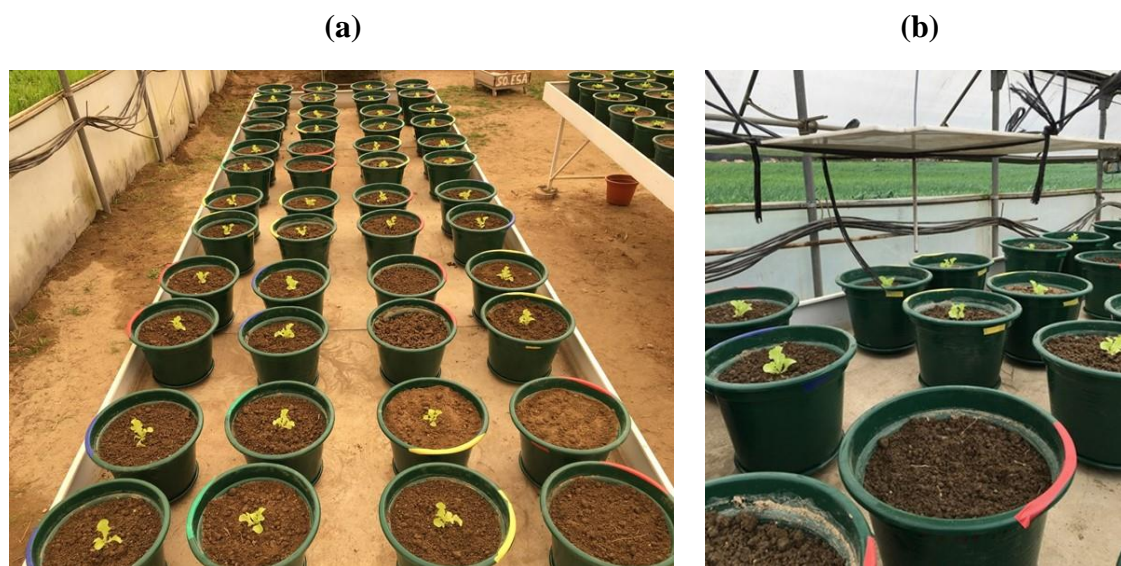


Figura 2.1 - (a) Primeiro ensaio de vasos de alface após a plantação, que decorreu no dia 11/3/2022. (b) Termístor colocado a cerca de 50 cm acima da cultura e protegido por um escudo de radiação solar.

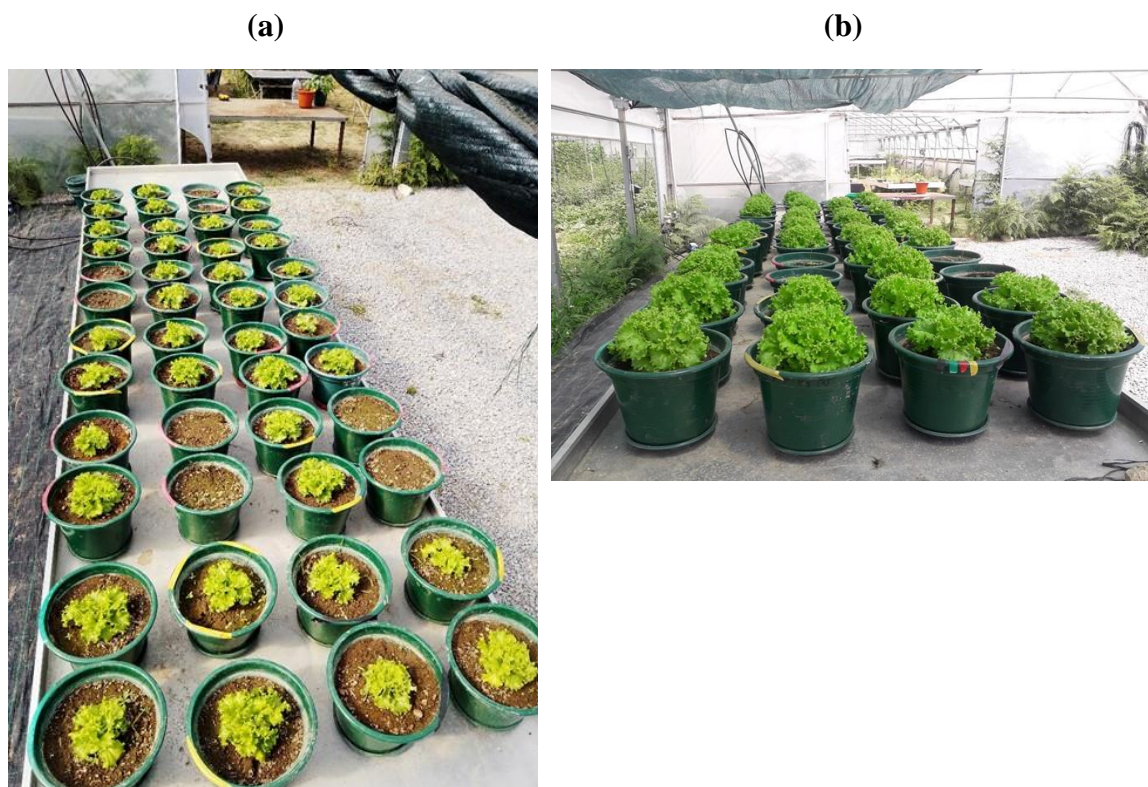


Figura 2.2 - Segundo ensaio de vasos de alface (a) 15 dias após a plantação que decorreu no dia 28/4/22 e (b) no dia da colheita, 32 dias após a plantação.

2.4. Monitorização da temperatura do ar

A temperatura média diária do ar foi obtida através da média dos dados registados por dois termístores suspensos e protegidos por um escudo de radiação solar em acrílico branco, colocados a cerca de 50 cm acima das plantas (Fig. 2.1 b). As temperaturas foram registadas automaticamente, minuto a minuto, com recolha da média horária, através de um Data Logger DL2 (Delta T Devices), sendo posteriormente calculados os valores da temperatura média diária.

O primeiro ensaio no final do inverno, decorreu durante 53 dias com uma temperatura média de 15,2 °C, e o segundo ensaio na primavera decorreu durante 32 dias com uma temperatura média de 20,2 °C (Fig. 2.3).

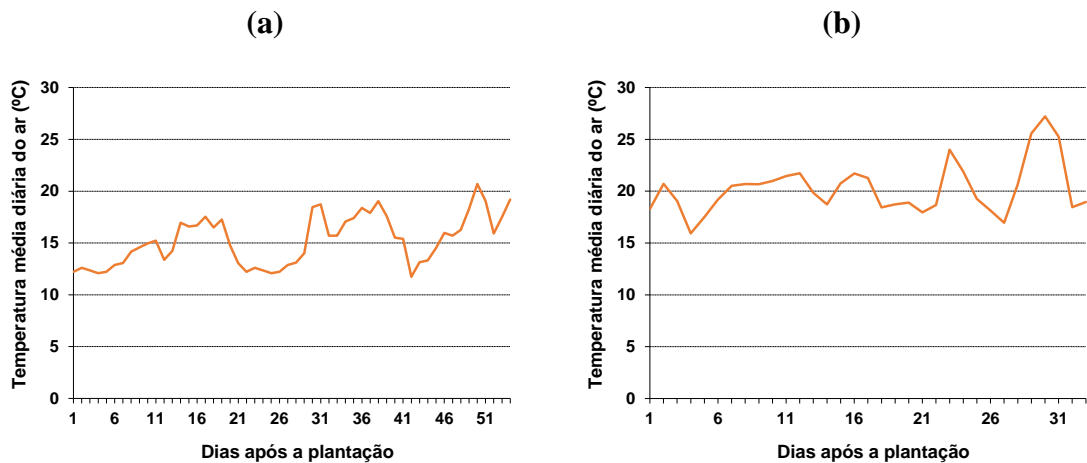


Figura 2.3 - Temperatura média diária do ar (°C) da plantação à colheita de alface, durante (a) o primeiro ensaio de 11/3/2022 a 3/5/2022, com temperatura média de 15,2 °C e (b) o segundo ensaio de 28/4/22 a 30/5/2022, com temperatura média de 20,2 °C.

2.5. Avaliação da doença causada pelo nemátode-das-galhas-radiculares

No primeiro ensaio, os sintomas da doença causada pelo nemátode-das-galhas-radiculares (NGR) (*Meloidogyne* spp.) foram detetados à colheita, 53 DAP, e foram avaliados através da contagem do número de galhas e de massas de ovos planta⁻¹. Após lavagem e secagem das raízes, estas foram submergidas numa solução de Floxina B 0,0015% durante cerca de 20 minutos (Hartman, 1982), foram novamente lavadas e contaram-se as galhas e massas de ovos coradas de vermelho na superfície da raiz (Fig. 2.4)

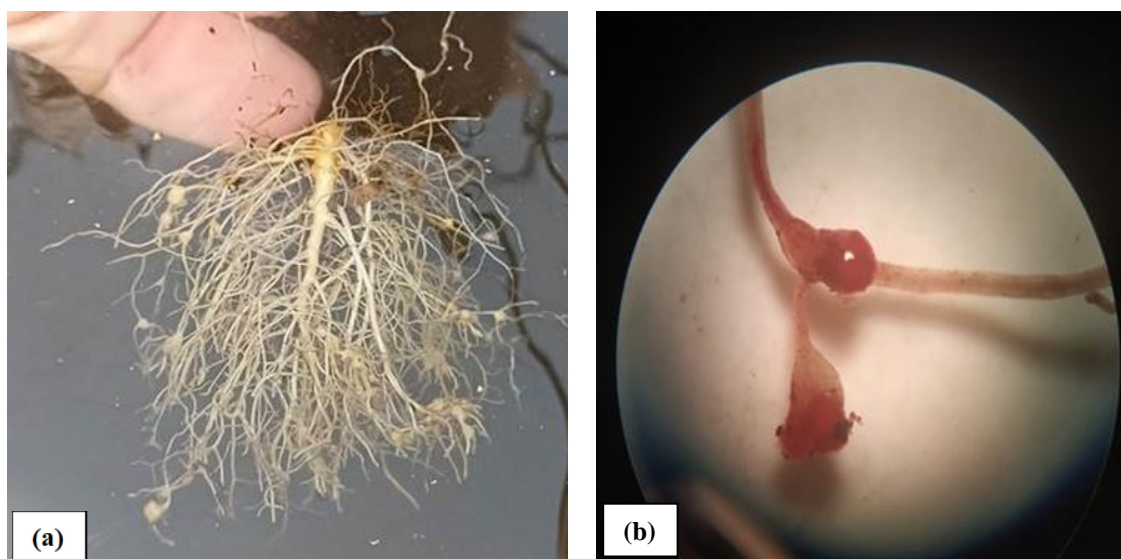


Figura 2.4 - (a) Sintoma da doença causada pelo nemátode-das-galhas-radiculares (NGR) (*Meloidogyne* spp.) nas raízes das alfaces; (b) Galhas e massas de ovos após lavagem, secagem e coloração das raízes com Floxina B.

2.6. Métodos analíticos

Solo

As análises foram efetuadas no laboratório de solos da ESA-IPVC. As análises químicas realizadas incluíram a determinação de pH, CE, teor de MO e teores P_2O_5 e K_2O .

O pH (H_2O) foi determinado em amostras frescas por extração em água destilada na proporção de 10 g de amostra para 25 mL de água ultra pura, e a sua leitura foi feita sobre a suspensão com um potenciómetro e um eléctrodo combinado para pH após estabilizar durante 2 horas (Multi-parameter Analyser C3020, Consort).

A CE do extrato de solo foi determinada em amostras frescas por extração em água destilada na proporção de 1 volume de amostra para 5 volumes de água. A CE foi medida utilizando um condutivímetro (Multi-parameter Analyser C3020, Consort) depois de filtrar com filtro VWR nº 413.

O teor de MO do solo foi determinado recorrendo ao método Tinsley, através da oxidação da MO por digestão com o dicromato de sódio. O valor de dicromato de sódio gasto na oxidação do carbono orgânico na titulação com sal de Mohr e multiplicando pelo fator de conversão do agente oxidante, obteve-se o teor de C da amostra. O teor de MO, foi obtida aplicando a fórmula seguinte: $MO = C \times 1,724$ (fator de “Van Bemmelen”)

O fósforo foi determinado recorrendo ao método de Egnér-Riehm quantificado por colorimetria (espectrofotometria UV VIS), extraíndo o fósforo com uma solução de lactato de amónio e ácido acético tamponizada a pH compreendido entre 3,65 e 3,75. Para a determinação do potássio, recorreu-se ao método de Egnér-Riehm quantificado por fotometria de chama, extraíndo o K^+ com uma solução de lactato de amónio e ácido acético tamponizada a pH compreendido entre 3,65 e 3,75.

Plantas

As alfaces foram colhidas, colocadas em sacos de papel devidamente identificados e pesadas para determinação de peso fresco.

As alfaces foram colocadas numa estufa a $65\text{ }^\circ\text{C}$ até se obter um peso constante para determinação do peso seco. Apenas nas plantas do segundo ensaio, as amostras secas foram moídas com um moinho ultra centrífugo ZM 200 (Retsch) e posteriormente utilizadas para determinação do N, P e K, Ca e Mg totais.

Os métodos utilizados nas análises para determinação do teor de nutrientes nas alfaces foram, para o azoto, o método Kjeldahl modificado; para o P, após digestão com ácido sulfúrico, a leitura efetuou-se num espectrofotómetro de UV; para o K, após digestão nitro-perclórica e para o Ca e Mg num extrato de acetato de amónio, os valores foram determinados num espectrofotómetro de absorção atómica.

2.7. Análise molecular do microbioma do solo e do EM 1

Análises moleculares do microbioma foram realizadas ao EM1, ao solo inicial e solo final do segundo ensaio de alface, com EM1 com e sem planta e sem EM com e sem fertilização orgânica (compostado).

Extração de DNA e sequenciação

A partir de uma amostra de solo (0,25 g) o DNA total foi extraído usando o UltraClean® Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante.

A região do 16S rDNA amplificada foi a região V3-V4 e a sua sequenciação foi realizada com o sequenciador Illumina MiSeq® (Illumina, San Diego, CA, EUA), no Laboratório Eurofins Genomic (Ebersberg, Alemanha). Este laboratório utilizou um kit de placas de 96 poços SequelPrep (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) e os primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') (Sun et al., 2022).

Os produtos PCR amplificados foram purificados, normalizados, agrupados e sequenciados, de acordo com as instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, EUA). As leituras foram filtradas por qualidade para remover leituras com menos de 285 pb, bases ambíguas ("N") e sequências consideradas quimeras de baixa qualidade, com qualidade média inferior a Q20. Leituras de alta qualidade foram atribuídas a Unidades Taxonómicas Operacionais (UTO) usando o método de Decomposição de Entropia Mínima (Eren et al., 2015; Peixoto et al., 2021 e 2022).

As sequências foram então processadas utilizando-se o software QUIIME (Caporaso et al., 2010) e DADA-2 para remoção de outros possíveis erros na sequenciação (Callahan et al., 2016). Foi obtida uma tabela de “amplicon sequence variants” (ASVs) representativas para cada amostra. Para a classificação taxonómica destas ASVs foi treinado um classificador

(Naive Bayes classifier) com base nas sequências de 16S rDNA extraídas da base de dados SILVA v. 138 (Quast et al., 2013).

Os dados foram depois normalizados com base no número de cópias de 16S rDNA estimado, tendo em conta a classificação taxonómica atribuída a cada ASV (Kembel et al., 2012). Foram removidos da análise as ASVs pouco representativas (menos de 10 reads) e ASVs classificadas como mitocôndrias ou cloroplastos.

2.8. Análise estatística

A análise estatística, para comparar as médias de produção e dos teores de nutrientes das alfices, foi realizada através de análise de variância (ANOVA), e quando existiam diferenças entre tratamentos, as mesmas foram comparadas com base na menor diferença significativa entre médias ($P < 0,05$), recorrendo-se ao programa IBM SPSS Statistics, versão 22.

As análises de agrupamento e coordenadas principais (PCoA), usando uma matriz de distância de Bray-Curtis foi construída a partir de uma tabela de abundância de rarefeita e transformada ($\log x + 1$), foram realizadas usando o software PRIMER v6 (Primer-E Ltd., Plymouth, UK). Os índices de riqueza de espécies e diversidade (índice de Shannon) foram calculados com base em dados de abundância. As curvas de rarefação foram obtidas através da função *rarecurve* do pacote *vegan* do software R (R Core Team, 2016).

3. Resultados

3.1. Primeiro ensaio - final do inverno

Crescimento das plantas e sintomas de NGR

No primeiro ensaio, de um modo geral, as plantas de alface tiveram um crescimento muito lento devido aos baixos valores de temperatura média do ar (15,2°C) e, principalmente, devido à presença de sintomas causados por *Meloidogyne* spp. e do baixo nível de fertilidade do solo (Fig.3.1 a). O solo apresentava um baixo teor de MO e pH de 5,5, que terá dificultado a absorção de nutrientes, mesmo com a correção do pH do solo que foi efetuada, uma vez que o pH ótimo para a alface se situa entre 6,5 e 7,2. Os valores elevados de matéria seca das plantas obtidos, estão associados às características da cultivar de alface 'Folha-de-carvalho' (Fig.3.1 a).

À colheita as plantas apresentaram sintomas de NGR (Fig.3.2) que se traduziram num número de galhas e massas de ovos planta⁻¹ semelhante para todos os tratamentos com Monterra, com e sem EM, e sempre inferiores ($p < 0,05$) em comparação com o tratamento sem Monterra nem EM (Fig. 3.1 b).

No entanto, o peso seco das alfaces foi superior em EM3 em comparação com EM2 ($p < 0,05$), e sem diferenças significativas em comparação com os restantes tratamentos (Fig. 1 b). Os menores sintomas causados pelos NGR não se traduziram diretamente num maior crescimento das alfaces, uma vez que os tratamentos sem EM com e sem fertilização orgânica resultaram em pesos idênticos das plantas. Aparentemente, o menor crescimento das alfaces com aplicação do EM2, em comparação com o EM3, poderá indicar uma menor disponibilidade de nutrientes minerais.

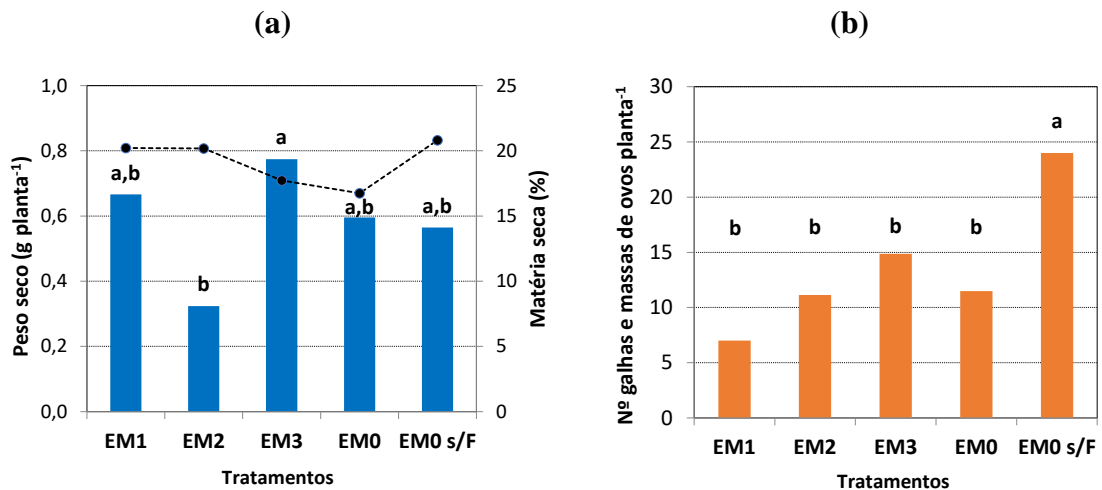


Figura 3.1 - (a) Peso seco da alface (g planta⁻¹) e percentagem de matéria seca (%), e (b) número de galhas e massas de ovos (planta⁻¹), para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra) e com: (EM1) certificado EMRO/Japão, (EM2) Herdade Freixo do Meio, (EM3) Bioprana/Pontevedra, (EM0) sem EM, e (EM0sF) sem EM e sem fertilização orgânica. Letras diferentes em cima das colunas dos gráficos (a) e (b), indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

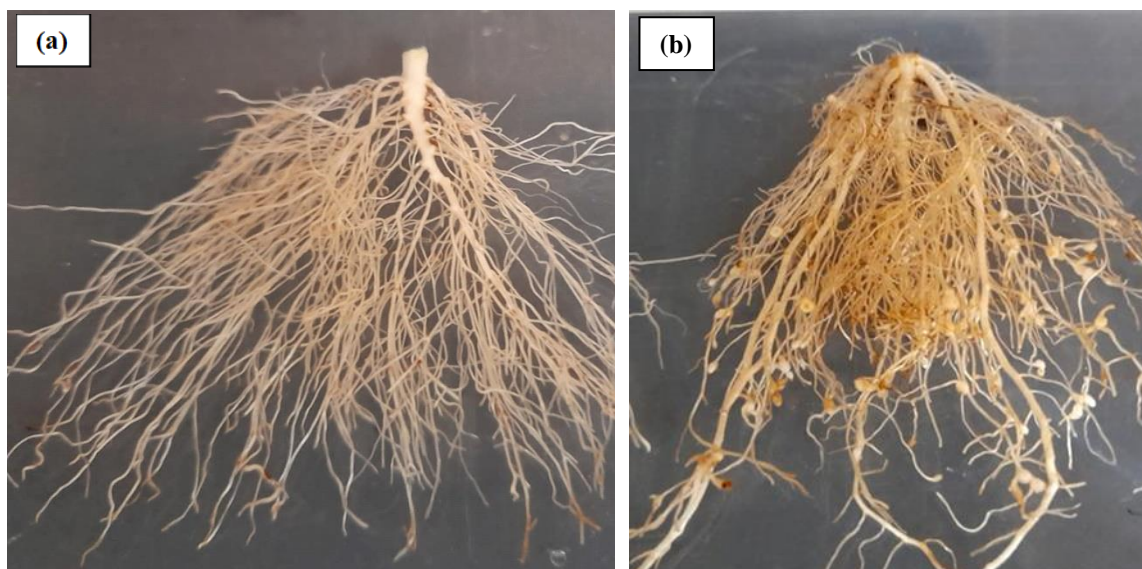


Figura 3.2 - Raízes de alfaces com (a) menor e (b) maior número de galhas e massas de ovos (planta⁻¹), causadas pelo nemátode-das-galhas-radiculares (*Meloidogyne* spp.).

3.2. Segundo ensaio - primavera

3.2.1. Crescimento das plantas

No segundo ensaio na primavera, o peso fresco e o peso seco das alfaces foram semelhante para todos os tratamentos com e sem EM com compostado, e foram superiores ($p < 0,05$) ao peso das alfaces sem EM e sem compostado (EM0sF) (Fig. 3.3). Estes resultados indicam um efeito evidente da fertilização orgânica, sem efeito aparente dos EM aplicado ao solo.

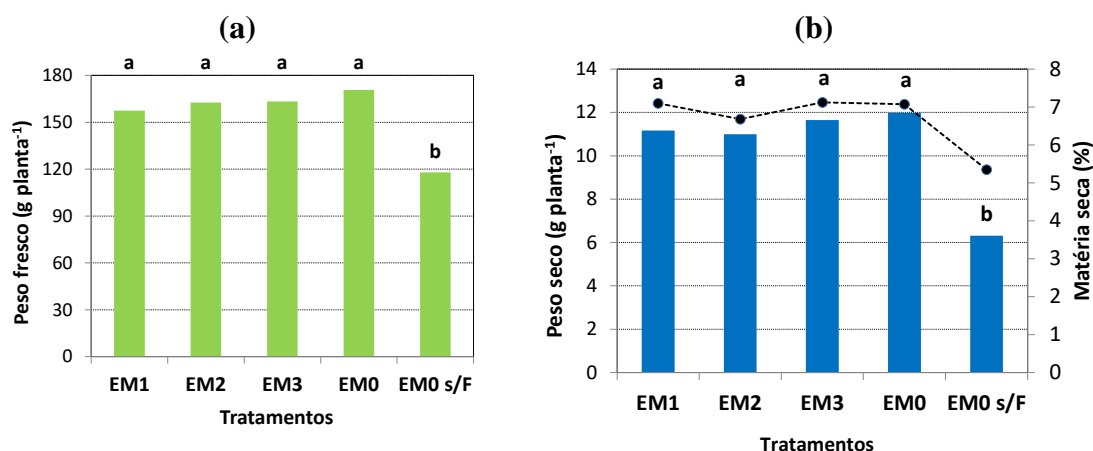


Figura 3.3 - (a) Peso fresco da alface (g planta^{-1}) e (b) Peso seco da alface (g planta^{-1}) e percentagem de matéria seca (%), para os tratamentos com fertilização orgânica (compostado) e com: (EM1) certificado EMRO/Japão, (EM2) Herdade Freixo do Meio, (EM3) Bioprana/Pontevedra, (EM0) sem EM, e (EM0sF) sem EM e sem fertilização orgânica. Letras diferentes em cima das colunas dos gráficos (a) e (b), indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

3.2.2. Teor de nutrientes das plantas

A acumulação de N, P, K e Mg nas folhas de alface, de um modo geral, também aumentou nos tratamentos com compostado, em comparação com o tratamento sem compostado EM0sF (Fig. 3.4). Foi exceção a acumulação de cálcio que foi idêntica em todos os tratamentos.

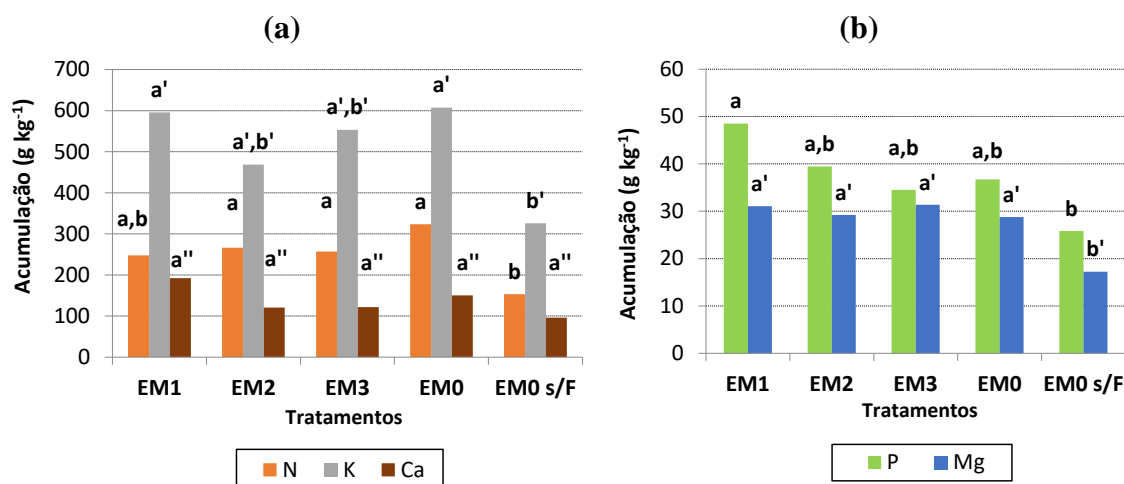


Figura 3.4 - Acumulação de nutrientes na matéria seca da alface (g kg^{-1}), designadamente, (a) N, K e Ca e (b) P e Mg, para os tratamentos com fertilização orgânica (compostado) e com: (EM1) certificado EMRO/Japão, (EM2) Herdade Freixo do Meio, (EM3) Bioprana/Pontevedra, (EM0) sem EM, e (EM0sF) sem EM e sem fertilização orgânica. Letras diferentes por cima das colunas dos gráficos (a) e (b), indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

3.3. Características químicas do solo inicial e final do segundo ensaio de vasos

As características químicas do solo inicial e final do segundo ensaio de vasos, que decorreu na primavera, revelaram que a aplicação do fertilizante orgânico aumentou os teores de P, K e Mg, e a aplicação de EM1 não alterou os valores de nutrientes do solo (quadro 3.1). Estes resultados aparentemente justificam o crescimento das plantas de alface e a acumulação de nutrientes nas folhas, que foram, de um modo geral, superiores quando se aplicou o compostado em comparação com o tratamento sem compostado (EM0sF). A acumulação de cálcio nas folhas de alface foi idêntica em todos os tratamentos, embora o tratamento EM2+F tenha tido um teor de Ca no solo superior, em comparação com os tratamentos EM0sF e EM1+F (Fig. 3.5).

Quadro 3.1 - Características químicas do solo inicial e final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com: (EM1+F) EMRO/Japão, (EM2+F) Herdade Freixo do Meio, (EM3+F) Bioprana; sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta) (média \pm desvio padrão, σ). Letras diferentes em cada linha, representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$).

	Solo Inicial	EM0sF	EM0+F	EM1+F	EM1+F s planta	EM2+F	EM3+F
pH	6,0 d	6,2 bc	6,3 abc	6,4 ab	6,2 c	6,4 ab	6,4 a
$\pm\sigma$	0,06	0,07	0,12	0,07	0,01	0,06	0,08
CE (dS m ⁻¹)	0,09 e	0,22 d	0,25 c	0,29 b	0,32 a	0,26 bc	0,26 c
$\pm\sigma$	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
MO (g kg ⁻¹)	36,0 b	36,5 b	40,3 ab	39,0 b	45,0 a	40,3 ab	36,5 b
$\pm\sigma$	0,2	0,25	0,49	0,2	0,4	0,5	0,15
*P₂O₅ (mg kg ⁻¹)	206,3 c	317,7 b	330,7 ab	337,0 a	332,0 a	330,3 ab	336,5 a
$\pm\sigma$	8,08	8,08	1,53	2,65	7,0	12,42	0,5
*K₂O (mg kg ⁻¹)	407,3 d	432,3 c	523,3 b	542,3 ab	547,0 a	528,7 ab	534,0 ab
$\pm\sigma$	9,02	15,14	5,86	8,74	6,0	16,65	1,0
Ca (mg kg ⁻¹)	508,3 c	894,7 b	954,3 ab	849,3 b	848,0 b	1073,3 a	965,0 ab
$\pm\sigma$	15,31	41,67	169,36	28,75	12	43,5	89
Mg (mg kg ⁻¹)	81,0 c	94,0 b	116,3 a	117,0 a	120,0 a	116,7 a	116,0 a
$\pm\sigma$	4,0	6,24	3,21	6,0	2,0	2,52	1,0

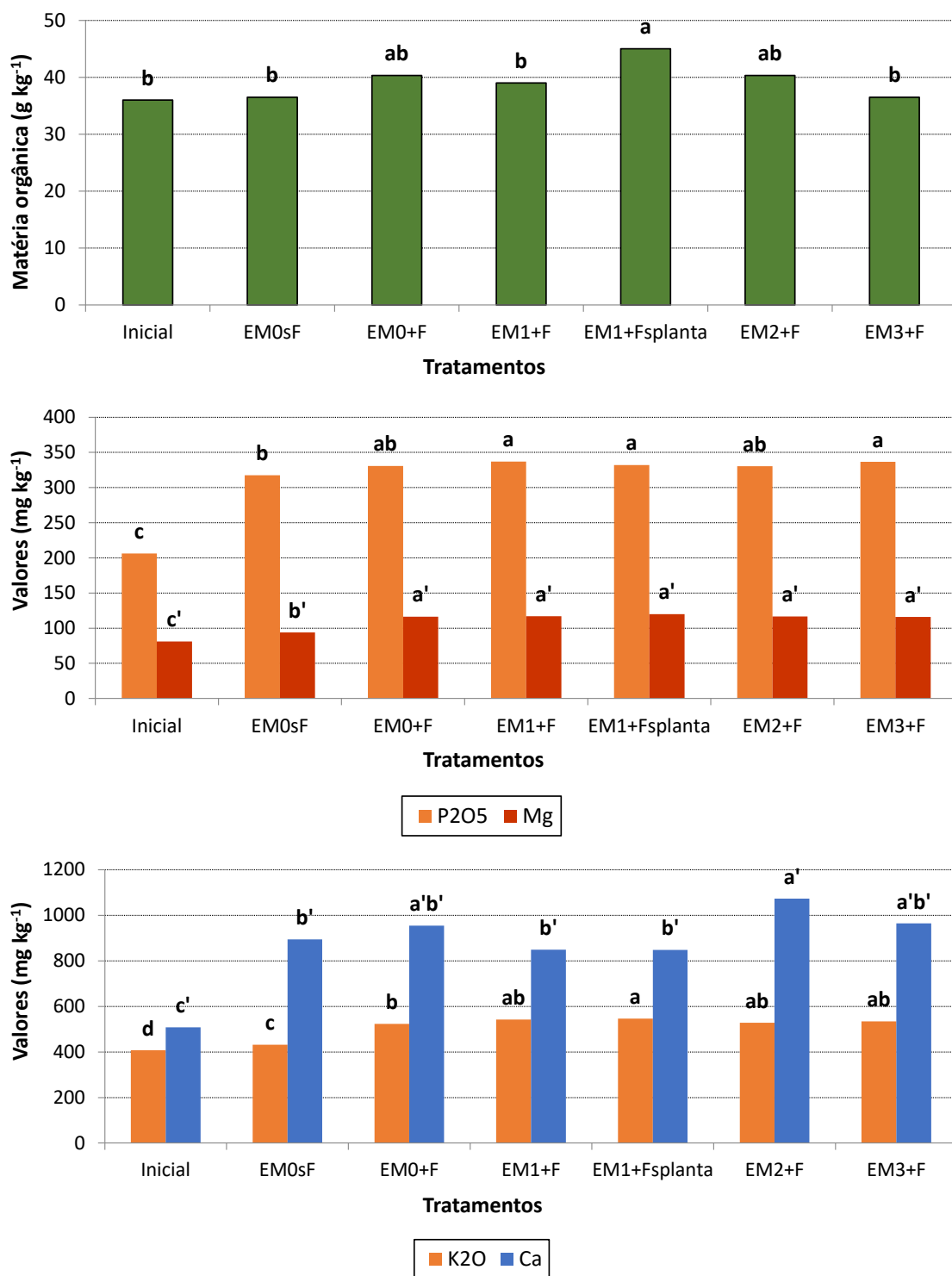


Figura 3.5 - Teores de MO (g kg⁻¹), P₂O₅, Mg, K₂O e Ca (mg kg⁻¹), do solo inicial e final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com: (EM1+F) EMRO/Japão, (EM2+F) Herdade Freixo do Meio, (EM3+F) Bioprana; sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta) (média ± desvio padrão, σ). Letras diferentes em cada coluna, de cada nutriente, representam valores significativamente diferentes entre tratamentos (p < 0,05).

3.4. Microbioma do solo e do EM 1

3.4.1. Distribuição do número de sequências obtidas por amostra

A sequenciação da região V3-V4 do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq, foi utilizada para avaliar o efeito da aplicação de EM1 nas comunidades microbianas do solo inicial e do solo final na presença e ausência de plantas de alface.

A verificação da qualidade da amplificação do DNA e do bom desempenho na sequenciação, foi atestada pela distribuição do número de sequências obtidas por amostra (Fig. 3.6). Em síntese, o número total de contagens de leitura foi de 793166 e a contagem média por amostra foi de 44064 (máximo e mínimo por amostra de 58719 e 17501, respetivamente). Os resultados mostram que se verificou uma distribuição relativamente homogênea das amostras analisadas, à exceção das amostras do EM1, como esperado, uma vez que naturalmente terá uma diversidade inferior às do solo.

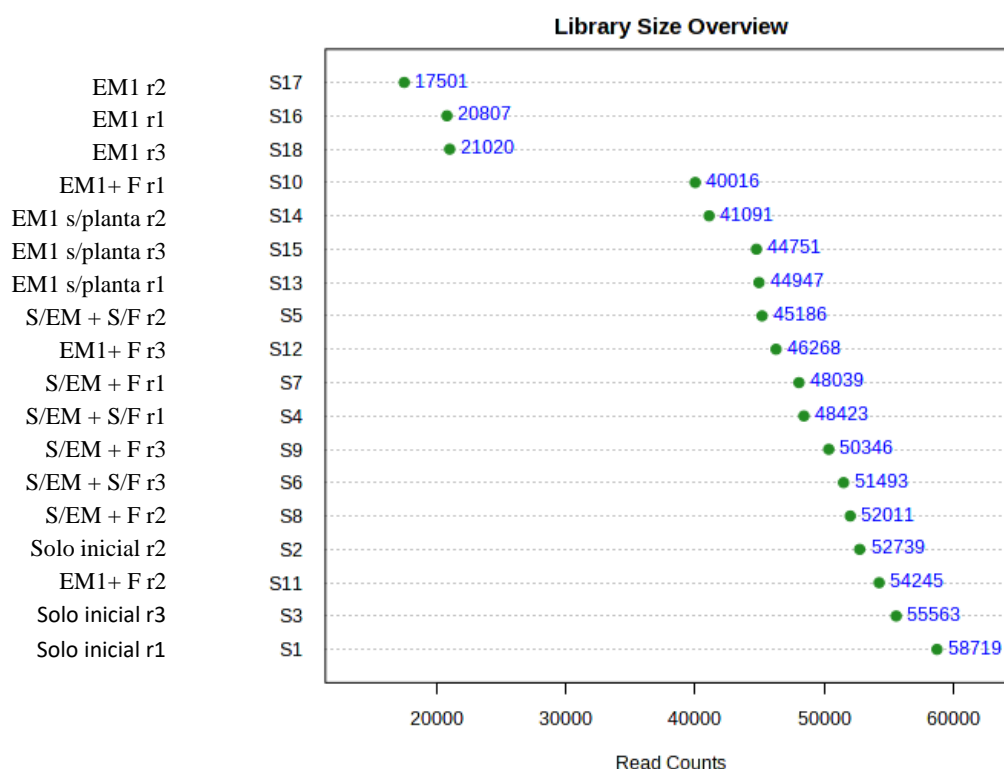


Figura 3.6 - Distribuição do número de sequências obtidas nas amostras de solo inicial (S1, S2, S3) e de EM1 (S16, S17, S18), e para os tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica - S/EM+S/F (4, 5, 6); sem EM1 e com fertilização orgânica - S/EM+/F (7, 8, 9); com EM1 e com fertilização orgânica - EM1+F (10,11,12), e com EM1 e sem planta -EM1 s/planta (13,14,15). A amostra de solo inicial foi colhida antes da plantação das alfaces (28/04/22) e as restantes no fim do ensaio (32 DAP).

As curvas de rarefação mostram o número de sequências em função do número de sequências novas e demonstram que o processo de sequenciação foi suficiente para descrever todas as amostras, uma vez que se atingiu um *plateau* indicando a inclusão de todas as sequências em cada amostra (Fig. 3.7) (Peixoto et al., 2021 e 2022). Apesar do menor número de sequências nas amostras do EM1, o sucesso da sequenciação foi também obtido.

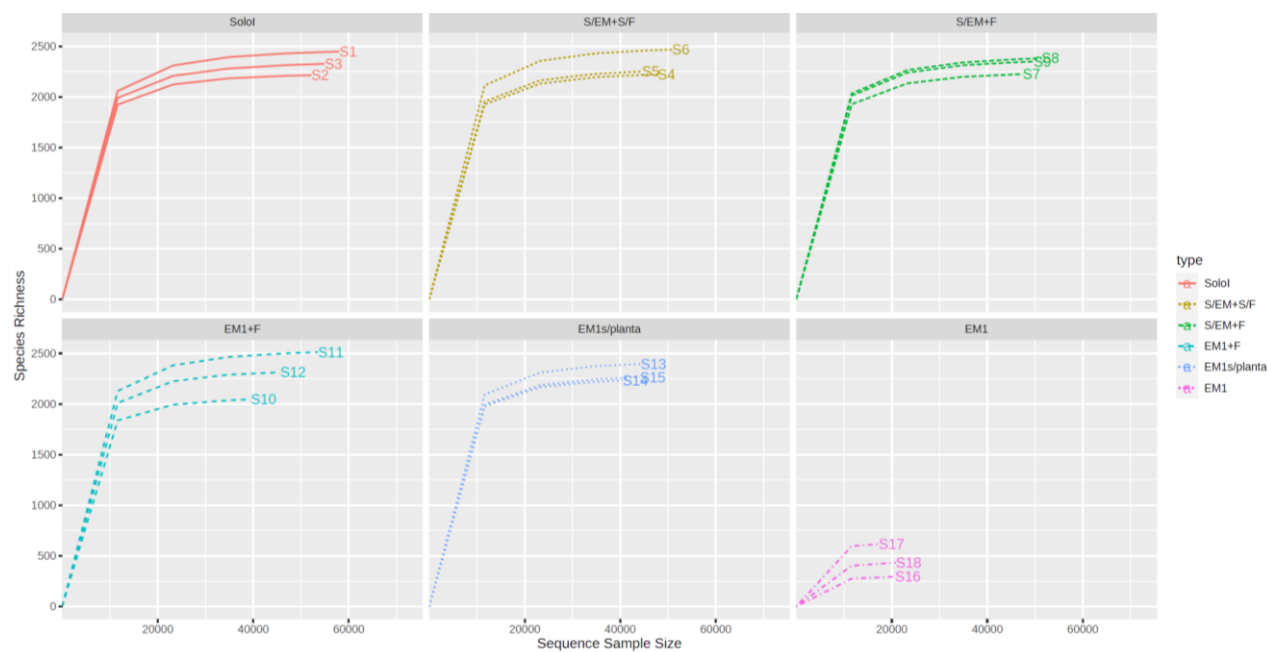


Figura 3.7 - Curvas de rarefação das amostras de solo inicial e (S1, S2, S3) e de EM1 (S16, S17, S18), e para os tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica - S/EM+S/F (4, 5, 6); sem EM1 e com fertilização orgânica - S/EM+/F (7, 8, 9); com EM1 e com fertilização orgânica - EM1+F (10,11,12), e com EM1 e sem planta -EM1 s/planta (13,14,15). A amostra de solo inicial foi colhida antes da plantação das alfaces (28/04/22) e as restantes no fim do ensaio (32 DAP).

3.4.2. Composição taxonómica das comunidades do solo e de EM1

A estrutura das comunidades microbianas do solo inicial e dos tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F; sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+/F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F, e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta) foram analisadas pela sequenciação da região V3-V4 do 16S rDNA. Os resultados indicam diferenças na composição taxonómica do microbioma dos solos com e sem EM1 (Figuras 3.8, 3.11 e 3.13).

Os 10 Filos mais abundantes estão representados na Figura 3.8 e as restantes sequências são agrupadas na categoria *Others*. Os quatro mais abundantes são Acidobacteria (Solo inicial: 26,52%; S/EM+S/F: 23,55%; S/EM+/F: 25,64%; EM1+F: 24,19% e EM1 s/planta: 20,05%), Proteobacteria (Solo inicial: 19,25%; S/EM+S/F: 21,74%; S/EM+/F: 24,04%; EM1+F: 26,25 % e EM1 s/planta: 23,87 %), Actinobacteria (Solo inicial: 16,98%; S/EM+S/F: 18,36%; S/EM+/F:18,94%; EM1+F: 15,33% e EM1 s/planta: 21,13%) e Chloroflexi. Figuram ainda Firmicutes, Verrucomicrobiota, Gemmatimonadota, Myxococcota, Bacteroidota e MethyloMirabilota com menor abundância relativa.

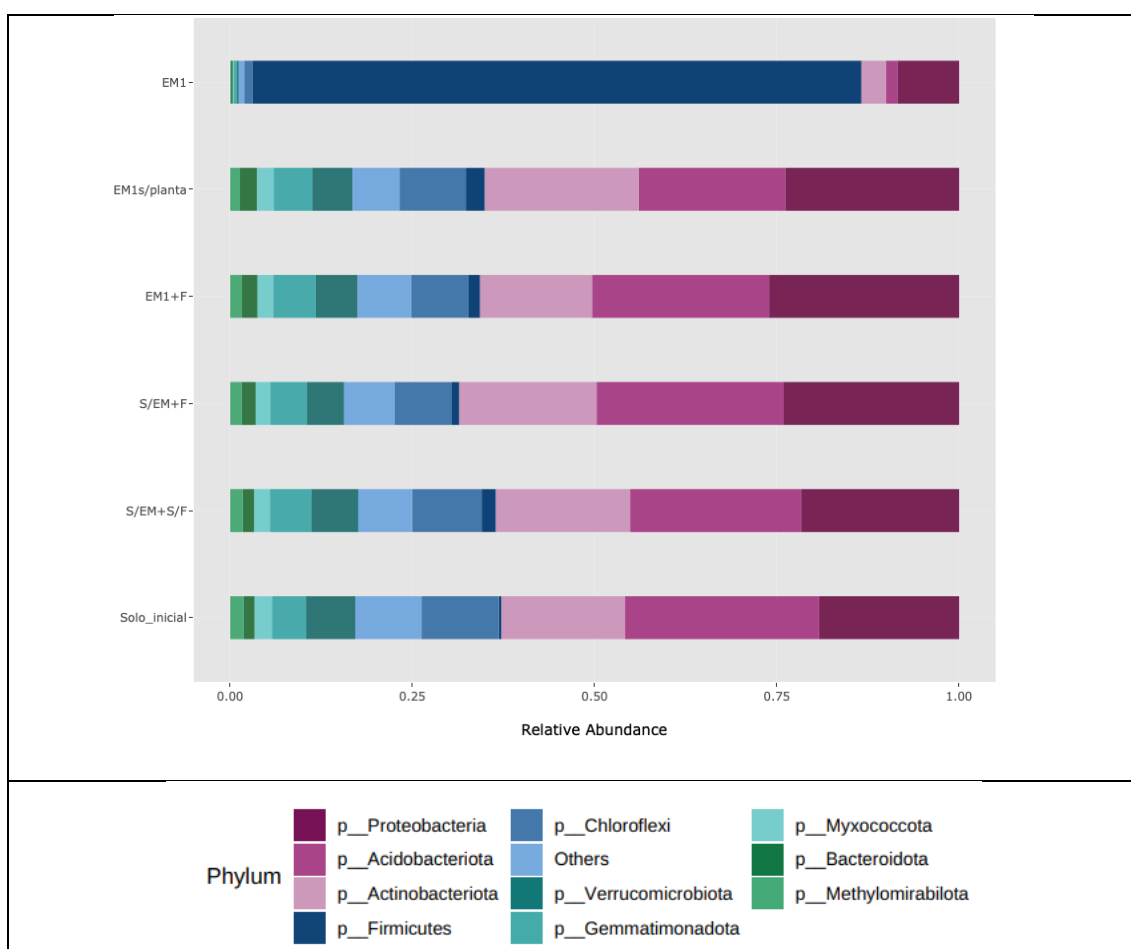


Figura 3.8 - Abundância relativa a nível do Filo. Valor médio para cada tratamento: solo inicial, tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+/F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta). Dado que uma grande parte das leituras pertenciam a Filos não-dominantes, uma categoria designada *Others* foi incluída para maior clareza.

O efeito do enriquecimento do solo com EM1 e com fertilizante nas comunidades ao nível do Filo, e ainda o efeito ao longo do tempo, apresentam-se no Quadro 3.2 e Figura 3.9. A aplicação de EM1 não alterou significativamente a abundância relativa dos Filos (Fig. 3.9 b). Por outro lado, o efeito do fertilizante (s/EM+s/F vs s/EM+F) apenas aumentou significativamente a abundância de Chloroflexi (Fig. 3.9 d).

No final do ensaio de primavera, onde a colheita de alfaces ocorreu 32 DAP, as abundâncias relativas foram significativamente superiores apenas para Acidobacteria, Chloroflexi e Firmicutes (Fig. 3.9 a), indicando uma alteração das comunidades ao do longo do tempo (Solo inicial vs s/EM+s/F).

A comparação dos tratamentos EM+F vs EM+F s/planta, mostra que a abundância relativa dos Filos Actinobacteria e Chloroflexi aumentaram na ausência da planta de alface (Fig. 3.9 d, e todos os restantes Filos não foram alterados na presença ou ausência da planta.

Quadro 3.2 - Composição da comunidade do EM1 e do solo a nível taxonómico do Filo (%), no início e no final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com o EM EMRO (EM1+F); sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta). Letras diferentes em cada linha (excluindo a primeira coluna EM), representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$).

	EM1	Solo Inicial	EM0sF	EM0+F	EM1+F	EM1+F s planta
Acidobacteriota	1,59	26,52 a	23,55 b	25,64 bc	24,19 bc	20,05 c
Proteobacteria	8,45	19,25 c	21,74 bc	24,04 ab	26,25 a	23,87 ab
Actinobacteriota	3,35	16,98 ab	18,36 ab	18,94 ab	15,33 b	21,13 a
Chloroflexi	1,11	10,59 a	9,53 b	7,87 c	7,93 c	9,07 b
Others	0,74	9,04 a	7,40 b	6,88 b	7,34 b	6,47 b
Verrucomicrobiota	0,25	6,85 a	6,31 a	5,09 a	5,55 a	5,54 a
Gemmatimonadota	0,44	4,69 b	5,69 ab	4,99 ab	5,83 a	5,27 ab
Myxococcota	0,11	2,37 a	2,16 a	2,04 a	2,16 a	2,28 a
Bacteroidota	0,26	1,47 c	1,59 bc	1,91 abc	2,16 ab	2,35 a
Methylomirabilota	0,11	1,86 a	1,73 ab	1,58 ab	1,64 ab	1,34 b
Firmicutes	83,58	0,39 c	1,93 ab	1,04 bc	1,61 abc	2,65 a

O microbioma do EM1 é claramente distinto do microbioma dos solos, predominando o Filo Firmicutes (83,58%) seguido de Proteobacteria com 8,45%, (Quadro 3.2 e Figura 3.8). Estes dois filios do EM1 que também existiam no solo inicial, não foram alterados pela aplicação do EM1 ou do fertilizante orgânico.

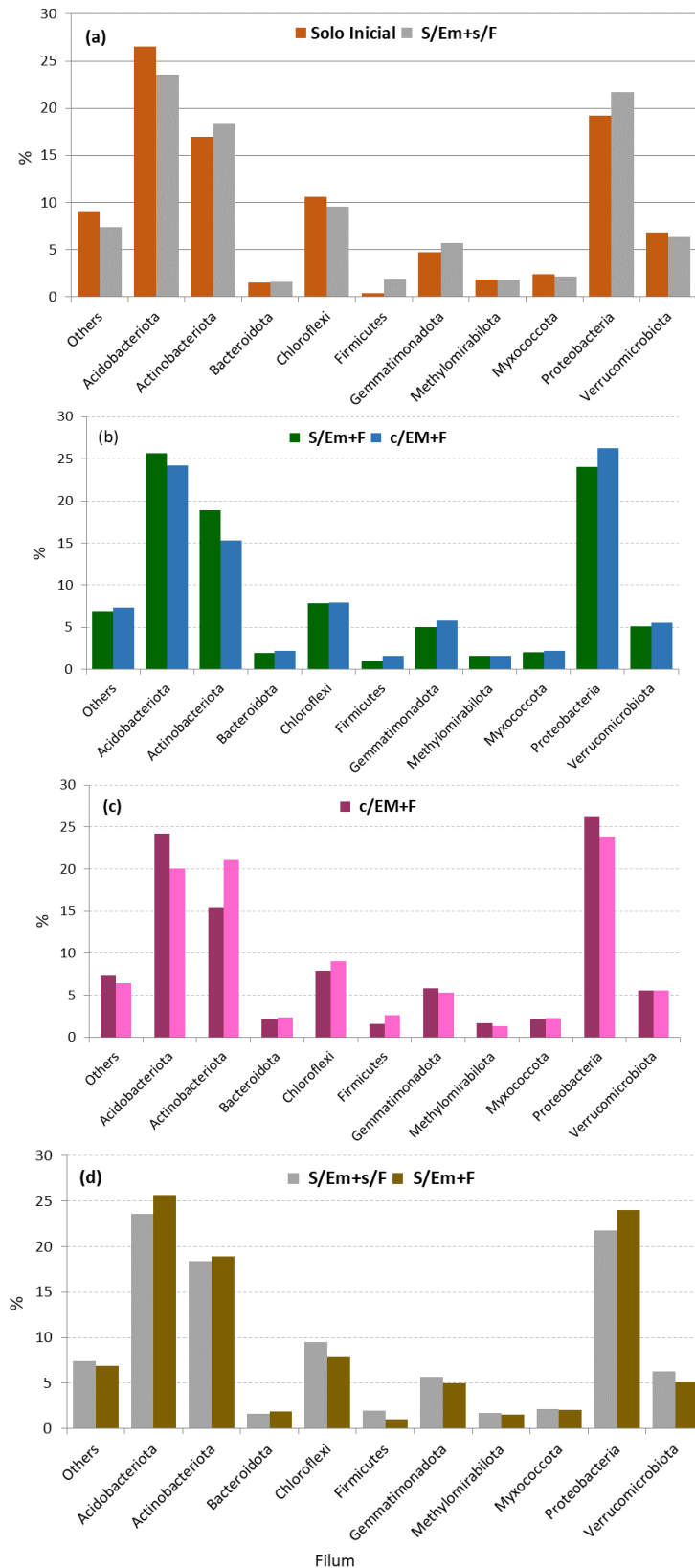


Figura 3.9 - Composição da comunidade do solo a nível taxonómico do filo (%), no início e no final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com o EM EMRO (EM1+F); sem EM (s/EM+F); sem EM e sem F (s/EM+s/F), e com EM1+F sem planta (EM1+F s/Planta). **(a)**: Efeito ao longo do tempo; **(b)**: Efeito da aplicação de EM1; **(c)**: Efeito da planta; **(d)**: Efeito da aplicação de Fertilizante.

Nos níveis taxonômicos da Família e do Género estão representados os 30 mais abundantes, nas Figuras 3.10 e 3.11 respectivamente. As restantes sequências, minoritárias, foram também agrupadas na categoria *Others*.

Quando não existe uma descrição formal da Família ou do Género, as sequências foram agrupadas como *Uncultured*. Quando se indicam com letras, estas seguem a nomenclatura da base de dados SILVA 138 *Database* (Quast et al., 2013), onde as sequências depositadas são confirmadas [ex. rb41 (família)] (Peixoto et al., 2021 e 2022).

Os resultados obtidos mostram que ao nível da Família e do Género observou-se em todas as amostras de solo um elevado número de sequências bacterianas *não cultiváveis* ou que foram incluídas em *outras* Famílias ou Géneros por serem minoritárias (Fig. 3.10 e 3.11).

As Famílias mais representativas em todas as amostras de solo com e sem EM1 eram Nitrosomonadaceae, Gemmatimonadaceae, Chthoniobacteraceae e Xanthobacteraceae, enquanto no EM1 a principal Família era a Lactobacillaceae (Quadro 3.3 e Figura 3.10).

A Família Lactobacillaceae e o Género *Lactobacillus* que não existiam no solo inicial e eram predominantes no EM1, embora com baixa representatividade no microbioma dos solos, tem um valor mais elevado nas amostras do tratamento S/EM+s/F com planta e do tratamento c/EM1+F s/ planta (Quadro 3.3 e 3.4).

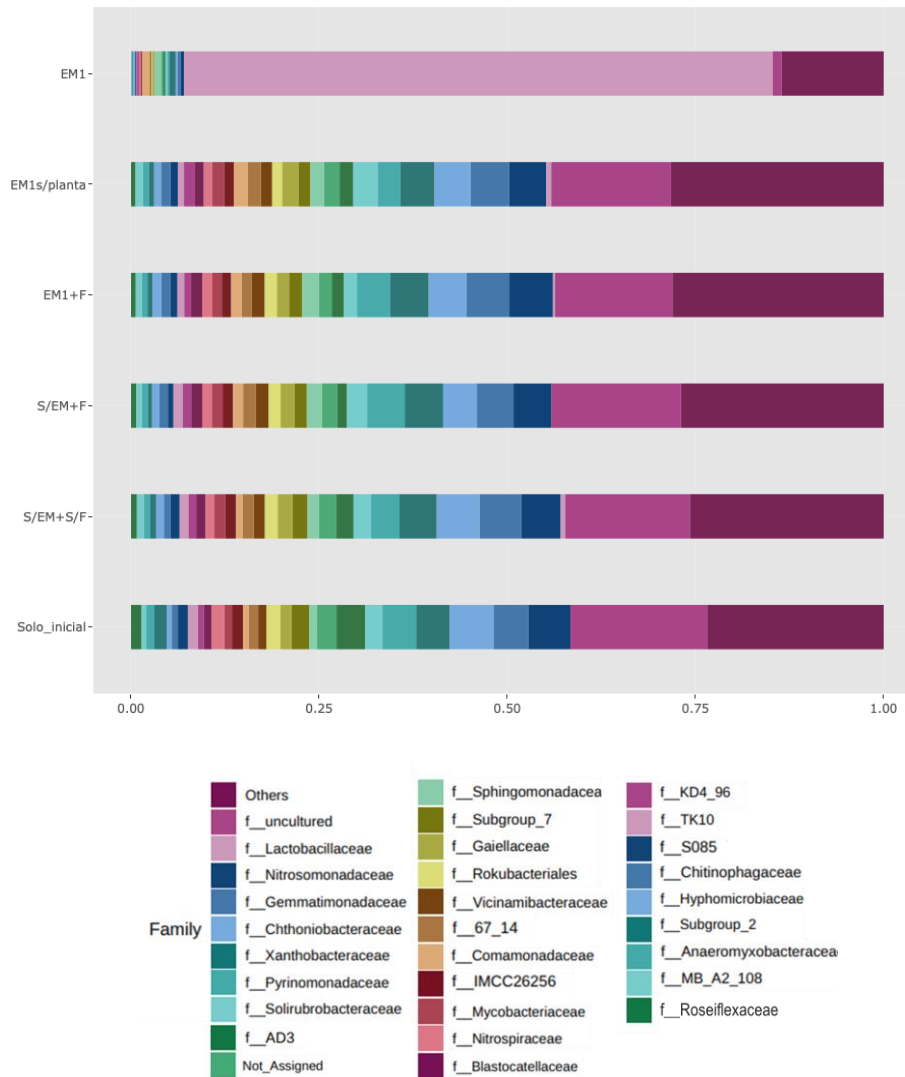


Figura 3.10 - Abundância relativa a nível de Família. Valor médio nas amostras de solos (solo inicial, tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+/F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta). Dado que uma grande parte das leituras pertenciam a Famílias não-dominantes, uma categoria designada *Others* foi incluída para maior clareza.

Quadro 3.3 - Composição da comunidade do solo a nível taxonómico da Família (%), no início e no final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com o EM EMRO (EM1+F); sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F s Planta). Letras diferentes em cada linha (excluindo a primeira coluna EM), representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$).

	EM1	Solo Inicial	EM0sF	EM0+F	EM1+F	EM1+F s planta
Others	13,55	23,45 a	25,81 a	26,91 a	28,32 a	28,36 a
uncultured	1,18	18,14 a	16,54 ab	17,25 ab	15,52 b	15,88 ab
Nitrosomonadaceae	0,45	5,57 a	5,27 a	5,00 a	5,79 a	4,90 a
Gemmatimonadaceae	0,43	4,65 b	5,60 ab	4,85 ab	5,71 a	5,12 ab
Chthoniobacteraceae	0,22	5,87 a	5,55 a	4,49 a	4,81 a	4,79 a
Xanthobacteraceae	0,84	4,49 a	4,97 a	5,11 a	5,10 a	4,57 a
Pyrinomonadaceae	0,23	4,46 ab	3,76 c	4,99 a	4,37 b	2,98 d
Solirubrobacteraceae	0,29	2,29 ab	2,32 ab	2,70 ab	1,76 b	3,23 a
AD3	0,31	3,80 a	2,34 b	1,31 c	1,62 c	1,80 cb
Not_Assigned	0,21	2,63 a	2,27 ab	1,98 b	1,71 b	2,07 ab
Subgroup_7	0,07	2,32 a	2,01 ab	1,63 b	1,77 b	1,58 b
Gaiellaceae	0,27	1,49 c	1,95 ab	1,85 cb	1,62 cb	2,16 a
Sphingomonadaceae	0,89	1,04 c	1,51 b	2,04 a	2,20 a	1,83 ab
Rokubacteriales	0,11	1,81 a	1,71 ab	1,58 ab	1,62 ab	1,31 b
Vicinamibacteraceae	0,11	1,10 b	1,48 ab	1,73 a	1,76 a	1,50 ab
67_14	0,12	1,30 a	1,50 a	1,68	1,30 a	1,71 a
IMCC26256	0,12	1,46 a	1,38 a	1,37 a	1,23 a	1,29 a
Mycobacteriaceae	0,13	1,00 b	1,45 a	1,46 a	1,23 ab	1,56 a
Nitrospiraceae	0,22	1,73 a	1,18 b	1,26 b	1,32 b	1,12 b
Blastocatellaceae	0,13	0,99 b	1,24 ab	1,45 a	1,49 a	1,25 ab
Comamonadaceae	0,97	0,75 d	0,89 cd	1,33 bc	1,42 ab	1,89 a
TK10	0,05	1,31 a	1,17 a	1,23 a	0,89 b	0,81 b
KD4_96	0,20	0,82 d	1,04 bc	1,15 b	0,93 cd	1,38 a
Chitinophagaceae	0,03	0,81 c	0,87 bc	1,11 ab	1,23 a	1,26 a
S085	0,16	1,33 a	1,23 ab	0,74 c	0,94 c	0,99 bc
Hyphomicrobiaceae	0,20	0,68 b	1,01 a	0,98 a	1,18 a	0,91 ab
Subgroup_2	0,11	1,64 a	0,81 b	0,57 b	0,67 b	0,66 b
Anaeromyxobacteraceae	0,05	1,05 a	0,86 b	0,78 b	0,74 b	0,82 b
Roseiflexaceae	0,05	0,64 b	0,91 ab	0,76 ab	0,83 ab	1,00 a
MB_A2_108	0,06	1,41 a	0,78 b	0,70 b	0,62 b	0,60 b
Lactobacillaceae	78,25	0,00 b	0,61 a	0,00 b	0,28 ab	0,69 a

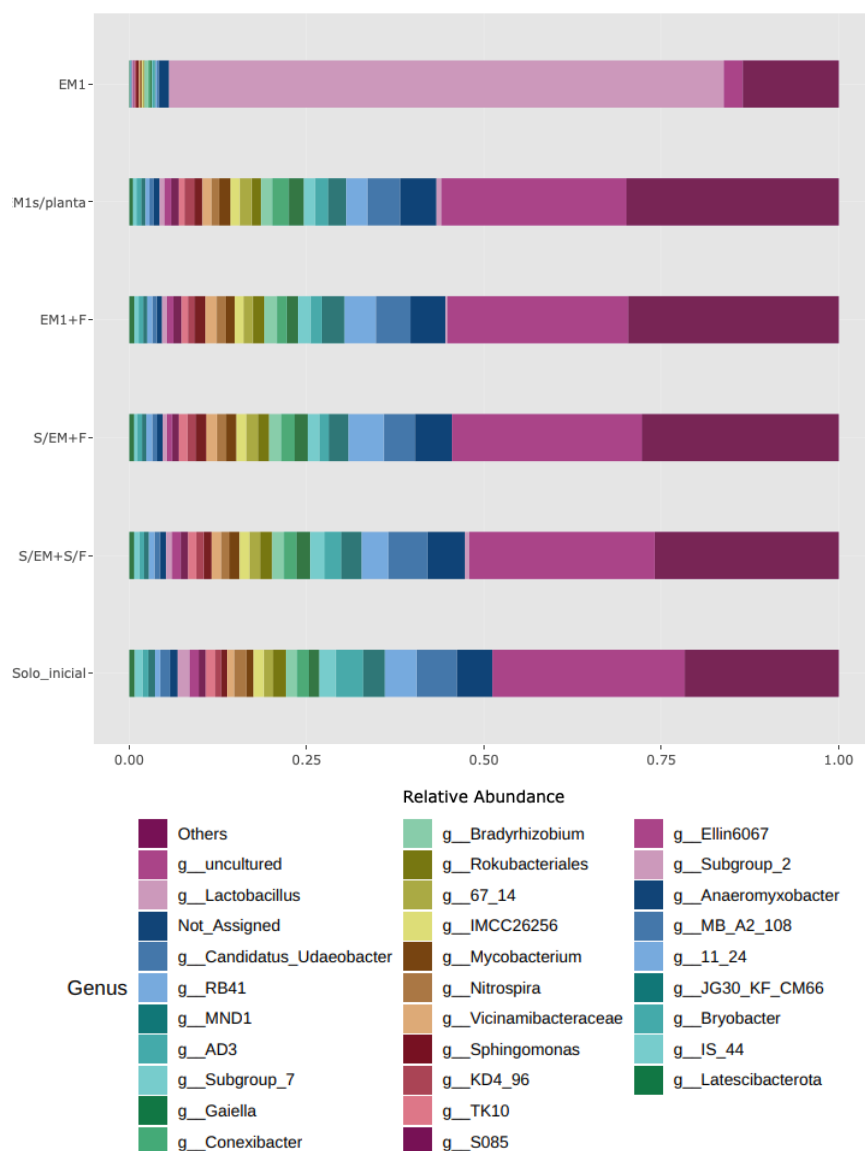


Figura 3.11 - Abundância relativa a nível de Gênero. Valor médio nas amostras de solos (solo inicial, tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta). Dado que uma grande parte das leituras pertencentes a gêneros não-dominantes, uma categoria designada *Others*.

No solo inicial e nos solos com aplicação de EM, de fertilizante e no tratamento sem planta, os Gêneros dominantes são *Candidatus_Udaeobacter*, *RB41*, *MND1*, *AD3*, entre outros com percentagens mais reduzidas (Quadro 3.4, Fig. 3.11). Salienta-se que nas amostras do solo inicial não foi detetado o Gênero *Lactobacillus*, que predominou na composição do EM1 (78,25%).

O efeito do fertilizante (s/EM+s/F vs s/EM+F) aumentou a abundância relativa do Gênero *RB4*, tendo diminuído a abundância relativa do género *AD3* (Quadro 3.4).

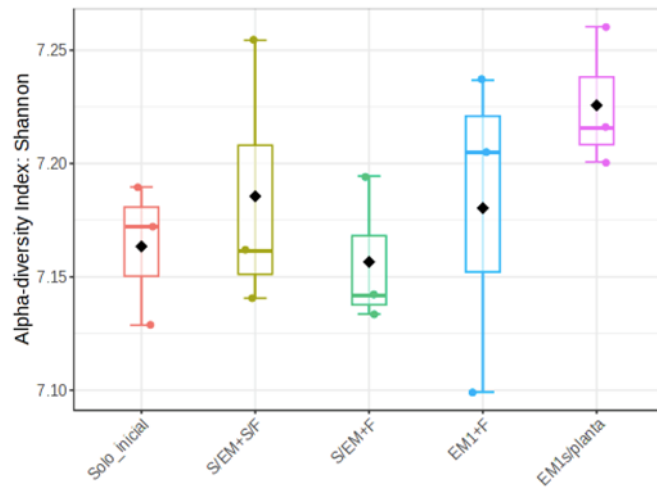
Quadro 3.4 - Composição da comunidade do solo a nível taxonómico do Género (%), no início e no final do segundo ensaio de vasos, para os tratamentos com fertilização orgânica (Monterra, F) e com o EM EMRO (EM1+F); sem EM (EM0+F); sem EM e sem F (EM0 sF), e com EM1+F sem planta (EM1+F sPlanta). Letras diferentes em cada linha (excluindo a primeira coluna EM), representam valores significativamente diferentes entre tratamentos ($p < 0,05$).

Género	EM1	Solo Inicial	EM0sF	EM0+F	EM1+F	EM1+F s planta
<i>Others</i>	13,53	21,73 b	26,00 ab	27,73 a	30,01 a	30,02 a
<i>uncultured</i>	2,64	27,08 a	26,15 a	26,78 a	25,37 a	26,08 a
<i>Not_Assigned</i>	1,43	5,03 a	5,25 a	5,21 a	4,95 a	5,11 a
<i>Candidatus_Udaeobacter</i>	0,22	5,72 a	5,43 a	4,38 a	4,71 a	4,60 a
<i>RB41</i>	0,23	4,46 ab	3,76 c	4,99 a	4,37 b	2,98 d
<i>MND1</i>	0,15	3,09 a	2,95 a	2,78 a	3,20 a	2,58 a
<i>AD3</i>	0,31	3,80 a	2,34 b	1,31 c	1,62 c	1,80 bc
<i>Subgroup_7</i>	0,07	2,32 a	2,01 ab	1,63 b	1,77 b	1,58 b
<i>Gaiella</i>	0,27	1,49 c	1,95 ab	1,85 abc	1,62 bc	2,16 a
<i>Conexibacter</i>	0,25	1,66 ab	1,72 ab	1,95 ab	1,38 b	2,30 a
<i>Bradyrhizobium</i>	0,51	1,57 a	1,67 a	1,67 a	1,73 a	1,57 a
<i>Rokubacteriales</i>	0,11	1,81 a	1,71 ab	1,58 ab	1,62 ab	1,31 b
<i>67_14</i>	0,12	1,30 a	1,50 a	1,68 a	1,30 a	1,71 a
<i>IMCC26256</i>	0,12	1,46 a	1,38 a	1,37 a	1,23 a	1,29 a
<i>Mycobacterium</i>	0,13	1,00 b	1,45 a	1,46 a	1,23 ab	1,56 a
<i>Vicinamibacteraceae</i>	0,11	0,99 b	1,33 ab	1,53 a	1,54 a	1,25 ab
<i>Nitrospira</i>	0,22	1,73 a	1,18 b	1,26 b	1,32 b	1,12 b
<i>Sphingomonas</i>	0,33	0,86 c	1,10 bc	1,49 ab	1,53 a	1,13 abc
<i>TK10</i>	0,05	1,31 a	1,17 a	1,23 a	0,89 b	0,81 b
<i>KD4_96</i>	0,20	0,82 d	1,04 bc	1,15 b	0,93 cd	1,38 a
<i>Ellin6067</i>	0,14	1,00 a	1,08 a	0,95 a	1,16 a	1,07 a
<i>S085</i>	0,16	1,33 a	1,23 ab	0,74 c	0,94 c	0,99 bc
<i>Subgroup_2</i>	0,11	1,64 a	0,81 b	0,57 b	0,67 b	0,66 b
<i>Anaeromyxobacter</i>	0,05	1,05 a	0,86 b	0,78 b	0,74 b	0,82 b
<i>MB_A2_108</i>	0,06	1,41 a	0,78 b	0,70 b	0,62 b	0,60 b
<i>11_24</i>	0,04	0,74 ab	0,78 ab	0,83 a	0,71 ab	0,55 b
<i>JG30_KF_CM66</i>	0,07	0,95 a	0,69 b	0,61 b	0,57 b	0,63 b
<i>Latescibacterota</i>	0,00	1,12 a	0,74 b	0,41 c	0,63 bc	0,51 bc
<i>Bryobacter</i>	0,05	0,77 a	0,67 b	0,70 ab	0,63 b	0,63 b
<i>IS_44</i>	0,07	0,77 a	0,68 a	0,67 a	0,70 a	0,52 b
<i>Lactobacillus</i>	78,25	0,00 b	0,61 a	0,00 b	0,28 ab	0,69 a

3.4.3. Diversidade e estrutura do microbioma do solo e do EM1

Os valores da diversidade α das comunidades microbianas nas amostras de solo e no EM1, avaliada pelo índice de Shannon e pela riqueza (estima o número de taxa diferentes), apresentam-se na Figura 3.12. A análise revelou que a aplicação de EM1 ou fertilizante, bem como a ausência da planta de alface, não afetaram significativamente a riqueza e o índice de Shannon das diferentes amostras de solo. A diversidade nas amostras de solo foi alta e semelhante entre os diferentes tratamentos (solo inicial: $7,146 \pm 0,031$; S/EM+S/F: $7,167 \pm 0,062$; S/EM+/F: $7,137 \pm 0,034$; EM1+F: $7,161 \pm 0,072$; EM1 s/planta: $7,206 \pm 0,031$) e foi significativamente superior à diversidade observada nas amostras do EM1 ($3,485 \pm 0,089$ (Fig. 3.12).

Índice – Shannon



Riqueza

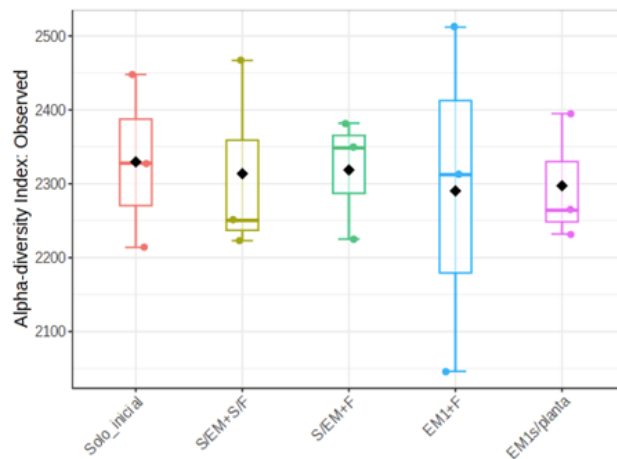


Figura 3.12 - Boxplot de métricas de diversidade alfa: índice de Shannon e riqueza para o solo inicial e para os tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+/F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F), e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta).

Em termos de diversidade β , as comunidades microbianas do solo inicial e das amostras dos solos finais, com ou sem aplicação de EM1, com ou sem fertilização e sem a presença da planta de alface, encontram-se nas Figuras 3.13 e 3.14. A análise de componentes principais (PCoA) das comunidades microbianas do solo dos diferentes tratamentos, mostra a sua separação, existindo diferenças significativas (Fig. 3.13): a composição da comunidade do solo inicial está claramente separada ao longo do eixo 1 (PCoA1), que explica 23,6% da variação. Esta é, no entanto, uma análise que compara todos os grupos e basta dois deles serem diferentes, para o valor ser significativo. Provavelmente esta diferença significativa resulta da diferença entre as amostras de solo inicial e as restantes. Desta análise foram removidas as amostras de EM1, por não serem comparáveis os microbiomas do EM1 e do solo.

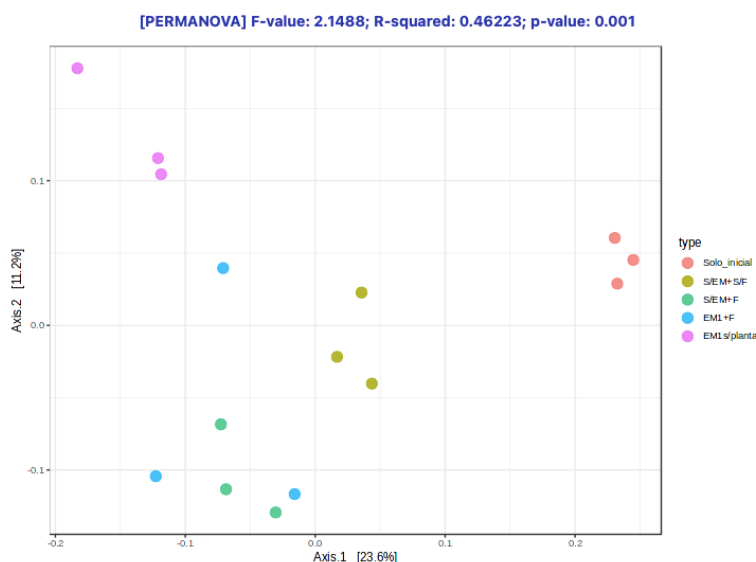


Figura 3.13 - Análise de diversidade beta: alterações estruturais no microbioma do solo inicial, e para os tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+/F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta), representadas na análise de coordenadas principais (PCoA) mapeando cada amostra usando o índice Bray-Curtis. Resultados de três repetições ($n = 3$) são apresentados para o solo inicial e para o solo de cada tratamento. A amostra de solo inicial foi colhida antes da plantação das alfaces (28/04/22) e as restantes no final do ensaio (32 DAP).

Quando se procedeu à análise de Clustering (grupos) utilizando igualmente o índice de Bray-Curtis para cálculo de dissimilaridade e o método de Ward para construção do dendrograma (Peixoto et al., 2021 e 2022), observa-se em geral a mesma tendência do PCoA: as comunidades das amostras de solo inicial distinguem-se claramente das restantes,

e os restantes grupos são muito próximos (Fig. 3.14). Para um valor de similaridade de 50% obtêm-se 3 clusters: o III que agrupa as amostras do solo inicial (sem planta) colhidas antes da plantação das alfaces, o II agrupa as 3 amostras de solo com EM1 sem planta, e uma amostra do tratamento EM1+F (S12), e finalmente no I agrupa as restantes amostras dos tratamentos (com e sem EM1 e, com ou sem fertilizante). Para um valor de similaridade de cerca de 46% as 3 amostras do solo inicial aparecem isoladas com uma elevada similaridade entre si (70 %), e as restantes amostras colhidas no final do ensaio, aquando da colheita da alface (32 DAP), formam um cluster único evidenciando a sua semelhança, e mostrando ainda que a aplicação de EM1 ou de fertilizante mantém a estrutura das comunidades a níveis próximos da dos solos sem EM1 e sem fertilizante orgânico (Fig. 3.14).

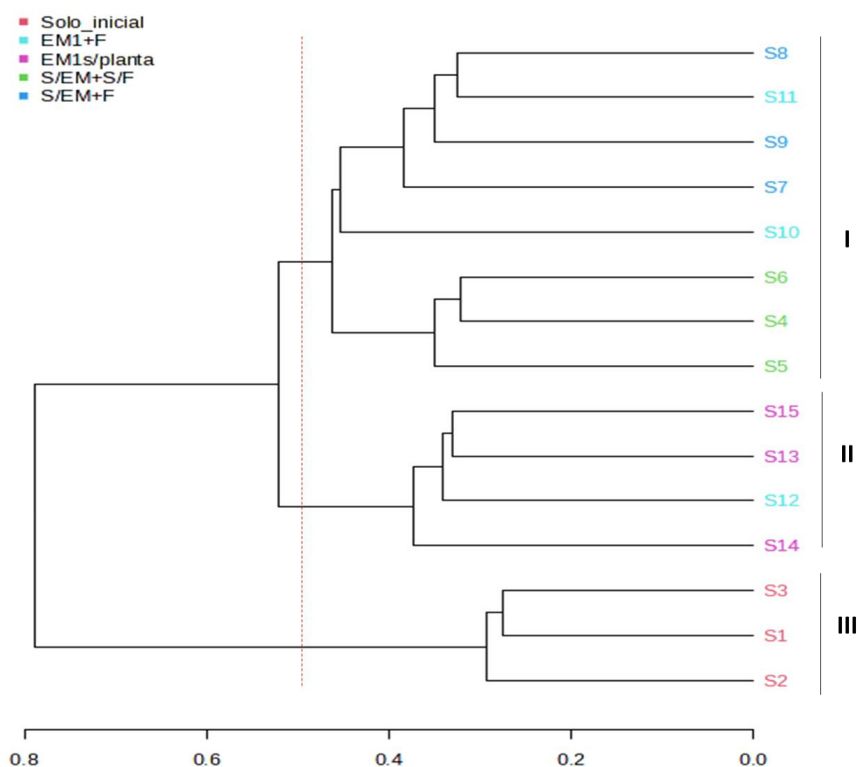


Figura 3.14 - 8. Análise de diversidade beta: Alterações estruturais no microbioma do solo inicial e nos tratamentos sem EM1 e sem fertilização orgânica (S/EM+S/F); sem EM1 e com fertilização orgânica (S/EM+/F); com EM1 e com fertilização orgânica (EM1+F) e com EM1 e sem planta (EM1 s/planta), representadas na análise de agrupamento (Cluster) para cada amostra usando o índice de Bray-Curtis para cálculo de dissimilaridade e o método de Ward para construção do dendrograma. Resultados de três repetições (n = 3) são apresentados para o solo inicial e para as amostras de solo de cada tratamento. A amostra de solo inicial foi colhida antes da plantação das alfaces (28/04/22) e as restantes no fim do ensaio (32 DAP).

4. Discussão

4.1. Crescimento da alface com e sem aplicação de EM

O crescimento das alfaces no primeiro ensaio no final do inverno, foi muito afetado pelo baixo nível de fertilidade do solo e eventualmente pela presença de NGR. O menor teor em MO do solo em que não se aplicou o fertilizante Monterra, poderá ter contribuído para um aumento dos sintomas da doença na planta, eventualmente devido a um menor número de microrganismos na rizosfera capazes de exercer competição com a atividade dos NGR. Apesar da utilização de EM não ter contribuído para a diminuição de NGR, o crescimento das alfaces foi superior com a aplicação do EM3 em comparação com o EM2, indicando que, ou o EM3 contribuiu para uma maior tolerância das plantas à doença, ou o EM2 não permitiu a disponibilidade de nutrientes necessários às plantas. Também na província do Cabo na África do Sul, a aplicação de EM na cultura protegida de tomate, teve um efeito negativo na produtividade da cultura, que poderá ser atribuído à imobilização de azoto pelos EM que podem ter resultado na menor disponibilidade de nutrientes, particularmente azoto, para as plantas (Lindani e Brutsch, 2012).

No segundo ensaio na primavera, não houve um aumento de produtividade das alfaces diretamente relacionado com a aplicação de EM através da água de rega, sendo a fertilização orgânica a responsável pelo aumento do peso das plantas. Estudos conduzidos por Córdor-Golec et al. (2007) na Holanda, referem o reduzido impacto da aplicação de EM ao solo, principalmente porque a quantidade de microrganismos adicionados pela solução de EM é insignificante em comparação com a quantidade de microrganismos existente no solo e, em acréscimo, a adição de EM irá conduzir para um rápido restabelecimento do equilíbrio inicial (Córdor-Golec et al., 2007). Em regiões tropicais, a aplicação de EM tem mostrado efeitos positivos, aparentemente, devido à menor quantidade de microrganismos no solo (Córdor-Golec et al., 2007). Por exemplo, a aplicação semanal de biofertilizante de EM produzidos localmente, em duas culturas consecutivas de alface icebergue biológica (cv. Lucy Brown), em estufa, resultaram em aumentos de produtividade, no Brasil em clima equatorial húmido seco no inverno, em comparação com a aplicação semanal de fertilizante mineral NPK 30-10-10 (Sousa et al., 2020).

Ensaio realizados durante 4 anos com aplicação de EM, no clima temperado da Suíça (Mayer et al., 2010), referiram que a aplicação de EM não melhorou a produtividade das

culturas, nem a qualidade do solo, e os reduzidos efeitos encontrados não foram causados pela aplicação de EM, mas sim pela maior disponibilidade de nutrientes devido à aplicação do fertilizante orgânico Bokashi (produzido por fermentação de farelo de trigo e melão de cana-de-açúcar, com EM). Os efeitos mais evidentes foram o aumento da biomassa microbiana do solo, da respiração do solo e da estrutura da comunidade microbiana, em comparação com o tratamento testemunha (Mayer et al., 2010). Resultados promissores foram reportados por Talaat (2019), na cultura de feijão, relacionados com o stresse salino que poderão ser mitigados com a aplicação na rega de EM.

4.2. Influência dos EM no microbioma do solo

A eficiência dos inoculantes microbianos (EM) depende das suas características e da capacidade dos microrganismos ultrapassarem a competição microbiana nativa e de se estabelecerem na rizosfera (Ambrosini et al. 2016). No presente estudo foi destacado que a aplicação de EM1, caracterizado por ter na sua composição 78,25% de bactérias do género *Lactobacillus*, não alterou significativamente a diversidade das comunidades microbianas dos solos que receberam este biopreparado, que foi idêntica à dos solos que não foram suplementados com EM1 ou com fertilizante. Os resultados da análise da diversidade α mostraram que após a aplicação do EM1 ou de fertilizante, a diversidade das comunidades manteve-se elevada, e não foi alterada durante todo o período de crescimento da alface.

A diversidade β avaliada através da análise de *clusters*, mostrou que a aplicação de EM1 ou de fertilizante mantém a estrutura das comunidades a níveis muito próximos da dos solos sem EM1 e sem fertilizante, ou mesmo do das amostras sem planta, sendo todos claramente distintos da estrutura da comunidade do solo inicial.

Durante muito tempo, assumiu-se que a composição e função da comunidade microbiana na rizosfera estão intimamente associadas aos padrões de exsudação radicular (Brimecombe et al., 2001) e que as mudanças na composição dos exsudados resultam em mudanças dramáticas na composição da comunidade microbiana do solo. Baudoin et al. (2002) nos trabalhos realizados sobre comunidades microbianas em raízes de milho, descrevem que o padrão de exsudação radicular são afetados pelo estágio de desenvolvimento e do crescimento das plantas, e por vários fatores bióticos e abióticos. Também (Badri e Vivanco 2008), relatam que as plantas influenciam o microbioma do solo na proximidade das raízes através dos exsudados e mucilagens produzidos.

Apesar de não terem sido realizados estudos sobre os exudados radiculares da alface nos solos suplementados com EM1 ou fertilizante, os resultados obtidos parecem contrariar o descrito pelos autores anteriormente referidos, pois não se observaram globalmente alterações na abundância relativa dos principais filos, famílias e gêneros identificados, em resposta à presença e ao crescimento da alface, e que foram idênticos aos do solo sem planta. Foi exceção a abundância relativa dos Filos Actinobacteria e Chloroflexi que aumentaram na ausência da planta de alface. Todas os restantes filos não sofreram alteração na presença ou ausência da planta. A Família Lactobacillaceae e o Género *Lactobacillus* que não existiam no solo inicial e eram predominantes no EM1, embora com baixa representatividade no microbioma dos solos, apresentaram um valor mais elevado nas amostras do tratamento sem EM1 e sem fertilizante com planta (s/EM1+s/F) e do tratamento com EM1 e fertilizante mas sem planta (c/EM1+F s/ planta). Aparentemente, os microrganismos das populações microbianas utilizaram da mesma forma os exsudados fornecidos pelas raízes de alface, ou que a sua composição e/ou a produção de moléculas específicas não terá promovido diferenças no padrão de utilização pelas diferentes comunidades microbianas, com ou sem planta.

Trabalhos de Iliev et al. (2021) mostraram que a fertilização convencional reduziu a diversidade de bactérias na rizosfera de alface produzida em estufa e recomendaram a fertilização com compostos bio-orgânicos porque estes podem aumentar a ocorrência de bactérias previamente conhecidas por terem capacidade de suprimir agentes fitopatogénicos. No presente trabalho utilizou-se o fertilizante orgânico Monterra, que não originou diferenças na diversidade e riqueza das comunidades microbianas dos diferentes tratamentos. Contudo o efeito do fertilizante (s/EM+s/F vs s/EM+F) aumentou significativamente a abundância relativa do filo Chloroflexi e do Género *RB4*, tendo diminuído a abundância relativa do género *AD3*.

5. Conclusões

A aplicação de EM nas condições do presente estudo não revelou vantagens significativas para o crescimento da alface, ao contrário dos corretivos orgânicos que contribuíram para diminuir os sintomas de *Meloidogyne* spp. no primeiro ensaio, com a plantação das alfaces realizada no final do inverno, e aumentar o crescimento da alface no segundo ensaio na primavera.

A análise taxonômica do microbioma dos solos mostrou que os quatro Filos mais abundantes são Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria e Chloroflexi. A aplicação de EM1 não alterou significativamente a abundância relativa dos Filos. As Famílias mais representativas em todas as amostras de solo com e sem EM1 são Nitrosomonadaceae, Gemmatimonadaceae, Chthoniobacteraceae e Xanthobacteraceae, enquanto no EM1 predominava a família Lactobacillaceae. No solo inicial e nos solos com aplicação de EM, de fertilizante e no tratamento sem planta, os Géneros dominantes são *Candidatus_Udaeobacter*, *RB41*, *MND1*, *AD3*.

Apesar do Género *Lactobacillus* ser dominante na composição de EM1, e estar ausente no solo inicial, a sua adição ao solo não aumentou significativamente a abundância relativa nos solos tratados, não tendo tido assim o efeito esperado. O microbioma do EM1 é distinto do microbioma dos solos, predominando o Filo Firmicutes (83,58%), a Família Lactobacillaceae (78,25%) e o Género *Lactobacillus* (78,25%).

A aplicação de EM1 não alterou a diversidade e riqueza das comunidades, que se mantiveram elevadas até ao final do ensaio na primavera. A diversidade β avaliada através da análise de *clusters*, mostrou que a aplicação de EM1 ou do fertilizante orgânico, mantém a estrutura das comunidades a níveis muito próximos da dos solos sem EM1 e sem fertilizante, ou mesmo do das amostras sem planta, sendo todos distintos da estrutura da comunidade do solo inicial.

Conclui-se que a aplicação de EM1, para além de não ter influenciado o crescimento das plantas, não influenciou significativamente a composição global das comunidades microbianas, nomeadamente, na diversidade e riqueza das comunidades do solo.

As tecnologias genómicas de sequenciação de nova geração (NGS) utilizadas permitiram caracterizar o microbioma do solo submetido a diferentes tratamentos. Novos estudos sobre aplicação de EM e caracterização do microbioma da planta e do solo devem ser realizados

para melhor compreensão dos resultados agora obtidos. A investigação contínua nesta área e o conhecimento obtido, poderá permitir isolar do microbioma novos microrganismos de relevância agrícola e projetar novos bioinoculantes, ou geri-los de acordo com as necessidades da cultura.

Referências bibliográficas

- Ambrosini A, de Souza R, Passaglia LMP. 2016. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity, *Plant Soil* 400, 193–207. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2727-7>.
- Badri DV, Vivanco JM. 2008. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 32:666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01926.x>.
- Baudoin E, Benizri E, Guckert A. 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Appl. Soil Ecol.* 19, 135–145. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00185-8](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00185-8).
- Bigot E, 2019. Mês micro-organismes efficaces (EM). L'Alternative Naturelle aux Produits Chimiques de Synthèse. Éditions Jouvence, Genève, Suisse.
- Brimecombe M, De Leij FA, Lynch JM. 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: *The Rhizosphere*, eds R. Pinton, Z. Varanini and P. Nannipieri (New York, NY: Marcel Dekker, Inc), 95-140.
- Cai F, Pang G, Miao Y, Li R, Shen Q, Chen W. 2016. The nutrient preference of plants influences their rhizosphere microbiome, *Agric., Ecosyst. Environ., Appl. Soil Ecol.* (2016) 4–8, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.006>.
- Callahan B, McMurdie P, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. 2016. *Nat Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7, 335–336 <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
- Cóndor-Golec AF, Lokare C, Gonzalez-Pérez P. 2007. Effective Microorganisms: Myth or reality?. *Revista peruana de biología* 14(2): 315-319. <https://doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1837>.
- DGPC. 2006. Família das asteráceas. Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. <https://doi.org/https://www.dgadr.gov.pt/mediateca/send/8-protacao-e-producao-integradas/67-producao-integrada-em-hortcolas-familia-das-asteraceas-alface>
- Elnahal ASM, El-Saadony MT, Saad AM, Desoky EM, Eltahan A, Rady M, AbuQamar S, El-Tarabily KA. 2022. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *Eur J Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7>
- Eren AM, Morrison HG, Lescault PJ, Reveillaud J, Vineis JH, Sogin ML. 2015. Minimum entropy decomposition: unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *ISME J.* 9 (4), 968–979. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.195>.
- Eurostat. 2023. Organic farming area in the EU up 46% since 2012. Acedido em 3 de abril de 2023, disponível em <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/ddn-20210127-1?redirect=%2Feurostat%2F>

- Eurostat. 2023. Developments in organic farming - Statistics Explained. Eurostat, Junho 2023, <https://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/>.
- Hartman K. 1982. Enhancement technique for egg masses of the root-knot nematode with phloxine B. In: Proc. Third Res. e Plann. Conf. on Root-knot Nematodes, Meloidogyne spp., Eds. C. C. Carter, International Meloidogyne Project, Lima, Peru, 22-26.
- Higa T, Parr J. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Center, Atami, Japão, 16 pp.
- Higa T, Wididana GN. 1991. Changes In the soil microflora Induced by effective microorganisms. p.153-162. In J.F. Parr, S.B. Hornick, and C.E. Whitman (ed.) Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.
- Iliev I, Apostolova E, Hadjieva N, Kostadinov K, Filipov S, Kostadinova S, Baev V, Gozmanova M. 2021. Bacterial diversity and physiological activity of lettuce (*Lactuca sativa*) rhizosphere under bio-organic greenhouse management strategies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 19, 9945–9956. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03831-z>.
- Jia M, Sun X, Chen M, Liu S, Zhou J and Peng X. 2022. Deciphering the microbial diversity associated with healthy and wilted *Paeonia suffruticosa* rhizosphere soil. *Front. Microbiol.* 13:967601. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.967601>.
- Joshi J, Somduttand, Choudhary P, Mundra SL. 2019. Role of Effective Microorganisms (EM) in Sustainable Agriculture *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(3): 172-181. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.024>.
- Kembel SW, Wu M, Eisen JA, Green JL (2012). Incorporating 16S Gene Copy Number Information Improves Estimates of Microbial Diversity and Abundance. *PLoS Comput Biol* 8(10): e1002743. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002743>.
- Knief C. 2014. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Front. Plant Sci.*, 5, 216: 1-23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00216>.
- Koskey G, Mburu SW, Awino R, Njeru EM, Maingi JM. 2021. Potential use of beneficial microorganisms for soil amelioration, phytopathogen biocontrol, and sustainable crop production in smallholder agroecosystems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 606308. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606308>.
- Kuzyakov Y, Razavi, BS. 2019. Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity. *Soil Biology and Biochemistry*, 135, 343-360. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.011>
- Labouyrie M, Ballabio C, Romero F, et al. 2023. Patterns in soil microbial diversity across Europe. *Nature Communications*, 14, 3311 <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37937-4>.

- Lindani N, Brusch MO. 2012. Effects of the integrated use of effective microorganisms, compost and mineral fertilizer on greenhouse grown tomato. *African Journal of Plant Science*, 6(3): 120-124. <https://doi.org/10.5897/AJPS11.249>.
- Lorch A. 2011. *Les Micro-organismes Efficaces au Quotidien - Au service de la terre, des animaux et des hommes*. Éditions Le Soufle D'Or, France.
- Manojlovic M, Cabilovski R, Bavec M. 2010. Organic materials: Sources of nitrogen in the organic production of lettuce. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34(2), 163–172. <https://doi.org/10.3906/tar-0905-11>
- Mayer J, Scheid S, Widmer F, Fließbach A, Oberholzer, H-R. 2010. How effective are 'Effective microorganisms® (EM)'? Results from a field study in temperate climate. *Applied Soil Ecology* 46 (2010) 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.08.007>.
- Maynard DN, Hochmuth GJ. 2007. *Knott's Handbook for Vegetable Growers*. 5th Ed., John Wiley & Sons, Inc., 621 p.
- ONU 2023. População mundial atinge 8 bilhões de pessoas. *ONU News Perspectiva Global Reportagens Humanas*. <https://news.un.org/pt/story/2022/11/1805342>.
- OFRF. 2020. Research Database. Organic Farming Research Foundation, disponível em: <https://grants.ofrf.org>
- Olle M, Williams IH. 2013. Effective microorganisms and their influence on vegetable production – a review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 88(4): 380-386. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512979>.
- Peixoto S, Henriques I, Loureiro S. 2021. Long-term effects of Cu(OH)₂ nanopesticide exposure on soil microbial communities. *Environmental Pollution*. 269. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116113>.
- Peixoto S, Loureiro S, Henriques I. 2022. The impact of silver sulfide nanoparticles and silver ions in soil microbiome. *Journal of Hazardous Materials*. 422. 126793. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126793>.
- Peter-Mau F. 2006. *EM – Microorganismos Efectivos. La solución ideal para el medio ambiente*. RBA Integral, Barcelona.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue): D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23193283; PMCID: PMC3531112.
- Shanmugam S, Hefner M, Willekens K, Trinchera A, Pirjo K, Koopmans C, Van Apeldoorn D, Lepse L, Barbry, J, Valero C, Kristensen, HL. 2021. Faba Bean: A Potential Intercrop In Organic Vegetable Production In A European Perspective? *Organic World Congress, 6th ISOFAR Conference*, 246.

- Sharma A, Saha TN, Arora A, Shah R, Nain L. 2017. Efficient Microorganism Compost Benefits Plant Growth and Improves Soil Health in Calendula and Marigold. *Horticultural Plant Journal*, 3 (2): 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.003>
- Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018 Apr;122(1): e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Sousa WS, Pontes JRV, Melo OFP. 2020. Microrganismos Eficientes no cultivo de alface. *Revista Agrogeoambiental*, 12(2), <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v12n220201456>
- Sundh I, Wilcks A, Goettel M (eds.). 2012. Beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment: safety assessment and regulation. CABI, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845938109.0000>
- Talaat NB. 2019. Effective microorganisms: An innovative tool for inducing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) salt-tolerance by regulating photosynthetic rate and endogenous phytohormones production. *Scientia Horticulturae*, Volume 250, 254-265. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.052>.
- Tebbe C, Liu B. 2020. Increasing awareness of soil microbial eco-system services. DiverIMPACTS project, EIP AGRI practice abstract, Instituto Thünen para a Biodiversidade, Alemanha. www.diverimpacts.net.
- Trinchera A, Willekens K, Barbry J, et al. 2021. SureVeg Belowground Biodiversity - Practice Abstract. SureVeg project, CORE Organic Cofund, CREA - Council for Agricultural Research and Economics, 3 p.
- UE. 2019. Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho Europeu, ao Conselho, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité das Regiões - Pacto Ecológico Europeu. Comissão Europeia, COM(2019) 640, 27 p.
- UE. 2020. Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho Europeu, ao Conselho, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité das Regiões - Estratégia do Prado ao Prato para um sistema alimentar justo, saudável e respeitador do ambiente. Comissão Europeia, COM(2020) 381, 22 p.
- Valarini PJ, Díaz-Alvarez MC, Gascó JM, Guerrero F, Tokeshi H. 2003. Assessment of soil properties by organic matter and em-microorganism incorporation. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:519-525. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000300013>
- Xu H. 2000. Effects of a microbial inoculant and organic fertilizers on the growth, photosynthesis and yield of sweet corn. *J. Crop Prod.* 3, 183–214. https://doi.org/10.1300/J144v03n01_16