



Influência da aplicação de rizobactérias e matéria orgânica na produção de alface em ar livre

Pedro Dias Gonçalves

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadora: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Júri:

Presidente: Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que forma direta ou indireta contribuíram e me ajudaram a na realização deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Mariana Mota, agradeço pela amizade, apoio e por toda a ajuda que sempre me disponibilizou. A sua alegria e o entusiasmo que transmitiu ao longo de todo o trabalho foram uma fonte de motivação.

Expresso também o meu agradecimento ao Bruno Neves, por toda a disponibilidade para a realização dos ensaios, utilização dos terrenos e pela confiança que depositou em mim. A sua curiosidade e vontade de saber sempre mais estimularam a minha procura por respostas.

À minha família, especialmente aos meus pais e ao meu irmão, deixo meu mais profundo agradecimento por todo o apoio, compreensão e paciência durante esta jornada.

Agradeço também aos meus amigos que tornaram este trabalho mais leve e alegre. Em especial ao Afonso Maximino pela ajuda na colheita das alfices.

RESUMO

O setor hortícola em Portugal possui grande importância económica, sendo a alface um dos principais hortícolas cultivados. A União Europeia apresenta metas ambiciosas para a redução da aplicação de produtos fitofarmacêuticos e de adubos de síntese até 2030, com o intuito de tornar a sua agricultura mais sustentável. Neste contexto, o presente estudo procurou avaliar os efeitos da aplicação de um complexo de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (*Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp.) e de um adubo orgânico azotado na produtividade da cultura da alface produzida em ar livre, bem como nas propriedades químicas e biológicas do solo.

O ensaio foi realizado em ar livre, numa exploração agrícola, durante duas plantações sucessivas. Definiram-se quatro modalidades experimentais, comparando a aplicação de rizobactérias e adubo orgânico de forma isolada e combinada e o controlo sem aplicação. Foram recolhidas amostras de solo ao longo das duas plantações para avaliação da atividade da enzima desidrogenase e para a realização de plaqueamento e posterior contagem de bactérias e fungos. Analisaram-se os principais indicadores químicos do solo para três das amostras recolhidas. Foram também colhidas e pesadas alfaces em cada uma das plantações para estimar a produtividade.

Os resultados indicaram que a aplicação isolada de adubo orgânico originou um aumento significativo de produtividade comparativamente à modalidade de controlo, em ambas as plantações. No primeiro ensaio, a produtividade foi de 57,1 t/ha, 9% superior ao controlo, e no segundo, 60,4 t/ha, 16% superior. Não se conseguiu estabelecer nenhum efeito das rizobactérias na produtividade da alface.

A atividade biológica do solo apresentou grandes variações ao longo do tempo e entre modalidades. O resultado mais evidente ocorreu no plaqueamento de bactérias, com 25 458 colónias contabilizadas ao longo de todo o ensaio na modalidade com adubo orgânico. Não se registou influência direta das rizobactérias.

PALAVRAS-CHAVE: Adubo orgânico azotado, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Lactuca sativa*, Produtividade.

ABSTRACT

The horticultural sector in Portugal holds significant economic importance, with lettuce being one of the most widely cultivated crops. The European Union has set ambitious targets to reduce the use of pesticides and synthetic fertilizers by 2030, aiming to make European agriculture more sustainable.

In this context the present study aims to evaluate the effects of applying a complex of plant growth-promoting rhizobacteria (*Azotobacter* spp. and *Azospirillum* spp.) and an organic nitrogen fertilizer on the productivity of lettuce crops grown in open field, as well as on the chemical and biological properties of the soil.

The trial was conducted under open field conditions on a commercial farm during two successive planting cycles. Four experimental treatments were established, comparing the isolated and combined application of rhizobacteria and organic fertilizer with a control group, without application. Soil samples were collected throughout both planting cycles to assess dehydrogenase enzyme activity and to perform plating and subsequent bacterial and fungal colony counts. The main soil chemical indicators were also analysed for three of the collected soil samples. Lettuce plants were harvested and weighed for each planting cycle to estimate productivity.

The results showed that the isolated application of organic fertilizer led to a significant increase in productivity compared to the control in both planting cycles. In the first trial, productivity reached 57.1 t/ha, 9% higher than the control, and in the second, 60.4 t/ha, 16% higher. No clear effect of rhizobacteria on lettuce productivity was established.

Soil biological activity exhibited considerable variation over time and between treatments. The most notable outcome was observed in bacterial plating, with 25,458 colonies counted throughout the trial in the organic fertilizer treatment. No direct influence of rhizobacteria was detected.

KEYWORDS: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Lactuca sativa*, Organic fertilizer, Productivity.

Índice

1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
2.1. Cultura da alface.....	2
2.1.1. Produção de alface no mundo.....	2
2.1.2. Produção de alface em Portugal	2
2.1.3. Zonas de produção de alface em Portugal	3
2.1.4. Comercialização	4
2.1.5. Descrição e origem.....	4
2.1.6. Sistemas de produção de alface.....	5
2.1.7. Limitações do sistema de produção em ar livre	6
2.1.8. Fatores de stress biótico e abiótico na cultura da alface.....	7
2.1.9. Estratégias de proteção	11
2.2. Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal	15
2.2.1. Utilização na agricultura.....	15
2.2.2. Interação entre o microbioma autóctone do solo e as rizobactérias	15
2.3. Avaliação da qualidade do solo	19
3. Materiais e métodos.....	21
3.1. Descrição do local	21
3.1.1. Localização do ensaio	21
3.1.2. Caracterização edafoclimática.....	21
3.2. Ensaio de campo.....	23
3.2.1. Material vegetal	23
3.2.2. Materiais aplicados.....	24
3.2.3. Esquema experimental.....	24
3.3. Práticas culturais no campo experimental	25
3.3.1. Preparação do solo.....	25
3.3.2. Instalação da cultura	26
3.3.3. Tratamentos fitossanitários e fertilização	28

3.3.4. Observações no campo e recolha de amostras de solo	29
3.3.5. Colheita	30
3.4. Métodos laboratoriais	31
3.4.1. Meios de cultura para plaqueamento	31
3.4.2. Extrato de solo.....	33
3.4.3. Plaqueamento	33
3.4.4. Atividade da enzima desidrogenase.....	33
3.4.5. Análises químicas ao solo.....	35
3.5. Tratamento dos dados	37
3.6. Análise económica.....	38
4. Resultados e discussão	39
4.1. Produtividade da cultura.....	39
4.2. Impacto das modalidades nas propriedades biológicas e químicas do solo	42
4.2.1 Fungos	42
4.2.2. Bactérias	44
4.2.3. Atividade desidrogenásica	47
4.2.4. Propriedades químicas do solo	50
4.3. Relação entre o efeito das modalidades no solo e o impacto na cultura e no solo	54
5. Conclusões	56
6. Referências bibliográficas	58

Índice de Figuras

Figura 1- Área e quantidade produzida de alface em Portugal entre 2013 e 2022 (INE, 2024).....	2
Figura 2 - Produtividade da cultura da alface em Portugal entre 2011 e 2022 (INE, 2024).....	3
Figura 3- Distribuição da área de produção de alface em Portugal por região no ano de 2001 (INE, 2002).....	3
Figura 4 - Fotografia aérea da parcela onde decorreu o ensaio (Google Earth).....	21
Figura 5 - Normais climatológicas da região de Lisboa e Vale do Tejo, estação climatológica do IPMA Lisboa / Gago Coutinho 1981-2010 (IPMA, 2023).....	21
Figura 6 - Precipitação e temperatura média no ano 2024 na estação meteorológica do Carrascal (COTHN)	22
Figura 7 - Temperaturas médias diárias do ar entre junho e setembro de 2024 na estação meteorológica do Carrascal (COTHN)	23
Figura 8 - Esquema experimental.....	24
Figura 9 - Montagem do 1º ensaio (vista Este)	26
Figura 10 - Montagem do 1º ensaio (vista Oeste)	26
Figura 11 - Montagem do 2º ensaio (vista Este)	27
Figura 12 - Montagem do 2º ensaio (vista Oeste)	27
Figura 13 - Esquema de colheita das amostras de terra nas diferentes modalidades	29
Figura 14 - Plaqueamento em meio PDA+ampicilina [25µg/ml]	32
Figura 15 - Plaqueamento em meio PDA+ ampicilina+ cloranfenicol	32
Figura 16 - Plaqueamento em meio PDA+ampicilina+canamicina	32
Figura 17 - Plaqueamento em meio PDA+canamicina [50µg/ml]	32
Figura 18 - Plaqueamento em meio PDA+canamicina [100µg/ml]	32
Figura 19 - Potenciómetro Orion 3 Star Thermo Scientific	35
Figura 20 - Condutivímetro Orion Star A212 Thermo Scientific.....	35
Figura 21 - ICP (Thermo Scientific iCAP 7000 Series ICP- OES).....	36
Figura 22 - Auto analisador de fluxo segmentado (Skalar).....	37
Figura 23 - Plaqueamento de fungos (meio PDA+Canamicina) da amostra D1 de 30/08/2024 (vista superior da placa)	42
Figura 24 - Plaqueamento de fungos (meio PDA+Canamicina) da amostra D1 de 30/08/2024 (vista inferior da placa)	42
Figura 25 - Evolução do número de colónias de fungos contabilizados no plaqueamento do extrato de solo	42
Figura 26 - Plaqueamento de bactérias (meio LB) da amostra A3 de 30/08/2024 (vista superior da placa).....	44

Figura 27 - Plaqueamento de bactérias (meio LB) da amostra A3 de 30/08/2024 (vista inferior da placa).....	44
Figura 28 - Evolução do número de colónias de bactérias contabilizadas no plaqueamento do extrato de solo ao longo de todo o ensaio.....	45
Figura 29 - Cuvetes do grupo de controlo para medição da atividade desidrogenásica (amostra de 4/7/24)	47
Figura 30 - Cuvetes do grupo de reação para medição da atividade desidrogenásica (amostra de 4/7/24)	47
Figura 31 - Evolução da atividade da desidrogenase ao longo do ensaio	48

Índice de Quadros

Quadro 1 - Classificação botânica da alface (Almeida, 2006)	4
Quadro 2 - Substâncias ativas autorizadas para o combate a <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Golovinomyces cichoracearum</i> , <i>Pythium</i> spp. na cultura da alface (SIFITO).....	13
Quadro 3 - Substâncias ativas autorizadas para o combate a <i>Bremia lactucae</i> e <i>Sclerotinia</i> spp. na cultura da alface (SIFITO).....	14
Quadro 4 - Substâncias ativas autorizadas para o combate a afídeos e lagartas na cultura da alface (SIFITO).....	14
Quadro 5 - Principais operações culturais realizadas no ensaio	27
Quadro 6 - Produtos fitofarmacêuticos aplicados na cultura.....	28
Quadro 7 - Nutrientes fornecidos pelos fertilizantes Hemostar proteico e Fertimax	28
Quadro 8 - Micronutrientes e metais pesados presentes no adubo orgânico Fertimax	29
Quadro 9 - Cronograma das recolhas de amostras de solo.....	30
Quadro 10 - Massas médias de alface nos 2 ensaios realizados	39
Quadro 11 - Análise económica das diferentes modalidades no 1º ensaio	40
Quadro 12- Análise económica das diferentes modalidades no 2º ensaio.....	40
Quadro 13 - Diversidade aparente de fungos contabilizados nas diferentes modalidades	44
Quadro 14 - Soma do número de colónias de bactérias contabilizadas por modalidade durante toda a duração do ensaio	46
Quadro 15 - Evolução da atividade enzimática da desidrogenase do solo nas diferentes modalidades durante toda a duração do ensaio, apresentada em valores de absorvância no comprimento de onda 485 nm.....	49
Quadro 16 - Evolução de diversos parâmetros químicos do solo nas diferentes modalidades ao longo do ensaio.....	50
Quadro 17 - Evolução dos teores de micronutrientes no solo nas diferentes modalidades ao longo do ensaio.....	52
Quadro 18 - Evolução das bases de troca nas diferentes modalidades ao longo do ensaio.....	53

Lista de abreviaturas

C/N – Razão carbono azoto

ePGPR - *Extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

ICP-OES - *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*

LB - Luria Bertani

NFT – *Nutrient film technique*

PDA – *Potato dextrose agar*

PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

rpm – *Rotations per minute*

TPF - Trifenilformazano

TTC - Cloreto de trifeniltetrazólio

1. Introdução

O setor hortícola apresenta elevada importância em Portugal. Em 2022 foi produzido um total de 1,024 milhões de toneladas de produtos hortícolas, com um valor de cerca de 1,68 milhões de euros (INE, 2023). A elevada produção de hortícolas é justificada pelas condições excelentes para a sua produção, principalmente na faixa litoral do continente (GPP, 2020). A principal região produtora de hortícolas é o Ribatejo e Oeste, concentrando 63% da área dedicada a estas culturas em Portugal (INE, 2021).

A União Europeia, através da estratégia *Farm to Fork*, pretende promover práticas agrícolas sustentáveis, reduzindo a aplicação de fertilizantes sintéticos em 20% e de produtos fitofarmacêuticos em 50% nas culturas agrícolas até 2030. Esta iniciativa, incluída no Pacto Ecológico Europeu, visa reduzir a poluição dos solos, água e ar, ao mesmo tempo que promove o aumento da biodiversidade e reforça a segurança alimentar dos produtos agrícolas, respondendo às exigências dos consumidores europeus (Comissão Europeia, 2020).

A alface é uma das hortaliças mais consumidas em Portugal, sendo as suas folhas apreciadas em saladas e consumidas principalmente cruas (Almeida, 2006). O curto ciclo cultural deste hortícola e o seu consumo em fresco aliado à crescente procura de produtos agrícolas mais sustentáveis reforçam a necessidade de reduzir a aplicação de produtos fitofarmacêuticos e fertilizantes de síntese e procurar alternativas para a proteção e fertilização das culturas (Elnahal et al., 2022; Owen et al., 2015; Santos et al., 2023). Nesse sentido, um dos caminhos para a redução dos produtos fitofarmacêuticos e de fertilizantes sintéticos pode passar pela introdução de rizobactérias no solo e a aplicação de matéria orgânica (Backer et al., 2018).

Este estudo tem como principais objetivos avaliar a influência da aplicação de um complexo de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e da aplicação de matéria orgânica na qualidade e rendimento da cultura da alface ao ar livre durante a estação primavera-verão, bem como nas propriedades químicas e biológicas do solo onde a cultura foi realizada. Pretende-se também identificar a modalidade mais favorável ao crescimento da cultura e avaliar a sua aplicabilidade no contexto real de produção. Para isso, foram aplicadas ao solo as rizobactérias *Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp. e um adubo orgânico azotado em quatro modalidades distintas, em duas culturas sucessivas de alface.

O ensaio foi realizado em contexto empresarial, numa exploração agrícola (Carlos Neves Unipessoal LDA.) localizada na Tourinha, concelho de Mafra, na região Oeste de Portugal. Deste modo foi possível avaliar a aplicabilidade destas modalidades no planeamento de operações da exploração.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Cultura da alface

2.1.1. Produção de alface no mundo

As estatísticas mundiais da FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) agregam à cultura da alface a cultura da chicória. A alface (e chicória) foram, em 2022, a 12ª cultura hortícola mais produzida em todo o mundo, com uma produção de 1,24 milhões de toneladas (FAO, 2024).

Desde o ano 2000 tem-se assistido a um aumento quer de área quer de produção de alface e chicória em todo o mundo. De 2000 a 2022 houve um aumento de área cultivada de cerca de 44% e um aumento de 47% da produção, sendo que os aumentos mais significativos de área e de produção ocorreram na primeira década de 2000 (FAO, 2024).

De 2000 a 2022 a produtividade das culturas de alface e chicória a nível mundial não apresentou grandes alterações, aproximando-se das 22 toneladas por hectare (FAO, 2024).

O principal país produtor de alface e chicória é a China, produzindo perto de 15 milhões de toneladas destes hortícolas anualmente, o que equivale a cerca de 55% da produção mundial. Seguem-se os Estados Unidos, Índia e Espanha (FAO, 2024).

2.1.2. Produção de alface em Portugal

A cultura da alface em Portugal assume uma importância elevada, em 2022 era a quarta cultura hortícola a ocupar maior área e a sexta cultura hortícola com maior produção (INE, 2023).

Nos últimos 10 anos tem havido alguma oscilação quer na área cultivada quer na quantidade produzida de alface. De 2011 a 2018 observou-se uma tendência de redução de área e da quantidade produzida. Pelo contrário, nos anos de 2019 a 2021, deu-se um aumento significativo de área e de produção de alface. 2021 foi o ano com maior produção, cerca de 75 mil toneladas em 2670 hectares. Em 2022 deu-se uma nova redução de área e produção (Fig. 1) (INE, 2024).

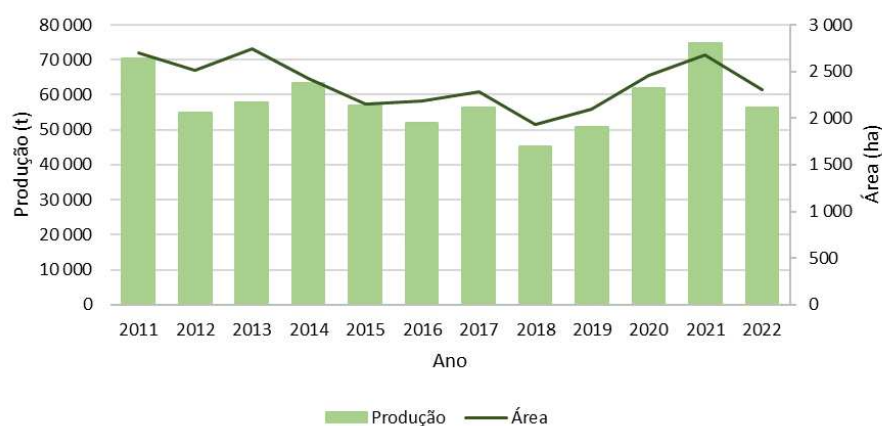


Figura 1- Área e quantidade produzida de alface em Portugal entre 2013 e 2022 (INE, 2024)

A produtividade da cultura da alface sofreu algumas oscilações entre 2011 e 2022. Nos anos de 2012 e 2013 assistiu-se a uma redução acentuada da produtividade com valores próximos das 21 t/ha, sendo que em 2014 houve um aumento da produtividade, mantendo-se nos últimos anos próxima das 25 t/ha (Fig. 2) (INE, 2024). Em 1995 a produtividade da cultura da alface em Portugal era de cerca de 22 t/ha (INE, 2002), pelo que o aumento até cerca das 25 t/ha evidencia as melhorias técnicas realizadas na cultura.

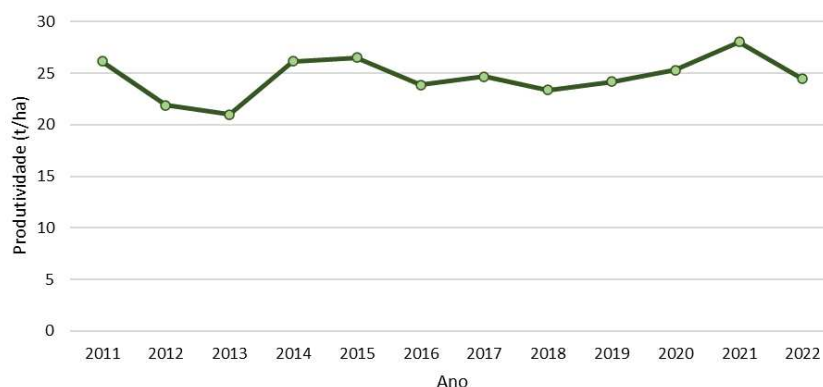


Figura 2 - Produtividade da cultura da alface em Portugal entre 2011 e 2022 (INE, 2024)

2.1.3. Zonas de produção de alface em Portugal

Em Portugal a principal zona de produção de alface é a região do Ribatejo e Oeste. Em 2001, 61% da área dedicada à cultura da alface localizava-se na região do Ribatejo e Oeste, com mais de 1400 hectares cultivados com este hortícola. Segue-se a região de Entre Douro e Minho, com 19% da área e a Beira Litoral com 12% da área de cultivo. O Algarve, Alentejo, Beira Interior e Trás-os-Montes possuem pouca importância no cultivo de alface em Portugal (Fig. 3) (INE, 2002).

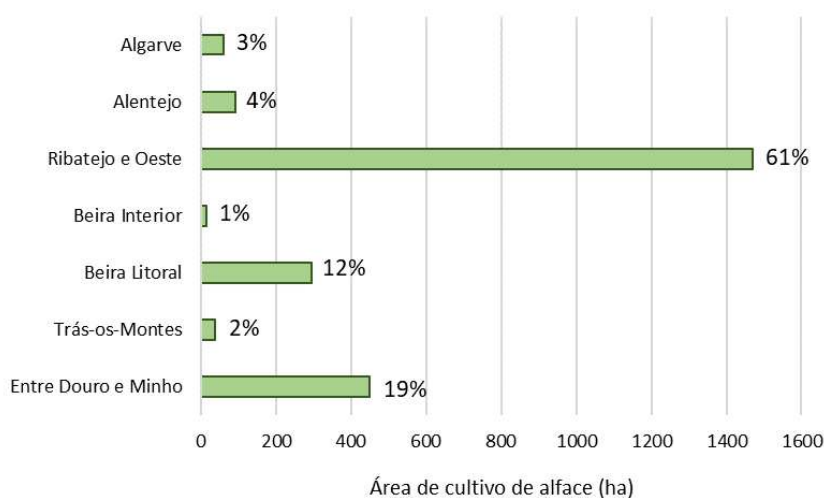


Figura 3- Distribuição da área de produção de alface em Portugal por região no ano de 2001 (INE, 2002)

2.1.4. Comercialização

A produção de alface em Portugal tem como principal destino o mercado nacional. Em 2022, o mercado nacional representou cerca de 80% da produção e foi exportada cerca de 20% da produção nacional.

De 2013 a 2022 verificou-se um saldo da balança comercial positivo, sendo as exportações de alface superiores às importações. Em 2023, a tendência inverteu-se com um valor de importações superior às exportações. Verifica-se também uma tendência de aumento das trocas comerciais deste hortícola ao longo dos anos, com aumento quer das exportações quer das importações (INE, 2024).

As exportações de alface no ano de 2023 tiveram como principal destino os países da União Europeia (97%), onde o principal destino de exportação foi Espanha. Apenas 3% das alfaces exportadas tiveram como destino países fora da União Europeia (INE, 2024).

2.1.5. Descrição e origem

A alface, *Lactuca sativa* L., é uma planta herbácea anual pertencente à família Asteraceae (Quadro 1). É uma espécie cultivada na região mediterrânea desde 2500 a.C., pensa-se que é descendente de uma espécie silvestre, *Lactuca serriola*. Tem como centro de origem a região do Mediterrâneo e do Oriente Próximo (Almeida, 2006).

Quadro 1 - Classificação botânica da alface (Almeida, 2006)

Família	Asteraceae
Subfamília	Cichorioideae
Tribo	Lactuceae (sin. Cichorinae)
Género	<i>Lactuca</i>
Espécie	<i>Lactuca sativa</i> L.

A alface é cultivada para o consumo das suas folhas, principalmente para o seu consumo cru, em saladas. As folhas têm uma elevada percentagem de água, mas possuem também algumas vitaminas, minerais e fibra. As folhas exteriores, mais verdes, são mais nutritivas do que as folhas interiores, mais esbranquiçadas (Almeida, 2006; Gardé & Gardé, 1981).

A alface possui um sistema radicular apurado e relativamente superficial, alcançando os 60 cm no caso de sementeira direta, mas caso exista transplantação (predominante na Europa) as suas raízes não têm mais de 30 cm (Almeida, 2006).

A alface é uma cultura microtémica, com temperatura ótima de crescimento entre 15 e 20 °C (Almeida, 2006). Existem inúmeras cultivares adaptadas as diferentes condições climáticas que permitem o cultivo em diferentes épocas do ano (Maroto, 2002). As temperaturas elevadas, superiores a 33 °C e fotoperíodo longo favorece a floração, inviabilizando a venda e consumo das alfaces.

2.1.6. Sistemas de produção de alface

Sendo a alface um hortícola com consumo durante todo o ano, existe a necessidade de produção desta cultura durante todo este período. Conciliando as produções em estufa com a produção ao ar livre, as principais zonas produtoras de alface (Ribatejo e Oeste, Entre Douro e Minho e Beira Litoral) produzem este hortícola durante todo o ano (Saltão & Moreira, 2006).

a. Estufa

A alface é uma cultura que se adapta bem ao cultivo em estufa. Em Portugal, a produção é feita normalmente em estufas não aquecidas durante os meses de outono e inverno. Nas principais regiões produtoras de alface, a plantação em estufa é realizada desde início de setembro até final de fevereiro. A época de colheitas em estufa situa-se então entre os meses de novembro e abril. A alface é das poucas culturas hortícolas que produz nas condições de baixa luminosidade e temperaturas relativamente baixas das estufas nos meses de outono e inverno (Gardé & Gardé, 1981; Saltão & Moreira, 2006).

Devido ao seu curto ciclo cultural, a alface em estufa é geralmente considerada uma cultura intercalar, sendo seguida do cultivo de hortícolas de época de primavera verão, como é o caso das culturas do tomate, pepino, *courgette* ou feijão verde (Almeida, 2006; Saltão & Moreira, 2006).

A produção em estufa pode ser feita diretamente no solo ou em sistema de cultivo sem solo. Existem diversos sistemas de cultivo sem solo, tal como o sistema de cultura em filme nutritivo NFT, *Dutch Bucket System* e *Deep-Water Culture* (Tripathi et al., 2022). Em Portugal, o cultivo de alface em estufa predominante é no solo em estufas não aquecidas (Almeida, 2006).

A instalação da cultura é feita por transplantação de plantas com 3 a 5 folhas, produzidas em tabuleiros alveolados ou mottes, por viveiros especializados.

A rega é feita por microaspersão e/ou gota-a-gota; por vezes é utilizada a rega por microaspersão até à colonização do solo pelas raízes e depois rega gota-a-gota de forma a evitar a humectação das folhas e a elevada humidade relativa dentro das estufas (Almeida, 2006).

Um aspeto fundamental da produção de alface em estufa é assegurar o arejamento, de forma a evitar uma excessiva humectação das folhas, que contribui para o desenvolvimento de doenças (Gardé & Gardé, 1981). Também as densidades de plantação devem ser menores, aumentando o espaçamento entre plantas e, por conseguinte, o arejamento (Almeida, 2006).

b. Ar livre

A produção de alface ao ar livre em Portugal é feita durante os meses de primavera e verão. Nas principais regiões produtoras, a plantação é realizada de março a setembro, colhendo-se a partir do mês de maio até outubro.

Em Portugal e nos restantes países da Europa a instalação da cultura em ar livre é também feita por transplantação de plantas criadas em mottes ou tabuleiros alveolados. Nos EUA a cultura ao ar livre é, geralmente, instalada por sementeira direta, de forma a reduzir custos de mão de obra (Almeida, 2006). A rega ao ar livre é geralmente feita por aspersão, podendo também ser feita por gota-a-gota ou uma combinação dos dois métodos (Almeida, 2006; Maroto, 2002).

Na plantação ao ar livre é, geralmente, colocado um filme de polietileno negro para controlo das infestantes. Esta cobertura do solo é, por vezes, também utilizada no cultivo de alface em estufa, devido à dificuldade do uso de herbicidas nesta cultura (Almeida, 2006).

A aplicação de matéria orgânica é uma prática comum e benéfica para a cultura de alface ao ar livre (Gardé & Gardé, 1981). A matéria orgânica contribui para um aumento da fertilidade do solo e melhoria da estrutura do solo e da capacidade de retenção de água (Santos, 2015), importante para esta cultura com sistema radicular superficial e que beneficia de uma humidade constante do solo (Gardé & Gardé, 1981).

A mineralização da matéria orgânica é uma importante fonte de azoto para a cultura da alface, uma vez que se trata de uma cultura relativamente pouco exigente neste nutriente (Almeida, 2006).

2.1.7. Limitações do sistema de produção em ar livre

As principais limitações da produção de alface ao ar livre relacionam-se com a dependência de condições climáticas favoráveis. Devido às suas exigências climáticas, a produção ao ar livre só é possível durante os meses de primavera e verão, podendo abranger-se parte do outono. Neste período de cultivo ao ar livre, principalmente nos meses de verão, podem ocorrer temperaturas altas, que podem ter impacto na produção e na qualidade das alfaces. Ventos quentes são desfavoráveis a um bom desenvolvimento das alfaces (Maroto, 2002)

A cultura é bastante exigente em água possui um sistema radicular muito superficial, pelo que períodos com temperaturas muito elevadas podem levar a stress hídrico, a espigamento precoce e também à redução da qualidade do produto, ficando as folhas mais amargas e coriáceas. As temperaturas elevadas e stress hídrico podem também levar a uma maior incidência de necrose terminal (Almeida, 2006).

Nas alfaces que formam repolho (tipo batávia ou bola de manteiga), a ocorrência de temperaturas altas e elevada luminosidade, que ocorre com frequência no período de cultivo de alface ao ar livre, a formação do repolho é prematura, ficando as alfaces com calibre reduzido e com fraca qualidade (Almeida, 2006).

A colheita das alfaces produzidas ao ar livre é também um fator limitante, uma vez que as alfaces devem ser colhidas durante a manhã, de forma a evitar os períodos de maior calor e terem, assim, uma maior qualidade e maior longevidade pós-colheita. Deve ter-se também em conta que o excesso de humidade das folhas interiores da alface pode ser prejudicial para a sua conservação, levando ao apodrecimento das folhas. Assim, há uma maior limitação dos períodos de colheita do produto. Na produção ao ar livre, as plantas estão também mais sujeitas ao ataque de pragas que podem afetar a produção (Gardé & Gardé, 1981).

2.1.8. Fatores de stress biótico e abiótico na cultura da alface

a. Fungos e pseudofungos

Sclerotinia minor Jagger e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary são dois fungos do solo que causam podridão branca em alface. Estes dois fungos são especialmente problemáticos devido ao elevado número de espécies que atacam e devido aos esclerotos poderem ficar latentes no solo por mais de 8 anos (Barrière et al., 2014). Para além disso, o micélio que fica nos resíduos das culturas no solo é também uma fonte de inóculo (Chen et al., 2016). Esta doença é problemática tanto no cultivo em estufa como em ar livre (AHDB, 2019). Em estufa deve evitar-se o excesso de água e promover o arejamento de forma a evitar as infeções (Almeida, 2006).

Rhizoctonia solani Kühn é um fungo do solo que pode atacar a alface, sendo uma doença principalmente perigosa no cultivo em estufa. Este fungo sobrevive no solo na forma de esclerotos ou em micélio em restos de culturas infetadas. O desenvolvimento desta doença é favorecido por uma temperatura do solo amena e humidade elevada (AHDB, 2019; Almeida, 2006).

Outra doença problemática na cultura da alface é a fusariose causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* Matuo & Motoh. Esta é uma doença do solo, transmissível também por semente. Este fungo pode sobreviver no solo durante alguns anos, sendo a sua erradicação muito difícil mesmo se não for cultivada nenhuma cultura hospedeira. As infeções ocorrem principalmente quando o solo atinge temperaturas amenas, mas podem ocorrer quando o solo apresenta temperatura de 15 °C a 10 cm de profundidade. Atualmente já existem algumas variedades de alface resistentes ou tolerantes a este fungo (AHDB, 2019; Gordon & Koike, 2015).

Pseudofungos do solo do género *Pythium* spp. podem também infetar a alface e causar podridões radiculares. A infeção primária dá-se a partir de oósporos ou micélio presente no solo, restos de culturas ou em tubagens, no caso de cultivo em hidroponia. Esta doença é principalmente preocupante em cultura hidropónica, com menor gravidade em cultivo protegido no solo (AHDB, 2019; Blok & Plaats-Niterink, 1978).

A podridão cinzenta, causada pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers. é outra das doenças que afeta a cultura da alface. É uma doença pouco problemática no cultivo ao ar livre, mais problemática no cultivo de inverno em estufa. As condições ideais para o desenvolvimento do fungo e infecção das plantas são temperaturas a rondar os 12-15 °C e humidade relativa elevada. O fungo sobrevive em restos de culturas infetadas, na forma de esclerotos e a dispersão de conídios pelo vento leva à proliferação da doença. A doença é também transmissível por semente.

A ocorrência de lesões, causadas por exemplo por geada, *tipburn* (necrose terminal, ver ponto f) ou picadas de um inseto, constitui uma porta de entrada para este fungo (AHDB, 2019; Sowley et al., 2010).

Uma das doenças que ataca a parte aérea da alface é o míldio causado pelo pseudofungo *Bremia lactucae* Regel. As condições ótimas para a esporulação do fungo são humidade relativa elevada e temperaturas entre os 5 e 15 °C. A infecção de culturas de alface pode dar-se pela libertação de esporângios de outras plantas infetadas do género *Lactuca* ou por micélio presente em restos de uma cultura infetada (Barrière et al., 2014). Esta é uma doença que pode afetar plantas de alface cultivadas quer em estufa quer em ar livre (AHDB, 2019).

O oídio, causado pelo fungo *Golovinomyces cichoracearum* (DC.) V.P. Heluta, pertencente ao filo Oomycota, é outra das doenças que pode afetar a cultura da alface. A temperatura ideal para o seu desenvolvimento é entre 18 e 25 °C e para ocorrer a infecção é necessária uma humidade relativa do ar elevada. Existem cultivares mais tolerantes a esta doença, pelo que, em zonas em que existam problemas com a doença é aconselhado o cultivo destas cultivares. É uma doença que afeta os cultivos de alface protegidos e ao ar livre (AHDB, 2019; Barrière et al., 2014).

Outra das doenças que afeta a parte aérea da alface é a antracnose, causada pelo fungo *Microdochium panattonianum* (Berl.) Sutton, Galea & Price. A doença causa manchas circulares e o fungo mantém-se no solo na forma de microesclerotos até 4 anos. A temperatura ótima para o seu desenvolvimento é entre os 18 e 20 °C. Conciliando esta temperatura com humidade relativa elevada ou precipitação e vento, há elevada dispersão dos microesclerotos e conídios do solo para as folhas (AHDB, 2019; Almeida, 2006).

Existem ainda doenças como verticilose, causada por *Verticillium dahliae* Kleb, alternariose, causada por *Alternaria* spp., septoriose, causada por *Septoria lactucae* Pass. e estenfiliose, causada por *Stemphylium botryosum* f.sp. *lactucae* Padhi & Snyder que podem causar estragos nesta cultura (AHDB, 2019; Almeida, 2006).

b. Insetos

Uma das pragas que afeta a cultura da alface são os afídeos. Existem várias espécies que podem atacar a alface tais como: *Myzus persicae* (Sulzer), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Aphis gossypii* Glover, *Aphis fabae* Scopoli, *Nasonovia ribisnigri* (Mosley). Os ataques destes afídeos causam, de uma forma geral, folhas enroladas podendo surgir também manchas amareladas. Algumas espécies de afídeos são também vetores de vírus (Almeida, 2006; MADRP, 2006). Também o afídeo *Pemphigus bursarius* (Linnaeus) pode afetar esta cultura, sendo que este afídeo ataca as raízes das plantas (Barrière et al., 2014).

Algumas larvas mineiras também atacam as folhas de plantas de alface, tais como as do género *Liriomyza* spp.. As larvas, quando se alimentam, formam galerias nas folhas que causam depreciação no produto. As fêmeas adultas fazem também picadas nas folhas para se alimentarem, causando também estragos (Almeida, 2006; MADRP, 2006).

As roscas ou nóctuas da família Noctuidae, principalmente do género *Agrotis* spp. também atacam as plantas de alface. Estas lagartas estão normalmente no solo e atacam o colo da planta, podendo causar a sua perda (Almeida, 2006; MADRP, 2006).

Trips de espécies como *Frankliniella occidentalis* (Pergande) e *Thrips tabaci* Lindeman, entre outras, quando se alimentam nas folhas de alface, causam manchas nas folhas que acabam por necrosar e deformações quando atacam folhas jovens. São também vetores de vírus (Almeida, 2006; Barrière et al., 2014; MADRP, 2006).

As lagartas de espécies como *Autographa gamma* (Linnaeus), *Helicoverpa armígera* (Hübner), *Chrysodeixis calcites* (Esper), *Thysanoplusia orichalcea* (Fabricius), entre outras, podem causar estragos em folhas de alface (Almeida, 2006; Barrière et al., 2014).

Outras pragas como: lesmas e caracóis, mosca branca, alfinete também podem afetar a cultura e provocar perdas (Almeida, 2006; Barrière et al., 2014).

c. Nemátodes

Os nemátodes que mais afetam a cultura da alface são nemátodes de galhas, pertencentes ao género *Meloidogyne* (Dias-Arieira et al., 2015). Estes nemátodes podem ser problemáticos principalmente em estufas em que as rotações são feitas com culturas pertencentes às famílias das solanáceas ou cucurbitáceas, uma vez que os nemátodes de galhas também atacam plantas destas famílias (Barrière et al., 2014).

d. Bactérias

A alface é suscetível a infecções por bactérias das espécies *Pseudomonas cichorii* (Swingle) e *Xanthomonas campestris* pv. *Vitians*. Ambas as espécies se desenvolvem em situações de temperaturas amenas e humidade elevada (Barrière et al., 2014).

e. Vírus

A alface pode ser atacada por vários vírus. O principal é o vírus do mosaico da alface (*Lettuce mosaic virus* – LMV), a sua transmissão é feita através de semente e também através de diversas espécies de afídeos que atacam a cultura. As infecções de plantas por este vírus, são, em muitas ocasiões, infecções mistas com o vírus do mosaico das cucurbitáceas (*Cucumber mosaic virus* - CMV) (MADRP, 2006; Moreno & Fereres, 2012).

O vírus do bronzeamento do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV), transmitido por tripses, nomeadamente a espécie *Frankliniella occidentalis* (Pergande) e *Lettuce mirafiori big-vein virus* (LMBVV), transmitido pelo fungo *Olpidium brassicae* (Woronin) P.A.Dang. podem também afetar a cultura da alface (MADRP, 2006; Moreno & Fereres, 2012).

f. Acidentes fisiológicos

A necrose terminal, ou *tipburn*, é um acidente fisiológico que se caracteriza pelo aparecimento de manchas acastanhadas que acabam por necrosar na margem do limbo das folhas. Este acidente é causado por dificuldades de absorção e translocação de cálcio. Condições de temperaturas elevadas, excesso de fertilização azotada e elevada intensidade luminosa reduzem a absorção de cálcio, favorecendo este acidente. Também as temperaturas baixas, aliadas a elevada salinidade e humidade relativa do ar podem agravar a necrose terminal (Almeida, 2006; Maroto, 2002)

O espigamento precoce é outro acidente fisiológico que pode afetar o cultivo de alfaces, principalmente no verão. Temperaturas elevadas (superiores a 33 °C), fotoperíodos longos e stress hídrico favorecem o espigamento. Existem variedades mais resistentes ao espigamento, devendo ser essas as cultivadas no período mais quente do ano (Almeida, 2006; Maroto, 2002).

g. Principais fatores de stress biótico e abiótico no sistema de produção em ar livre

De acordo com Barrière et al. (2014) as doenças mais preocupantes no cultivo ao ar livre são o míldio da alface, oídio da alface, podridão branca, podridão radicular causada por *Pythium* spp. e também infecções por *Rhizoctonia solani*. Estas doenças, na região mediterrânea, são principalmente preocupantes no período do início do outono.

A fusariose pode também causar estragos no cultivo ao ar livre, embora as infecções se registem principalmente no verão, na região mediterrânea.

As pragas como afídeos e lagartas, como *Helicoverpa armigera*, e também nemátodes do género *Meloidogyne* spp. podem causar estragos na cultura em toda a época de produção ao ar livre (Barrière et al., 2014).

O espigamento precoce, sendo favorecido por temperaturas elevadas e stress hídrico, pode também ter algum impacto no cultivo de alface ao ar livre (Almeida, 2006).

2.1.9. Estratégias de proteção

a. Meios de proteção física e cultural

Os meios de proteção física englobam as técnicas que limitam o acesso das pragas à cultura, induzem mudanças comportamentais ou causam danos diretos ou a morte dos inimigos das culturas. Nos meios de proteção física não há intervenção de processos biológicos ou bioquímicos presentes nos meios de proteção química, biotécnica ou biológica (Amaro, 2003) (Vincent et al., 2009).

A cobertura do solo com polietileno funciona não só como método para controlo de infestantes, mas também como meio de proteção contra fungos como *Sclerotinia* e *Rhizoctonia*, uma vez que inibe o contacto das folhas com o solo (Almeida, 2006; Barrière et al., 2014).

A solarização aumenta a temperatura do solo e diminui a concentração de oxigénio no solo, sendo letal para alguns organismos. A viabilidade de nemátodes *Meloidogyne* spp. e fungos *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *S. sclerotia*, *R. solani* e *O. brassicae* é bastante afetada pela solarização (Barrière et al., 2014; Patrício et al., 2006).

Nas estufas podem ser colocadas redes de proteção contra insetos, evitando a sua entrada e, desta forma, reduzir os ataques de pragas às plantas de alface (Barrière et al., 2014).

A aplicação de meios de proteção cultural tem um carácter preventivo, promovendo condições desfavoráveis aos inimigos das culturas de forma a evitar prejuízos (Amaro, 2003).

A remoção de resíduos de culturas infetadas com fungos é um método de proteção cultural, desta forma há remoção da fonte de inóculo (micélio, esporos ou estruturas de resistência) (Barrière et al., 2014).

As rotações com culturas diferentes, de diferentes famílias são benéficas e podem ser consideradas um meio de proteção cultural; havendo uma alteração de culturas, há alteração de hospedeiros que permite interromper o ciclo de algumas pragas e doenças (Barrière et al., 2014).

Biofumigação com resíduos de culturas, principalmente da família das Brássicas, pode reduzir os níveis de *Sclerotinia* spp., *R. solani* e nemátodes de galhas no solo (Barrière et al., 2014).

O desenvolvimento de cultivares resistentes ou tolerantes a doenças, como é o caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* ou a *B. lactucae* permite a utilização destas cultivares pelos agricultores, mitigando assim os efeitos destas doenças (AHDB, 2019; Barrière et al., 2014).

O sistema de rega utilizado pode também ajudar a evitar a infeção das plantas por alguns fungos. Devem ser evitadas as regas por aspersão, principalmente no cultivo em estufa, uma vez que a germinação de esporos de *B. lactucae* e *B. cinerea* depende bastante da humectação das folhas de alface. Para além

disso, também o espaçamento entre plantas é essencial e pode também ser considerado um meio de proteção cultural. Aumentando o espaçamento, aumenta-se o arejamento, evitando as condições propícias para o desenvolvimento de fungos ou germinação de esporos (Almeida, 2006; Barrière et al., 2014).

b. Meios de proteção biológica

De acordo com Amaro (2003) a proteção biológica pode ser definida como a utilização de populações de espécies de predadores, parasitóides, patogênicos, antagonistas ou competidores que permitem reduzir a população de um determinado inimigo.

A proteção biológica pode ser dividida em três modalidades distintas: a limitação natural, a proteção biológica clássica e o tratamento biológico (Amaro, 2003).

A limitação natural é um meio indireto de proteção que tem como objetivo evitar as condições favoráveis para o desenvolvimento de um determinado inimigo (Amaro, 2003).

A proteção biológica clássica pretende combater uma espécie exótica, que está a causar estragos numa cultura, através da importação de espécies auxiliares. É utilizada normalmente para o combate de pragas. O tratamento biológico tem como objetivo aumentar a população de auxiliares autóctones do local, através de largadas. Nesta modalidade de proteção biológica podem ser usados microrganismos e é possível combater pragas, doenças e infestantes (Amaro, 2003).

Na cultura da alface existem diversos meios de proteção biológica que podem ser aplicados para o controlo de pragas e de doenças. De acordo com a revisão de Barrière et al. (2014), o agente de proteção biológica *Coniothyrium minitans* W.A.Campb aplicado ao solo pode reduzir a incidência de doenças provocadas pelos patogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia solani* e *Botrytis cinerea*. A aplicação ao solo de *Trichoderma harzianum* T22 reduz a incidência de *Pythium* spp., *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *R. solani* e *B. cinerea* (Barrière et al., 2014). Similarmente, a aplicação foliar de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) leva a menor incidência de *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* e *R. solani* em alface (Barrière et al., 2014).

Para a proteção biológica de afídeos, a espécie *Aphidoletes aphidimyza* Rondani é predadora de diversas espécies de afídeos. As espécies *Aphidius ervi* Haliday, *Aphidius colemani* Viereck, *Aphelinus abdominalis* (Dalman), *Aphidius matricariae* Haliday são parasitóides de algumas espécies de afídeos, pelo que podem ser usados para o seu controlo. *Chrysoperla carnea* (Stephens), *Adalia bipunctata* (Linnaeus), são predadores polípagos que também podem desempenhar um papel importante na redução das populações de afídeos (Barrière et al., 2014; MADRP, 2006). Para a proteção contra larvas mineiras do género *Liriomyza* poderão ser feitas largadas do parasitóide *Diglyphus isaea* (Walker) tanto no cultivo em estufa como ao ar livre. A proteção biológica contra tripes poderá ser feito através dos ácaros predadores *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini) e *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) (MADRP, 2006).

c. Meios de proteção química

A proteção química baseia-se na utilização de substâncias químicas naturais ou de síntese de forma a reduzir ou eliminar as populações de um determinado inimigo das culturas (Amaro, 2003).

A utilização de pesticidas de origem sintética foi, durante anos, a metodologia mais utilizada para controlar os inimigos das culturas agrícolas. Esta utilização massiva resultou em diversos problemas, como a criação de resistências, acumulação de resíduos no solo e em espécies não alvo e toxicidade para o Homem (Arora et al., 2022).

Na cultura da alface, os herbicidas são pouco utilizados, uma vez que a gestão das infestantes é tendencialmente feita com recurso a meios físicos (*mulching* principalmente), sendo mais utilizados inseticidas e fungicidas. Nesta cultura, devido ao seu curto ciclo, é necessário fazer uma avaliação criteriosa de quais os produtos fitofarmacêuticos a aplicar de forma a cumprir os intervalos de segurança, evitando a presença de resíduos acima do limite máximo à colheita (Barrière et al., 2014).

Atualmente estão já identificados alguns fungos e insetos, inimigos da cultura da alface, como resistentes a determinadas substâncias ativas (Barrière et al., 2014). Quando é necessário aplicar algum meio de proteção química, deve assegurar-se o cumprimento do número de aplicações e dose recomendados e são alternados produtos com diferentes modos de ação e de famílias químicas diferentes, de forma a evitar fenómenos de resistência (Barrière et al., 2014; Savary et al., 2006).

A escolha de um produto fitofarmacêutico deve ser feita tendo também em consideração o seu impacto na fauna de insetos auxiliares presentes na cultura. É importante fazer uma identificação da fauna auxiliar presente e, se houver necessidade de aplicar um produto fitofarmacêutico, a sua escolha deve ter também em consideração o impacto sobre estes insetos (MADRP, 2006).

Nos Quadros 2 e 3 apresentam-se as substâncias ativas autorizadas para o combate às principais doenças da cultura da alface em ar livre. No Quadro 4 apresentam-se as substâncias ativas autorizadas para o combate às principais pragas.

Quadro 2 - Substâncias ativas autorizadas para o combate a *Rhizoctonia solani*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Pythium* spp. na cultura da alface (SIFITO)

<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Pythium</i> spp.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Enxofre	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	Eugenol	Propamocarbe
<i>Trichoderma asperellum</i>	Geraniol	<i>Trichoderma asperellum</i>
<i>Trichoderma atroviride</i>	Óleo de laranja	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	Timol	

Quadro 3 - Substâncias ativas autorizadas para o combate a *Bremia lactucae* e *Sclerotinia* spp. na cultura da alface (SIFITO)

<i>Bremia lactucae</i>	<i>Sclerotinia</i> spp.
Ametoctradina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Amisulbrome	Boscalide
Azoxistrobina	Ciprodinil
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Coniothyrium minitans</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	Eugenol
Cerevisana	Fenehexamida
Cobre (na forma de hidróxido ou oxiclreto)	Fludioxonil
Fluopicolida	Fluopirame
Fosetil	Fluxaproxade
Fosfonatos de potássio	Geraniol
Laminarina	Isofetamida
Mandipropamida	Pentiopirade
Metalaxil	Piraclostrobina
Óleo de laranja	Primetanil
Oxatiapiprolina	<i>Pythium oligandrum</i>
Propamocarbe	Timol
	<i>Trichoderma asperellum</i>
	<i>Trichoderma atroviride</i>
	<i>Trichoderma gamsii</i>
	<i>Trichoderma harzianum</i>
	Trifloxistrobina

Quadro 4 - Substâncias ativas autorizadas para o combate a afídeos e lagartas na cultura da alface (SIFITO)

Afídeos	Lagartas
Acetamipride	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Ácidos gordos (na forma de sais de potássio)	Ciantraniliprol
Azadiractina	Cloranttraniliprol
Beauveria bassiana	Deltametrina
Ciantraniliprol	Emamectina (na forma de sal de benzoato)
Deltametrina	Metaflumizona
Enxofre	Spinosade
Espirotetramato	Vírus da poliedrose nuclear de <i>Spodoptera littoralis</i>
Eugenol	
Flonicamida	
Flupiradifurona	
Geraniol	
Lambda-cialotrina	
Maltodextrina	
Óleo de colza	
Óleo de laranja	
Piretrinas	
Primicarbe	
Tau-fluvalinato	
Timol	

2.2. Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal

2.2.1. Utilização na agricultura

O aumento da procura por produtos agrícolas mais sustentáveis, aliado à necessidade de reduzir a aplicação de produtos fitofarmacêuticos, sobretudo nos produtos hortícolas para consumo em fresco, suporta a necessidade de procurar alternativas para a proteção das culturas. Existe assim a possibilidade de utilizar agentes de proteção biológicos, microrganismos tais como bactérias ou fungos, ou até biofertilizantes, que protejam as plantas de microrganismos patogénicos tornando, desta forma, possível reduzir a aplicação de produtos fitofarmacêuticos e fertilizantes (Elnahal et al., 2022; Owen et al., 2015). Em sistemas de agricultura intensiva, devido à baixa diversidade de culturas produzidas, as doenças do solo podem causar elevados prejuízos (Katan, 2004). A utilização de pesticidas (fungicidas, nematodocidas) para o controlo deste tipo de doenças foi, durante alguns anos, a principal forma de combate a estes agentes patogénicos, mas o seu uso indiscriminado leva à degradação de várias funções do solo (Zalidis et al., 2002). A utilização de microrganismos de proteção biológica pretende reduzir estes problemas e privilegiar uma melhoria das qualidades, principalmente biológicas, do solo a longo termo.

2.2.2. Interação entre o microbioma autóctone do solo e as rizobactérias

a. *Azotobacter* spp.

É um género de bactérias Gram-negativas, de vida livre no solo, aeróbias. Um dos principais interesses da sua utilização, do ponto de vista agronómico, é a sua capacidade de fixar azoto atmosférico sem necessidade de efetuar uma relação simbiótica com as plantas (Sumbul et al., 2020). Estas bactérias captam o azoto atmosférico para a síntese de proteínas, estas proteínas são mineralizadas no solo, levando a um aumento da disponibilidade de azoto mineral no solo (Aasfar et al., 2021; Jnawali et al., 2015; Sumbul et al., 2020).

A presença de *Azotobacter* spp. nos solos é influenciada pelo pH do solo, apresentando sensibilidade a solos com pH ácido; em particular, há grande diminuição da população com pH inferior a 6. A salinidade é também importante para o desempenho destas bactérias; a maioria das espécies não tolera elevada salinidade. Quanto à temperatura, são organismos mesófilos, com temperatura ótima para o seu desenvolvimento de 25-30°C, sendo sensíveis a temperaturas superiores a 45°C e inferiores a 0°C. Estes microrganismos são também influenciados pelo teor de carbono orgânico do solo, sendo a presença de *Azotobacter* spp. favorecida por um elevado teor de carbono orgânico no solo (Aasfar et al., 2021; Aquilanti et al., 2004; Lenart, 2011).

Azotobacter spp. podem ser consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Jnawali et al., 2015); como estas bactérias existem apenas na rizosfera, não formando nódulos nas raízes das plantas, são consideradas ePGPR - *extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (Bhattacharyya & Jha, 2012). Na sua revisão, Aasfar et al. (2021), identificam os principais mecanismos das bactérias *Azotobacter* spp. que permitem estimular o crescimento das plantas: produção de hormonas de crescimento; fixação de azoto atmosférico; solubilização de fósforo do solo e indução de tolerância das plantas a diversos stresses. Além disso, estas rizobactérias podem também ter um papel importante na diminuição da incidência de algumas doenças (Sumbul et al., 2020).

As espécies de *Azotobacter* são capazes de sintetizar hormonas de crescimento das plantas tais como ácido índole-acético, giberelinas, citocininas. Estas hormonas induzem crescimento vegetativo, favorecem a absorção de nutrientes, promovem o crescimento de outros microrganismos benéficos na rizosfera e têm ainda um papel importante na proteção das plantas de organismos fitopatogénicos (Aasfar et al., 2021; Jnawali et al., 2015; Sahoo et al., 2014).

As bactérias do género *Azotobacter* sintetizam enzimas, nitrogenases, capazes de transformar azoto atmosférico (N_2) em amónio (NH_3). Posteriormente, ocorre transformação no solo em ião amónio (NH_4^+), que pode ser absorvido pelas raízes das plantas. A fixação biológica de azoto por parte de *Azotobacter* spp. é bastante dependente da presença de fósforo no solo (Aasfar et al., 2021).

De acordo com Kizilkaya (2014) citado por Jnawali et al. (2015), as bactérias do género *Azotobacter* spp. têm capacidade de fixar em média 20 kg N/ha/por ano. Bhattacharyya & Jha (2012) citados por Aasfar et al. (2021) consideram que a fixação biológica de azoto atmosférico por parte destas bactérias pode alcançar 60 kg N/ha/por ano. Desta forma pode verificar-se a importância que estas bactérias podem ter para o fornecimento de azoto às plantas e a necessidade de manter as condições no solo ideais para o seu desenvolvimento e funcionamento.

O fósforo é um nutriente que existe nos solos, mas muitas vezes encontra-se em formas insolúveis, estando indisponível para ser imediatamente absorvido pelas plantas. *Azotobacter* spp. pode ter um papel importante na solubilização deste nutriente (Aasfar et al., 2021). No estudo de El-Badry et al. (2016) foi demonstrado que *Azotobacter vinelandii* solubilizou 43% de rocha fosfatada.

Os principais stresses abióticos que limitam a produção agrícola e a produtividade das culturas são a salinidade e o stress hídrico (Yang et al., 2009). Na investigação de Latif et al. (2020) a inoculação de plantas de milho com *Azospirillum lipoferum* e com *Azotobacter chroococcum* em condições de stress salino melhorou a atividade fisiológica das plantas, quando comparado com plantas não inoculadas, aumentando o crescimento das plantas de milho. Desta forma a inoculação das plantas de milho com estas bactérias PGPR mitigou os efeitos adversos do stress salino, permitindo um melhor crescimento das plantas.

Azotobacter spp. pode também ter um efeito benéfico no aumento da tolerância das plantas ao stress hídrico. No estudo de Shirinbayan et al. (2019) foram isoladas diferentes estirpes de *Azotobacter* spp. provenientes de solos de regiões semi-áridas, posteriormente foram inoculadas sementes de milho com estas estirpes e colocadas a crescer numa estufa sob condições de stress hídrico. Os resultados mostraram que a inoculação com *Azotobacter* spp. provocou um aumento do crescimento das plantas de milho, dos nutrientes absorvidos e tamanho das raízes. Este aumento da tolerância ao stress hídrico das plantas de milho deverá ser efeito do conjunto de mecanismos benéficos das rizobactérias promotoras do crescimento vegetal.

A ação de *Azotobacter* spp. pode também ter efeitos benéficos na diminuição da suscetibilidade das plantas a doenças bióticas. De acordo com a investigação de Akram et al. (2016), a aplicação de *Azotobacter chroococcum* a plantas de grão de bico levou a uma diminuição significativa da incidência de nemátodes de galhas da espécie *Meloidogyne incognita*. Esta aparente indução de resistência ao nemátode não deverá ocorrer por uma ação específica da bactéria, mas sim devido a uma série de mecanismos tais como o aumento da produção de hormonas vegetais, maior absorção de nutrientes e interação entre o agente causal de doença e *A. chroococcum*.

Maheshwari et al. (2012) demonstraram que a estirpe TRA2 de *A. chroococcum*, isolada da rizosfera de plantas de trigo, apresentava forte atividade antagonista contra os fungos *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum*. Esta ação antagonista causou degradação de componentes da parede celular do fungo, resultando na perfuração de hifas, formação de células vazias e ainda degeneração de conídios. A inoculação de sementes de *Sesamum indicum* L. com a estirpe TRA2 de *A. chroococcum* resultou num melhor crescimento das plantas e assim, levou a um aumento de produção da cultura. A produção de sementes inoculadas com *A. chroococcum* permitiu reduzir em metade a quantidade de fertilizantes aplicados, comparando com sementes não inoculadas, mantendo uma produtividade semelhante (Maheshwari et al., 2012).

b. *Azospirillum* spp.

Azospirillum é um género de bactérias Gram-negativas, com vida livre no solo e microaerófilas, sobrevivendo em condições com concentração muita reduzida de oxigénio. Estas bactérias têm a capacidade de fixar azoto atmosférico, tendo, por isso, elevado interesse agronómico (Cassán et al., 2020).

À semelhança de *Azotobacter*, *Azospirillum* é também um género composto por bactérias consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) (Cassán & Diaz-Zorita, 2016). Os principais mecanismos que promovem o crescimento das plantas são: produção de fito-hormonas; fixação de azoto atmosférico; melhoria do crescimento radicular e aumento da absorção de nutrientes; solubilização de fósforo presente no solo e ainda mitigação de stresses bióticos e abióticos nas plantas (Bashan & De-Bashan, 2010).

Todos estes mecanismos de promoção do crescimento vegetal poderão culminar numa maior produtividade das plantas e numa diminuição da quantidade de inputs aplicados, tais como os fertilizantes azotados (Okumura et al., 2013).

Azospirillum spp. são capazes de produzir diversas fito-hormonas, sendo as principais: auxinas (tais como ácido indolacético, ácido fenilacético ou ácido indolbutírico), giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (Cassán & Diaz-Zorita, 2016). No estudo de Lana et al. (2012) foi avaliado, em dois anos, o efeito de *Azospirillum* spp. associado à fertilização azotada de uma cultura de milho. Na ausência de adição de azoto à cultura, a inoculação das plantas de milho com *Azospirillum* spp. provocou um aumento de produção de 7,4% e 15,4% em cada uma das campanhas estudadas. Além disso, determinou-se também que a inoculação das plantas de milho com *Azospirillum* spp. teve uma produtividade semelhante à obtida com a aplicação de 100 kg N/ha em cobertura.

Galindo et al. (2019) demonstraram que a inoculação de plantas de milho com *Azospirillum brasilense* permitia otimizar a utilização de azoto, diminuindo a necessidade de fertilização azotada. Comparando plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* e plantas não inoculadas, para o mesmo nível de fertilização azotada, a inoculação levou a um aumento do índice de clorofila foliar, diâmetro do caule, comprimento das espigas e eficiência do uso de azoto, tendo um efeito de aumento de produtividade. Concluíram também que a aplicação de 100 kg N/ha na forma de ureia em plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* seria a modalidade economicamente mais rentável de todas as modalidades em estudo.

Azospirillum spp. podem também ter um efeito benéfico na melhoria da absorção de nutrientes pelas plantas. Ardakani et al. (2011) analisaram a influência de *Azospirillum brasilense* e outros biofertilizantes na absorção de nutrientes (azoto, fósforo e potássio) por plantas de trigo. *Azospirillum brasilense* provocou um maior desenvolvimento do sistema radicular e teve um efeito benéfico na absorção dos três macronutrientes principais. Concluíram ainda que a aplicação de estrume, micorrizas e *Azospirillum brasilense* tem um efeito sinérgico, aumentando ainda mais o desenvolvimento radicular e a absorção de nutrientes.

A solubilização de fósforo do solo pode ser outro dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal de *Azospirillum* spp.. Rodriguez et al. (2004) concluíram que as estirpes Cd e 8-I de *Azospirillum brasilense* e a estirpe JA4 de *Azospirillum lipoferum* eram capazes de produzir ácido glucónico quando cultivadas num meio com fosfato de cálcio pouco solúvel. Dado que um dos principais mecanismos de solubilização de fosfato mineral é através da produção de ácidos orgânicos (Rodríguez & Fraga, 1999), conclui-se que as duas estirpes de *Azospirillum brasilense* e a estirpe JA4 de *Azospirillum lipoferum* são capazes de solubilizar fosfatos, que se encontrem em formas insolúveis, através da produção de ácido glucónico, um ácido orgânico.

A tolerância a stresses abióticos, tais como a salinidade ou o stress hídrico pode ser outra das vantagens de *Azospirillum* spp.. A inoculação de sementes de alface com *Azospirillum brasilense* estirpe Sp245 resulta num aumento de massa das alfaces em diferentes concentrações de NaCl no solo, levando também a um aumento da taxa de germinação das sementes inoculadas (Barassi et al., 2006). Fasciglione et al. (2015) demonstraram também que a inoculação de plantas de alface com *Azospirillum* spp. aumentou a produtividade, o valor nutricional e também a vida útil, após a colheita, de alfaces cultivadas sob condições de stress salino.

Azospirillum spp. podem ter também um efeito benéfico na supressão de doenças do solo (Bashan & De-Bashan, 2010). Hassouna et al. (1998) concluiu que *A. brasilense* causou uma redução de 90 a 96% da massa de micélio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 72 a 94% de *Rhizoctonia solani*, 71 a 95% de *Pythium* spp. e eliminou totalmente o micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de pepino cultivadas in vitro.

2.3. Avaliação da qualidade do solo

Para ser feita uma avaliação da qualidade do solo e assegurar que estão a ser tomadas medidas que visam o incremento dessa qualidade é necessário ter em conta diversos indicadores. Os indicadores da qualidade do solo podem dividir-se em visuais, físicos, químicos e biológicos.

Os indicadores visuais baseiam-se apenas na observação visual do solo, presença de marcas de erosão, tipo de cobertura do solo, presença de marcas de ação antropogénica possíveis de degradar o solo, entre outras (Martinez et al., 2010).

Os indicadores físicos estão relacionados com a organização das partículas de solo, porosidade e a capacidade de penetração das raízes. Estes indicadores são a profundidade do solo, densidade aparente, porosidade, estabilidade dos agregados, textura e compactação (Martinez et al., 2010).

Os indicadores químicos da qualidade do solo incluem: pH, quantidade de matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes, capacidade de troca catiónica (CTC), reciclagem de nutrientes e a presença de contaminantes tais como metais pesados (Martinez et al., 2010).

São considerados indicadores biológicos da qualidade do solo parâmetros como: a concentração de organismos do solo, quer sejam macrorganismos (principalmente insetos), quer microrganismos como fungos, bactérias ou nemátodes (biomassa microbiana); a quantificação da respiração microbiana, utilizada como medida da decomposição de matéria orgânica e da atividade microbiana de uma forma abrangente; a atividade enzimática, devido ao importante papel de algumas enzimas na reciclagem de nutrientes (Alkorta et al., 2003). A quantificação da atividade de enzimas tais como: desidrogenase, β -glicosidases, urease, amidases, fosfatases, arilsulfatase, celulasas e fenoloxidasas pode dar indicações acerca de diferentes funções do solo (Nielsen & Winding, 2002).

A enzima desidrogenase dá uma indicação geral da atividade microbiana, estando envolvida nos processos de respiração dos microrganismos (Nielsen & Winding, 2002). As desidrogenases são enzimas intracelulares do grupo das oxirredutases, geralmente presentes em grande quantidade nos solos. As desidrogenases desempenham um papel fundamental na oxidação biológica da matéria orgânica, transferindo hidrogénio de substratos orgânicos para aceptadores inorgânicos (Kumar et al., 2013; Wolińska & Stepniewska, 2012). Pode também ser utilizado um quociente metabólico que relaciona a respiração microbiana por unidade de biomassa (Xu et al., 2017).

A taxa de decomposição dos resíduos das plantas ou a quantificação do número de sementes de plantas infestantes podem ser também considerados indicadores biológicos da qualidade do solo (Martinez et al., 2010).

3. Materiais e métodos

3.1. Descrição do local

3.1.1. Localização do ensaio

O ensaio decorreu na empresa Carlos Neves Unipessoal Lda., numa parcela de terreno (Fig. 4) localizada entre Enxara do Bispo e Tourinha, União Das Freguesias De Enxara Do Bispo, Gradil e Vila Franca Do Rosário no concelho de Mafra (38°59'25.994"N 9°14'53.585"W). Todo o terreno estava, na época do ensaio, dedicado à produção de diversas cultivares de alface.



Figura 4 - Fotografia aérea da parcela onde decorreu o ensaio (Google Earth)

3.1.2. Caracterização edafoclimática

De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger o clima da região onde decorreu o ensaio é Csb, clima temperado com verão seco e suave (IPMA, 2024). Para a caracterização do clima recorreu-se à normal climatológica de 1981-2010, da estação do IPMA localizada em Lisboa - Avenida Gago Coutinho, que se situa a aproximadamente 30 km da exploração (Fig. 5).

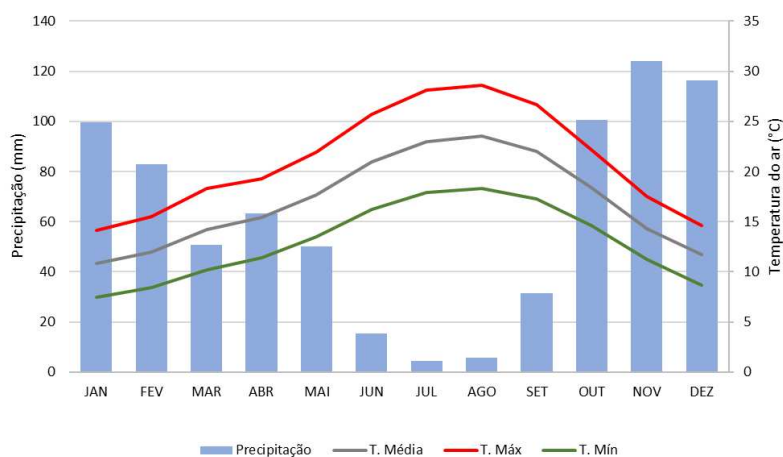


Figura 5 - Normais climatológicas da região de Lisboa e Vale do Tejo, estação climatológica do IPMA Lisboa / Gago Coutinho 1981-2010 (IPMA, 2023)

Como é característico do clima mediterrânico, os meses de verão, com temperaturas mais elevadas são os meses com menores valores de precipitação. Os meses com temperaturas mais baixas apresentam maiores valores de precipitação.

Os meses de cultivo de alface ao ar livre são geralmente entre março e outubro, sendo que a ocorrência de temperaturas extremas pode afetar negativamente a cultura. O número médio de dias com ocorrência de geada é de 0,1 dias/ano, sendo este um acontecimento relativamente raro, ocorrendo principalmente nos meses de inverno quando não há cultivo de alface ao ar livre. O número médio de dias muito quentes (temperatura máxima do ar superior ou igual a 35 °C) é também relativamente reduzido, em média 6,1 dias muito quentes por ano (IPMA, 2023).

Para realizar uma comparação entre a normal climática de 1981-2010 e as condições meteorológicas do ano 2024, recorreu-se aos dados estação meteorológica do COTHN (Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional) localizada no Carrascal, a cerca de 3 km do terreno onde decorreram os ensaios (Figura 6).

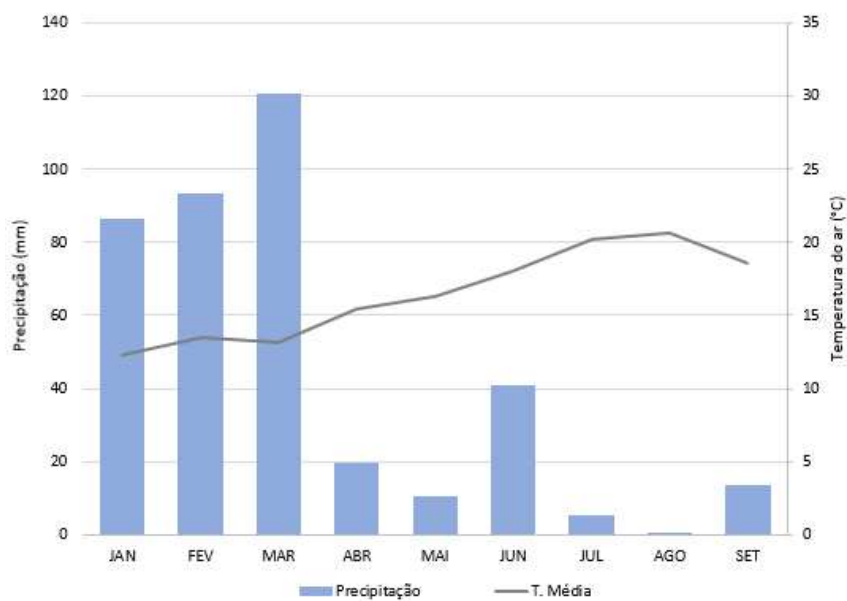


Figura 6 - Precipitação e temperatura média no ano 2024 na estação meteorológica do Carrascal (COTHN)

Na Figura 7 pode verificar-se, em comparação com a normal climática de Lisboa, que em 2024 houve uma precipitação mais intensa em março e relativamente baixa nos meses de abril e maio. Em junho, quando foi instalado o primeiro ensaio, a precipitação foi relativamente elevada e a temperatura média foi de cerca de 18 °C. Nos meses de julho e agosto a precipitação foi reduzida, a temperatura média foi próxima de 20 °C em ambos os meses (Figura 7). No mês de setembro ocorreu alguma precipitação, cerca de 15 mm, e a temperatura média já foi um pouco mais baixa, cerca de 18 °C.

As temperaturas máximas registadas no ano de 2024 foram de cerca de 35 °C e ocorreram principalmente no final do mês de julho, sendo que nessas datas nenhum dos ensaios estava no terreno.

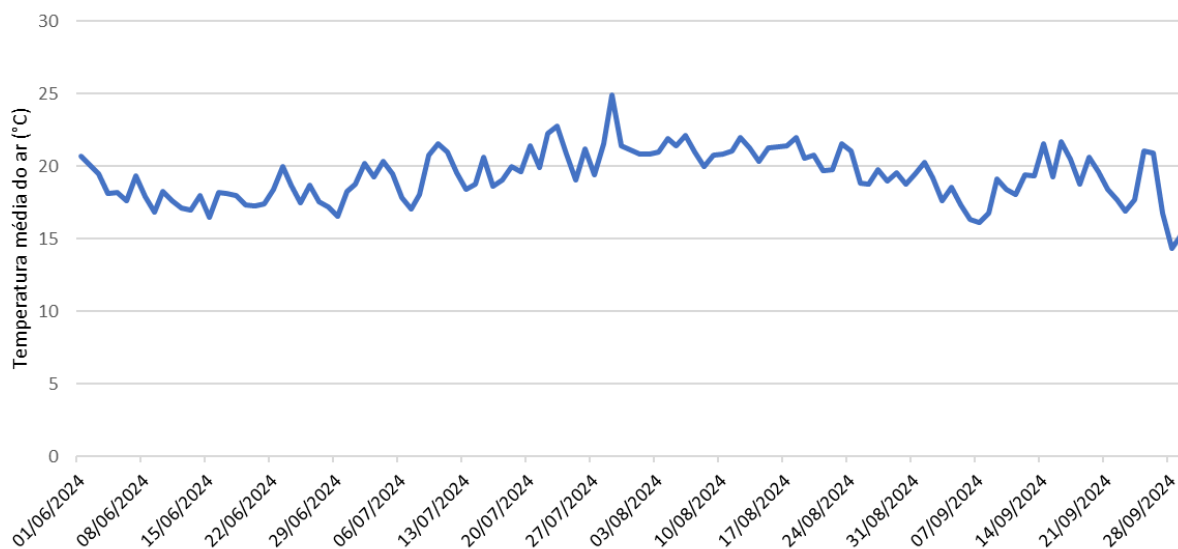


Figura 7 - Temperaturas médias diárias do ar entre junho e setembro de 2024 na estação meteorológica do Carrascal (COTHN)

Relativamente às temperaturas médias diárias do ar durante os meses em que os ensaios decorreram, verifica-se uma certa estabilidade entre 18 e os 22 °C na maioria dos dias. A temperatura média diária apenas foi inferior a 15 °C em um dia e nunca ultrapassou os 25 °C, temperaturas favoráveis ao crescimento da alface e que evitam a indução de floração, que ocorre com temperaturas superiores a 33 °C (Almeida, 2006).

De acordo com Cardoso (1965), disponibilizado por DGADR (2024), os solos da exploração agrícola onde decorreu este ensaio são Solos Incipientes Aluviossilos Modernos Calcários (Para-Solos Calcários) de textura mediana. A ordem dos Solos Incipientes caracteriza-se por solos não evoluídos, sem horizontes genéticos claramente diferenciados, praticamente reduzidos ao material originário. Os aluviossilos são solos incipientes, não hidromórficos, constituídos por depósitos estratificados de aluviões.

3.2. Ensaio de campo

3.2.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado neste ensaio foram plantas de alface da cultivar FLEXION RZ, desenvolvida pela empresa Rijk Zwaan. Esta é uma cultivar de alface frisada de cor verde, adequada para o cultivo ao ar livre durante a época de primavera e verão. É uma cultivar bastante precoce e as plantas são geralmente volumosas, apresentando espigamento lento. Apresenta resistência a fusariose, míldio e ao vírus do mosaico da alface. Estas plantas foram semeadas em *mottes* por um viveiro especializado e após cerca de 15 dias foram plantadas no terreno.

3.2.2. Materiais aplicados

Neste ensaio foi aplicado o adubo orgânico Fertimax cavalo e o regenerador microbiano rizosférico VitaSoil.

Fertimax Cavalo é um adubo orgânico azotado granulado da empresa Nutrofertil. É produzido à base de estrume de cavalo (75%) e resíduos florestais (25%). Apresenta na sua composição: 3,08% de azoto total (N), sendo 3% de azoto orgânico; 0,8% de fósforo total (P₂O₅); 0,4% de potássio total (K₂O); 1,6% de cálcio total (Ca); 0,3% de magnésio total (MgO). Para culturas hortícolas a dose recomendada é de 1500 a 3500 kg/ha.

VitaSoil é produto da empresa Symborg. De acordo com esta empresa, trata-se de um complexo ativo natural, fortificante e regenerador da microfauna do solo, que contém microrganismos rizosféricos (rizobactérias) que promovem uma regeneração dos solos cultivados em sistemas de agricultura intensiva, tais como *Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp. A aplicação de VitaSoil tem como principal efeito a regeneração biológica de solos de culturas intensivas, estabelecendo uma flora microbiana rizosférica eficiente que garante um desenvolvimento adequado de diferentes culturas. Desta forma garante uma maior atividade microbiana, maior eficiência na reciclagem de nutrientes do solo e promove um ambiente adequado para o desenvolvimento das culturas. A dosagem recomendada é de 10 l/ha com uma aplicação mensal.

3.2.3. Esquema experimental

O ensaio teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de matéria orgânica, através da aplicação do adubo orgânico Fertimax, e de rizobactérias, através do produto VitaSoil, na produção e rendimento da cultura da alface, bem como nas propriedades biológicas do solo.

Desta forma, delimitaram-se quatro talhões de terreno semelhantes, cada um com uma dimensão aproximada de 225 m² (50 x 4,5 m) (Fig. 8).

Neste terreno foram realizadas duas plantações sucessivas, no mesmo local, onde foi aplicado o mesmo esquema experimental aos quatro talhões. Entre a colheita da primeira plantação de alface e a segunda plantação decorreu aproximadamente um mês, durante o qual o solo não teve qualquer tipo de cobertura.

Talhão A Fertimax Cavalo VitaSoil	Talhão C VitaSoil
Talhão B Fertimax Cavalo	Talhão D Testemunha

Figura 8 - Esquema experimental

No talhão A aplicou-se um adubo orgânico azotado granulado (Fertimax cavalo) e o produto VitaSoil.

No talhão B aplicou-se apenas adubo orgânico azotado granulado (Fertimax cavalo).

No talhão C aplicou-se apenas o produto VitaSoil.

No talhão D não foi aplicado adubo orgânico nem produto VitaSoil, sendo este o grupo de controlo.

Apenas se realizaram 4 talhões, sem repetições de cada uma das modalidades, devido à necessidade de conciliar este ensaio com a logística de produção do agricultor.

O adubo orgânico azotado granulado, Fertimax cavalo, foi aplicado ao solo antes da aplicação do plástico negro de *mulching*. Foi aplicada uma taxa de aproximadamente 2400 kg/ha.

O produto VitaSoil foi aplicado através da água de rega, por rega gota-a-gota. A aplicação foi feita uma semana após a plantação, aquando da primeira rega feita pelo sistema gota-a-gota. Na primeira plantação a aplicação foi realizada no dia 4 de julho, na segunda plantação a aplicação de VitaSoil foi feita no dia 30 de agosto. A dose de aplicação foi a recomendada pelo fabricante, 10 l/ha.

3.3. Práticas culturais no campo experimental

3.3.1. Preparação do solo

No outono de 2023 realizou-se a sementeira de uma mistura de trigo com fava. Esta mistura foi incorporada no terreno em março de 2024, antes do início da campanha de alface de ar livre de primavera verão.

A preparação do solo começou por uma gradagem para incorporação desta cultura de cobertura, seguiu-se uma subsolagem para descompactação do solo a maior profundidade. Seguiu-se uma primeira fresagem do solo e aplicação de um adubo orgânico azotado granulado nos talhões A e B. Por fim, realizou-se outra fresagem com a aplicação do plástico negro perfurado para *mulching* e da fita de rega.

Após a colheita da primeira plantação o plástico negro e fita de rega foram removidos. O terreno ficou sem qualquer cobertura durante cerca de um mês. Após este período foi feita uma subsolagem e duas fresagens, de modo a garantir um bom esmiuçamento do solo.

Posteriormente foi aplicado adubo orgânico azotado granulado, nos talhões A e B e, por fim, realizou-se outra fresagem simultânea à aplicação do plástico negro perfurado para *mulching* e da fita de rega.

3.3.2. Instalação da cultura

A instalação da cultura de alface foi feita através de plantação manual de plantas de alface produzidas em mottes. A plantação é feita através da colocação dos *mottes* em cima do solo, nos orifícios do plástico. O espaçamento entre plantas foi de cerca de 28x28 cm, sendo a densidade de plantação de cerca de 120 000 plantas/ha.

A primeira plantação decorreu nos dias 13 e 14 de junho de 2024. Na primeira plantação foram aplicados em cada talhão 3 linhas de plástico negro para *mulching*, cada um com uma largura de cerca de 1,40 m (Fig. 9 e 10).

A segunda plantação ocorreu no dia 22 de agosto, exatamente no mesmo local da primeira. Nesta plantação, devido a uma alteração na tecnologia de produção, foram aplicados em cada talhão quatro linhas de plástico negro cada uma com uma largura de cerca de 85 cm (Fig. 11 e 12).

Em ambos os casos, a rega foi feita através de um sistema de aspersão fixa durante uma semana após a plantação. Após este período a rega passou a ser feita através do sistema gota-a-gota.

As datas das principais operações culturais encontram-se detalhadas no Quadro 5.



Figura 9 - Montagem do 1º ensaio (vista Este)



Figura 10 - Montagem do 1º ensaio (vista Oeste)



Figura 11 - Montagem do 2º ensaio (vista Este)



Figura 12 - Montagem do 2º ensaio (vista Oeste)

Quadro 5 - Principais operações culturais realizadas no ensaio

Data	Operação cultural
out/23	Sementeira da cultura de cobertura
mar/24	Incorporação da cultura de cobertura e subsolagem
11/jun/24	Fresagem e aplicação de Fertimax (talhões A e B)
12/jun/24	Fresagem e aplicação do plástico negro e fita de rega
14/jun/24	1ª Plantação
21/jun/24	Aplicação de Vitasoil (talhões A e C)
24/jun/24	Aplicação de fertilizante Hemostar Proteico
16/jul/24	1ª Colheita
20 a 25/jul/24	Remoção dos plásticos e fitas de rega
15/ago/24	Subsolagem e fresagem
19/ago/24	Fresagem e aplicação de Fertimax (talhões A e B)
20/ago/24	Fresagem e aplicação do plástico negro e fita de rega
22/ago/24	2ª Plantação
30/ago/24	Aplicação de Vitasoil (talhões A e C)
03/set/24	Aplicação de fertilizante Hemostar Proteico
01/out/24	2ª Colheita

3.3.3. Tratamentos fitossanitários e fertilização

No Quadro 6 são apresentados os tratamentos fitossanitários realizados em cada um dos ensaios e os respectivos inimigos alvo.

Quadro 6 - Produtos fitofarmacêuticos aplicados na cultura

	Substância ativa	Marca comercial	Produto Fitofarmacêutico	Data de aplicação	Praga/Doença alvo	Intervalo de segurança
1ª Plantação	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	Trianum P	Fungicida	10/06/2024	Fungos do solo	-
	Espirotetramato	Movento Gold	Inseticida	10/06/2024	Lagartas de folhas	7 dias
	<i>Bacillus thuringiensis</i> estirpe GC-91 (ssp. <i>aizawai</i> x ssp. <i>kurstaki</i>)	Turex	Inseticida	01/07/2024 9/07/2024	Lagartas de folhas	-
2ª Plantação	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	Trianum P	Fungicida	19/08/2024	Fungos do solo	-
	Nemátodes entomopatogênicos - <i>Steinernema feltiae</i>	Capirel	Inseticida	03/09/2024	Lagartas de folhas	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> estirpe GC-91 (ssp. <i>aizawai</i> x ssp. <i>kurstaki</i>)	Turex	Inseticida	10/09/2024 17/09/2024	Lagartas de folhas	-

A fertilização foi feita através da aplicação de Hemostar Proteico (Quadro 7) em todas as modalidades. Este é um fertilizante líquido que foi aplicado através do sistema de rega gota-a-gota. Foi aplicada uma dose de 40 L/ha cerca de 2 semanas após cada uma das plantações de alface.

Nas modalidades A e B também deverá ser contabilizado o fornecimento de nutrientes pelo adubo orgânico azotado Fertimax (Quadros 7 e 8), apesar de parte dos nutrientes fornecidos estarem na forma orgânica.

Quadro 7 - Nutrientes fornecidos pelos fertilizantes Hemostar proteico e Fertimax

Parâmetros	Hemostar Proteico	Fertimax Cavalo	Total (modalidades A e B)
Matéria Orgânica (kg/ha)	8,28	1272	1280,28
Azoto Total (N) (kg/ha)	1,20	73,92	75,12
Azoto Orgânico (N) (kg/ha)	1,06	73,9	74,98
Fósforo Total (P ₂ O ₅) (kg/ha)	3,68	19,2	22,88
Potássio Total (K ₂ O) (kg/ha)	2,30	9,6	11,9
Cálcio Total (kg/ha)	-	38,4	38,4
Magnésio Total (kg/ha)	-	7,2	7,2
Aminoácidos Livres (kg/ha)	0,92	-	0,92

Quadro 8 - Micronutrientes e metais pesados presentes no adubo orgânico Fertimax

Fertimax Cavalo		
Parâmetros	Composição (mg/kg)	Unidades aplicadas (kg/ha)
Boro Total	40	0,096
Cobre	45	0,108
Zinco	150	0,36
Níquel	9	0,0216
Cádmio	0,4	0,00096
Chumbo	10	0,024
Crômio	20	0,048
Mercúrio	0,1	0,00024

3.3.4. Observações no campo e recolha de amostras de solo

Realizaram-se visitas semanais ao campo, com vista ao acompanhamento do ciclo da cultura e para avaliar a presença de algum indício de praga e sintomas/sinais de doenças que afetem a cultura da alface. Estas visitas foram também necessárias para a recolha das amostras de solo.

Ao longo do ensaio recolheram-se amostras de solo em oito datas distintas. Foram recolhidas três amostras de terra compostas (retiradas de cinco locais, em formato de estrela) por cada modalidade (Fig. 13). As amostras foram recolhidas debaixo do *mulching*, junto às raízes das plantas na profundidade 0-15 cm.

Talhão A	Talhão C
A3	C3
A2	C2
A1	C1
Talhão B	Talhão D
B3	D3
B2	D2
B1	D1

Figura 13 - Esquema de colheita das amostras de terra nas diferentes modalidades

Foram realizadas análises químicas às amostras colhidas em três datas. Foi realizado o plaqueamento para crescimento de fungos e para crescimento de bactérias, bem como a determinação da atividade desidrogenásica em todas as amostras de forma a avaliar a evolução destes indicadores ao longo das culturas e a influência dos diferentes tratamentos na atividade e presença de microrganismos no solo. O tipo de análise realizada e data das colheitas está expresso no Quadro 9.

As amostras foram recolhidas com uma periodicidade de cerca de 15 dias, fazendo-se coincidir com operações culturais importantes como a aplicação de VitaSoil ou colheita. A primeira recolha de amostras de terra deu-se no dia 21 de junho, exatamente antes da aplicação de VitaSoil na primeira plantação de alface. Fez-se também coincidir uma das amostras com dia da colheita a 16 de julho. No dia 30 de agosto foi realizada também uma recolha de solo antes da aplicação de VitaSoil na segunda plantação de alface e foram também recolhidas amostras no dia da segunda colheita, a 1 de outubro.

Quadro 9 - Cronograma das recolhas de amostras de solo

Operação	Data	Análises realizadas	Observações
1ª Plantação	14/jun		
1ª Amostra de terra	21/jun	Químicas, Plaqueamento e Atividade desidrogenásica	Antes da aplicação de VitaSoil
2ª Amostra de terra	04/jul	Plaqueamento e Atividade desidrogenásica	
3ª Amostra de terra	16/jul	Plaqueamento e Atividade desidrogenásica	Após a colheita
4ª Amostra de terra	30/jul	Plaqueamento e Atividade desidrogenásica	
5ª Amostra de terra	10/ago	Químicas, Plaqueamento e Atividade desidrogenásica	
2ª Plantação	22/ago		
6ª Amostra de terra	30/ago	Plaqueamento e Atividade desidrogenásica	Antes da aplicação de VitaSoil
7ª Amostra de terra	13/set	Plaqueamento e Atividade desidrogenásica	
8ª Amostra de terra	01/out	Químicas, Plaqueamento e Atividade desidrogenásica	Após a colheita

3.3.5. Colheita

A colheita do 1º ensaio foi realizada a 16 de julho de 2024. Foram colhidas 30 alfaces por cada modalidade, de forma aleatória ao longo do talhão, totalizando 120 alfaces no conjunto das 4 modalidades.

A colheita do 2º ensaio realizou-se no dia 1 de outubro, sendo colhidas igualmente 30 alfaces por modalidade.

As alfaces foram limpas de acordo com os padrões de qualidade e exigências dos compradores, foram removidas as folhas que estavam mais próximas do solo, necrosadas ou amareladas e as que apresentavam algum defeito, como alguma podridão ou algum estrago causado por pragas. Posteriormente quantificou-se a massa das alfaces numa balança de campo (Proficook). Só após a pesagem se procedeu à lavagem das alfaces.

3.4. Métodos laboratoriais

3.4.1. Meios de cultura para plaqueamento

A determinação dos microrganismos existentes no solo pode ser feita através de plaqueamento e posterior observação e contagem ao microscópio das unidades formadoras de colónias (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2013).

De forma a avaliar o crescimento de microrganismos do solo, realizou-se o plaqueamento do extrato de solo de cada uma das amostras de solo recolhidas em dois meios de cultura distintos. De forma a verificar o crescimento de bactérias utilizou-se o meio LB (Luria Bertani); este meio foi preparado através da dissolução de 25 g de LB broth (high salt) (Duchefa) e 15 g de agar bacteriological (Scharlau) em 1 L de água destilada. Começou-se por dissolver LB broth em 500 ml de água destilada e o pH foi acertado até ao valor de 7,2 com a adição de NaOH. Após o equilíbrio do pH adicionaram-se os restantes 500 ml de água destilada e o agar. Seguidamente, o meio foi levado à autoclave para esterilização a 120 °C, 1 bar durante 15 minutos. Por fim, dentro de uma câmara de fluxo, colocou-se o meio em placas de Petri que foram fechadas e colocadas à temperatura ambiente.

Para avaliar o crescimento de fungos utilizou-se o meio PDA (*Potato dextrose agar*). Para a sua preparação dissolveram-se 39 g de *Potato Dextrose Agar* (Biokar) em 1 l de água destilada e foi levado à autoclave para esterilização a 120°C, 1 bar durante 15 minutos. Após arrefecimento foi adicionado um antibiótico, que adiante se detalha, com o intuito de evitar o crescimento de bactérias, uma vez que estas possuem, geralmente, um período de crescimento mais reduzido que os fungos. Por fim, dentro de uma câmara de fluxo, colocou-se o meio em placas de Petri que foram fechadas, colocadas dentro de um saco e deixadas à temperatura ambiente.

Para evitar o crescimento de bactéria começou-se por acrescentar ao meio PDA o antibiótico ampicilina numa concentração no meio de 25 µg/ml, mas esta concentração permitiu um elevado crescimento de bactérias (Fig.14). Para verificar se existia alguma resistência específica das bactérias do solo a este antibiótico adicionou-se canamicina a algumas placas e cloranfenicol a outras, verificando-se que há crescimento de bactérias com ambos os antibióticos (Fig.15 e 16). Optou-se então por acrescentar canamicina ao meio PDA numa concentração 50 µg/ml, mas ainda se verificou crescimento de bactérias (Fig. 17). Aumentou-se a concentração de canamicina no meio PDA para 100 µg/ml e, desta forma, conseguiu-se controlar o crescimento de bactérias (Fig. 18).

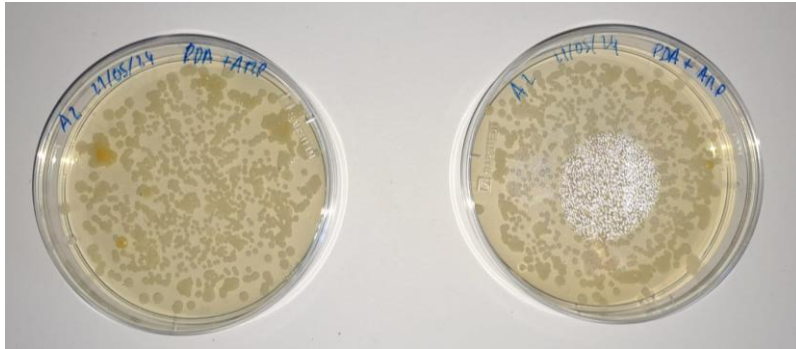


Figura 14 - Plaqueamento em meio PDA+ampicilina [25 μ g/ml]

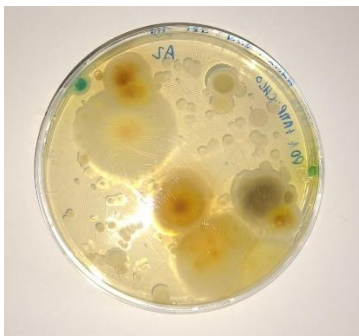


Figura 15 - Plaqueamento em meio PDA+ ampicilina+ cloranfenicol

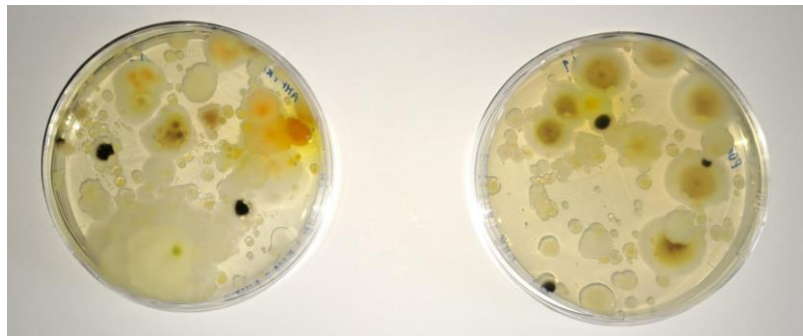


Figura 16 - Plaqueamento em meio PDA+ampicilina+canamicina



Figura 17 - Plaqueamento em meio PDA+canamicina [50 μ g/ml]

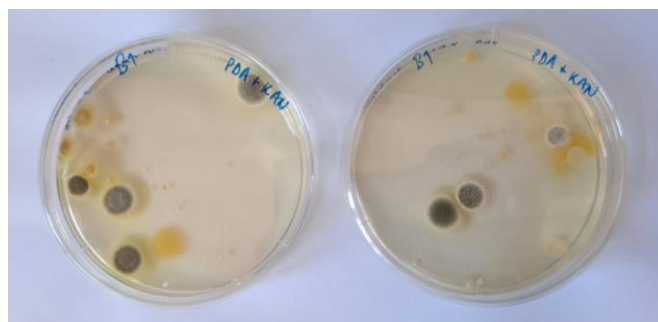


Figura 18 - Plaqueamento em meio PDA+canamicina [100 μ g/ml]

3.4.2. Extrato de solo

O extrato de solo para plaqueamento foi preparado a partir de cada uma das amostras de solo recolhidas. Começou-se por moer a amostra com um pilão num almofariz, pesou-se 0,2 g dessa amostra moída e adicionaram-se 500 µl de água desionizada num tubo de Eppendorf. Colocou-se o tubo num agitador durante 15 minutos (300 rpm à temperatura ambiente) e, por fim, centrifugou-se durante 5 minutos a 1300 rpm.

3.4.3. Plaqueamento

O plaqueamento foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar devidamente desinfetada. Pipetou-se cuidadosamente 100 µl do sobrenadante do extrato de solo preparado para cada placa. Com o auxílio de um espalhador desinfetado, distribuiu-se o extrato de solo de forma uniforme em toda a superfície do meio de cultura.

Após este processo as placas com meio PDA foram colocadas fechadas à temperatura ambiente de forma a avaliar o crescimento de fungos. Após alguns dias foram contadas as colónias formadas e a diversidade de fungos presentes.

As placas com meio LB foram colocadas fechadas numa câmara a 37 °C para o crescimento de bactérias. Após 24 horas as colónias formadas foram contadas.

Para cada amostra de solo retirada foram realizados dois plaqueamentos para fungos e dois plaqueamentos para bactérias. O número de colónias formadas de fungos ou de bactérias das duas placas da mesma amostra foram somados para apresentação dos resultados finais.

3.4.4. Atividade da enzima desidrogenase

A medição da atividade desidrogenásica do solo é feita laboratorialmente recorrendo ao método de Casida et al. (1964). É utilizado cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), incolor, que ao ser reduzido pelas desidrogenases presentes no ambiente do solo origina um produto insolúvel de cor vermelha, o trifenilformazano (TPF). O TPF formado é então quantificado por espetofotometria na faixa de luz visível (485 nm), sendo que amostras com uma cor mais avermelhada têm maior atividade desidrogenásica e amostras mais incolores têm menor atividade desidrogenásica (Wolińska & Stepniowska, 2012).

Começou-se por preparar uma solução Tris 0,1 M através da dissolução de 15,76 g de Tris em 1 l de água destilada. O pH foi acertado até ao valor de 7,6 através da adição de NaOH.

Preparou-se também uma solução TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) 1% em Tris, através da dissolução de TTC na solução Tris preparada anteriormente.

Para cada amostra de solo pesaram-se dois tubos com 1 g de solo, previamente moídas num almofariz. Para o controlo, foram adicionados 333 µl de glucose (solução 0,1%) e 666 µl de solução Tris a um tubo de cada amostra de solo (com 1 g). Para a reação foram adicionados, numa câmara escura, 333 µl de glucose (solução 0,1%) e 666 µl de solução TTC a um tubo de cada amostra de solo (com 1 g). Todas as amostras foram colocadas a incubar no escuro, a 30° C com uma ligeira agitação durante 42 horas.

Após o período de incubação, numa câmara escura, foram adicionados 3 ml de metanol a cada tubo de forma a parar a reação e filtrou-se cada uma das amostras. Após a filtração pipetou-se 1 ml de cada amostra para cuvetes e determinou-se a absorvância num espetofotómetro (Cecil CE1011) a um comprimento de onda de 485 nm.

Devido à dificuldade de obter 1 ml de cada amostra para determinar a absorvância houve necessidade de alterar o procedimento, duplicando a escala do procedimento anteriormente realizado. Para cada amostra de solo pesaram-se então 2 tubos com 2 g de solo. Para o controlo adicionaram-se 666 µl de glucose (solução 0,1%) e 1332 µl de solução Tris a um tubo de cada amostra de solo. Para a reação foram adicionados, numa câmara escura, 666 µl de glucose (solução 0,1%) e 1332 µl de solução TTC a um tubo de cada amostra de solo. Todas as amostras foram colocadas a incubar no escuro, a 30° C com uma ligeira agitação durante 42 horas. Após o período de incubação, numa câmara escura, foram adicionados 6 ml de metanol a cada tubo de forma a parar a reação. Cada uma das amostras foi centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos, retirando-se depois 1 ml de sobrenadante para determinação da absorvância num espetofotómetro (Cecil CE1011) a um comprimento de onda de 485 nm.

Devido à indisponibilidade do composto de referência para esta reação, não foi possível realizar uma curva de calibração nem quantificar a atividade enzimática. Os dados são, por isso, apresentados na forma de absorvâncias, permitindo fazer uma comparação entre modalidades e ao longo do ciclo da cultura. Os valores da absorvância foram ajustados através da subtração da absorvância medida na reação de controlo e posterior multiplicação pela percentagem de matéria seca do solo. A matéria seca foi determinada colocando uma amostra de cerca de 500 mg de solo numa estufa a 100 °C durante 72 horas. Após o ajuste dos valores da absorvância, fez-se uma média dos valores de absorvância das 3 amostras retiradas em cada modalidade, ficando apenas com um valor médio por modalidade, para cada amostra.

3.4.5. Análises químicas ao solo

a. pH e condutividade elétrica

Para a medição do pH e da condutividade elétrica do solo pesaram-se 10 g de solo de cada das amostras, aos quais foram adicionados 25 ml de água destilada. As suspensões foram colocadas num agitador mecânico durante 1 hora à temperatura ambiente a 160 rpm. Após a agitação determinou-se o pH através de um potenciômetro (Orion 3 Star Thermo Scientific) (Fig. 19) e a condutividade elétrica através de um condutímetro (Orion Star A212 Thermo Scientific) (Fig. 20).



Figura 19 - Potenciômetro Orion 3 Star Thermo Scientific



Figura 20 - Condutímetro Orion Star A212 Thermo Scientific

b. Matéria orgânica

Para a determinação da matéria orgânica começou-se por pesar cerca de 0,5 g de cada amostra de solo. Estas amostras foram colocadas num analisador elementar (multi EA 4000 Analytik Jena) que mede o conteúdo de carbono total presente em cada uma das amostras.

Devido a uma avaria neste equipamento não foi possível fazer a medição do carbono inorgânico. Assim, identificou-se a amostra de solo que tinha maior valor de pH e mediu-se, num calcímetro de Bernard, o volume de CO₂ libertado pela amostra quando reage com ácido clorídrico. Esta medição resultou num teor de carbono inorgânico inferior a 0,5%, assim assumiu-se que o teor de carbono inorgânico era de 0%.

A partir dos teores de carbono lidos no aparelho, calculou-se o teor de matéria orgânica do solo utilizando a equação

$$MO (\%) = [\text{Carbono total} (\%) - \text{Carbono inorgânico} (\%)] \times 1,724$$

c. Fósforo e potássio extraível

Para a determinar o fósforo e potássio extraíveis do solo, pesaram-se 2 g de solo aos quais se adicionaram 40 ml de solução extratante de Egner-Riehm (lactato de amónio) por cada amostra de solo. As suspensões foram colocadas 2 horas num agitador mecânico à temperatura ambiente a 160 rpm, posteriormente as amostras foram centrifugadas durante 7 minutos a 4000 rpm à temperatura ambiente. Pipetaram-se 10 ml da solução e realizou-se a medição dos elementos num ICP-OES (Thermo Scientific iCAP 7000 Series ICP-OES) (Fig. 21).

d. Cátions não ácidos de troca (Na, K, Ca, Mg)

Para a determinação dos cátions não ácidos de troca do solo, sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), pesaram-se 2 g de solo de cada amostra e adicionaram-se 30 ml de solução extratante de acetato de amônio 1 N em cada uma. As amostras foram colocadas 15 minutos num agitador mecânico a 160 rpm à temperatura ambiente. Seguidamente as amostras foram centrifugadas, realizou-se a pipetagem e a medição dos elementos num ICP-OES, tal como descrito anteriormente.

e. Microelementos extraíveis (Fe, Cu, Zn, Mn)

Para determinar os teores de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) extraíveis do solo, pesaram-se 4 g de solo de cada amostra e adicionaram-se 40 ml de solução extratante de Lakanen (AAAc-EDTA). As suspensões foram colocadas, durante 30 minutos, num agitador mecânico a 160 rpm à temperatura ambiente. Seguidamente as amostras foram centrifugadas, realizou-se a pipetagem e a medição dos elementos num ICP-OES, tal como descrito anteriormente.

f. Boro

Para a determinação do boro extraível pesaram-se 12,5g de solo de cada uma das amostras e adicionaram-se 25 ml de solução extratante CaCl_2 0,01M. Agitaram-se os tubos de forma a humedecer toda a amostra de solo e colocaram-se num digestor a 100 °C durante 10 minutos. Seguidamente as amostras foram centrifugadas, realizou-se a pipetagem e a medição dos elementos num ICP-OES, tal como descrito anteriormente.



Figura 21 - ICP (Thermo Scientific iCAP 7000 Series ICP- OES)

g. Azoto mineral

Para a determinação do azoto mineral do solo (NH_4^+ e NO_3^-), pesaram-se 6 g de solo de cada uma das amostras e adicionaram-se 30 ml de solução extratante de cloreto de potássio (KCl 2 N). As amostras foram colocadas num agitador mecânico durante 1 hora a 160 rpm à temperatura ambiente. Seguidamente, foram centrifugadas durante 7 minutos a 4000 rpm à temperatura ambiente. Pipetaram-se 10 ml da solução e realizou-se a determinação individual do azoto mineral nas formas de NH_4^+ e NO_3^- por espectrofotometria de absorção molecular num auto analisador de fluxo segmentado (Skalar) (Fig.22).

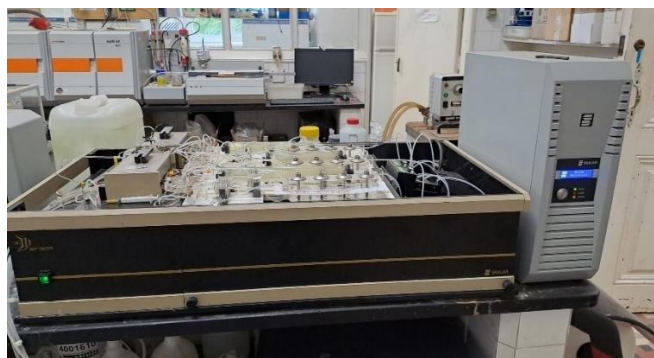


Figura 22 - Auto analisador de fluxo segmentado (Skalar)

3.5. Tratamento dos dados

No caso dos dados das análises químicas ao solo e da atividade desidrogenásica, em que há dados recolhidos nas diferentes modalidades em várias datas, foram realizadas duas análises de variância (ANOVA) cada uma a um fator, seguidas de testes de Tukey, com um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) para discriminar diferenças significativas entre as médias obtidas, sempre que a ANOVA indicou efeito do fator. A validade dos pressupostos de normalidade e homogeneidade da variância dos erros aleatórios foi avaliada graficamente.

Estas duas análises de variância foram utilizadas para discriminar diferenças entre as modalidades para a mesma data e discriminar diferenças dentro da mesma modalidade em datas diferentes. Assim, agruparam-se as duas análises sempre num mesmo quadro, usando letras maiúsculas para diferenças entre datas, na mesma modalidade e letras minúsculas para diferenças entre modalidades na mesma data. Todas as análises estatísticas foram efetuadas utilizando a aplicação R (R Core Team, 2024).

No caso das massas das alfaces colhidas realizou-se uma análise de variância (ANOVA) a um fator, seguida de teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A validade dos pressupostos de normalidade e homogeneidade da variância dos erros aleatórios foi avaliada graficamente.

Os dados referentes a contagens de colónias de bactérias e fungos não sofreram tratamento estatístico. Uma vez que foram feitas duas placas por cada amostra, o número de colónias em cada placa foi somado. Para obtenção de um valor por modalidade somou-se o número de colónias das 3 amostras de cada modalidade, para uma determinada data. No caso das colónias de fungos, contabilizou-se também a diversidade de fungos presentes em cada placa, através do aspeto e cor das colónias formadas.

3.6. Análise económica

Para a realização da análise económica utilizaram-se os dados obtidos da massa média por alface em cada um dos ensaios, a densidade de plantação e o preço de venda fornecido pelo produtor, de forma a obter o valor da receita bruta por modalidade em cada um dos ensaios. Os valores foram reportados à unidade de um hectare para mais fácil compreensão.

Os custos dos produtos Fertimax e VitaSoil e da aplicação de Fertimax foram fornecidos pelo produtor e remetidos também à unidade de um hectare.

Calculou-se a diferença entre a receita bruta e os custos das aplicações dos produtos Fertimax e VitaSoil para cada modalidade, que se optou por não apresentar nos quadros por serem pouco informativos. Apresentou-se o valor de acréscimo de receita de cada modalidade relativamente ao controlo (D), de forma a perceber qual o ganho económico de cada uma das modalidades, relativamente à não aplicação de nenhum dos produtos em estudo.

4. Resultados e discussão

4.1. Produtividade da cultura

No Quadro 10 apresentam-se as massas médias de uma alface, por modalidade, em cada um dos ensaios realizados.

Quadro 10 - Massas médias de alface nos 2 ensaios realizados

	Modalidade	Massa média de 1 alface 1º ensaio (g)	Massa média de 1 alface 2º ensaio (g)
A	Adubo orgânico azotado + Rizobactérias	472,6 ab	516,0 a
B	Adubo orgânico azotado	475,4 a	503,4 a
C	Rizobactérias	450,5 ab	462,7 ab
D	Testemunha	437,6 b	432,4 b

Letras diferentes em coluna correspondem a diferenças significativas nos valores médios pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

No 1º ensaio, em termos absolutos, pode verificar-se que a massa média da modalidade B (onde só foi aplicado o adubo orgânico azotado Fertimax) foi a mais elevada, com uma massa média por alface 9% (37,8 g) superior à modalidade D, o controlo.

No 2º ensaio pode verificar-se que a modalidade A, onde foi aplicado adubo orgânico azotado e o produto VitaSoil (rizobactérias), obteve a maior massa média por alface, sendo este 19% (83,6 g) superior à massa média das alfaces da modalidade D. Também a modalidade B obteve uma massa média por alface elevada, 16% (71 g) superior à modalidade D. A modalidade C, em que só foi aplicado o produto VitaSoil, não apresentou diferenças significativas relativamente a nenhuma das outras modalidades, evidenciando um comportamento intermédio.

Na comparação dos dois ensaios pode verificar-se que, em ambos, a modalidade B apresentou uma massa média por alface significativamente diferente do controlo. A modalidade C, em que só foi aplicado VitaSoil, não apresentou diferenças significativas para nenhuma das outras modalidades em ambos os ensaios. Pode também observar-se que as massas médias por alface no 2º ensaio foram superiores às massas do 1º ensaio em todas as modalidades, com exceção do controlo D. Os efeitos, principalmente da aplicação do adubo orgânico azotado, parecem ser cumulativos, uma vez que nas modalidades em que este composto foi aplicado, houve um aumento significativo da massa média por alface.

Desta forma, o fator que mais parece afetar a massa das alfaces é a aplicação do adubo orgânico azotado, uma vez que, em ambos os ensaios, as modalidades A e B apresentam as maiores massas médias por alface. Para além disso, estas duas modalidades são estatisticamente semelhantes, dando uma ideia do menor efeito do complexo de rizobactérias aplicado em A e C. O efeito isolado da aplicação do complexo de rizobactérias VitaSoil é bastante reduzido, não havendo uma diferença estatística significativa para o controlo.

Os resultados estão de acordo com o demonstrado por Liu et al. (2014), que verificaram que a combinação de adubos orgânicos com fertilizantes líquidos promovia um maior crescimento de alface, tendo também um efeito positivo na qualidade do solo e resultou numa menor acumulação de nitratos nas folhas de alface. Ribeiro et al. (2010) verificaram que a aplicação de um adubo orgânico azotado combinado com a aplicação de estrume pode aumentar a taxa de mineralização de azoto e desta forma fornecer mais azoto às plantas. Esta aplicação combinada de estrume com adubo orgânico azotado foi a modalidade que levou a uma maior produtividade de alface cultivada em vaso.

Através da quantificação da massa média por alface em cada uma das modalidades, nos 2 ensaios realizados foi possível realizar uma análise económica para avaliar qual a modalidade mais benéfica para o agricultor (Quadros 11 e 12).

Quadro 11 - Análise económica das diferentes modalidades no 1º ensaio

Modalidade	Massa média de 1 alface 1º ensaio (kg)	Produtividade (t/ha)	Receita bruta (€/ha)	Custo das aplicações de Fertimax e/ou VitaSoil (€/ha)	Acréscimo de receita relativamente ao controlo (D) (€/ha)
A	0,473 ab	56,7	51 043,04 €	615,80 €	3 164,20 €
B	0,475 a	57,1	51 348,42 €	573,80 €	3 511,58 €
C	0,451 ab	54,1	48 655,86 €	42,00 €	1 350,82 €
D	0,438 b	52,5	47 263,04 €	0,00 €	-

Letras diferentes em coluna correspondem a diferenças significativas nos valores médios pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

Quadro 12- Análise económica das diferentes modalidades no 2º ensaio

Modalidade	Massa média de 1 alface 2º ensaio (kg)	Produtividade (t/ha)	Receita bruta (€/ha)	Custo das aplicações de Fertimax e/ou VitaSoil (€/ha)	Acréscimo de receita relativamente ao controlo (D) (€/ha)
A	0,516 a	61,9	55 724,40 €	615,80 €	8 405,81 €
B	0,503 a	60,4	54 363,60 €	573,80 €	7 087,01 €
C	0,463 ab	55,5	49 968,00 €	42,00 €	3 223,21 €
D	0,432 b	51,9	46 702,80 €	0,00 €	-

Letras diferentes em coluna correspondem a diferenças significativas nos valores médios pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

No Quadro 11, no 1º ensaio, pode observar-se que a modalidade B apresenta uma produtividade por hectare cerca de 5,6 t superior à produtividade do controlo. Esta diferença na produtividade resulta numa grande diferença nas receitas brutas obtidas nestas duas modalidades. Contabilizando os custos associados a esta modalidade (aquisição do adubo orgânico azotado e sua aplicação) observa-se que ainda há um acréscimo de receita de 3500 € relativamente à não aplicação de adubo orgânico azotado e complexo de rizobactérias (modalidade D). A produtividade alcançada na modalidade A foi semelhante à modalidade B, sendo os custos de aplicação superiores, devido ao custo do VitaSoil.

No Quadro 12, na 2ª plantação, pode verificar-se que a modalidade A tem uma produtividade 10 t superior ao controlo. Com a aplicação do adubo orgânico azotado e do complexo de rizobactérias há um acréscimo de receita de 8400 € por hectare.

Nos dois ensaios a modalidade B mostrou-se a mais produtiva e lucrativa, havendo um ganho económico significativo relativamente ao controlo. A modalidade C apresenta-se como mais económica, pois a aquisição e aplicação de Fertimax é dispendiosa, mas a produtividade é bastante inferior. A modalidade D tem menor produtividade em ambos os ensaios, reforçando a importância da aplicação do adubo orgânico azotado.

Se, durante a campanha de primavera-verão de 2024 tivessem sido aplicados os tratamentos da modalidade B (Fertimax) nas duas produções de alface realizadas naquele terreno, o produtor teria um aumento de receita de cerca de 10 500 €/ha relativamente à não aplicação deste produto.

No contexto empresarial, a aplicação de qualquer um destes dois produtos revelou ser possível e de relativa facilidade para o produtor. O produtor já tinha incluído no calendário de operações para a cultura da alface a aplicação de um adubo orgânico, dispondo já de todo o equipamento necessário para a sua aplicação. Relativamente ao complexo de rizobactérias, a sua aplicação é realizada através da água de rega. O produtor utiliza o sistema de rega gota-a-gota e possui um sistema de injeção de fertilizantes, pelo que a sua aplicação também se tornou fácil, sem necessidade de investimento em nenhum material.

4.2. Impacto das modalidades nas propriedades biológicas e químicas do solo

4.2.1 Fungos

Após o plaqueamento do extrato de solo das diversas amostras, contabilizou-se o número de colônias de fungos e agruparam-se, de forma a obter um valor por modalidade, para uma determinada data.

Nas Figuras 23 e 24 pode observar-se o crescimento de fungos nas duas placas da amostra D1 de 30/08/2024.



Figura 23 - Plaqueamento de fungos (meio PDA+Canamicina) da amostra D1 de 30/08/2024 (vista superior da placa)

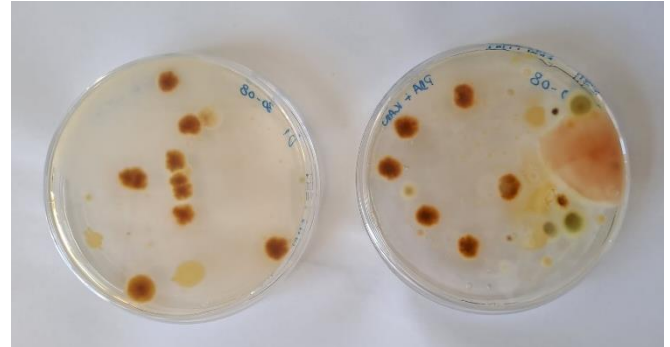


Figura 24 - Plaqueamento de fungos (meio PDA+Canamicina) da amostra D1 de 30/08/2024 (vista inferior da placa)

Pode observar-se, na Figura 25, a evolução do número de fungos, agrupados por modalidade, contabilizados no plaqueamento do extrato de solo em meio PDA ao longo de todo o ensaio.

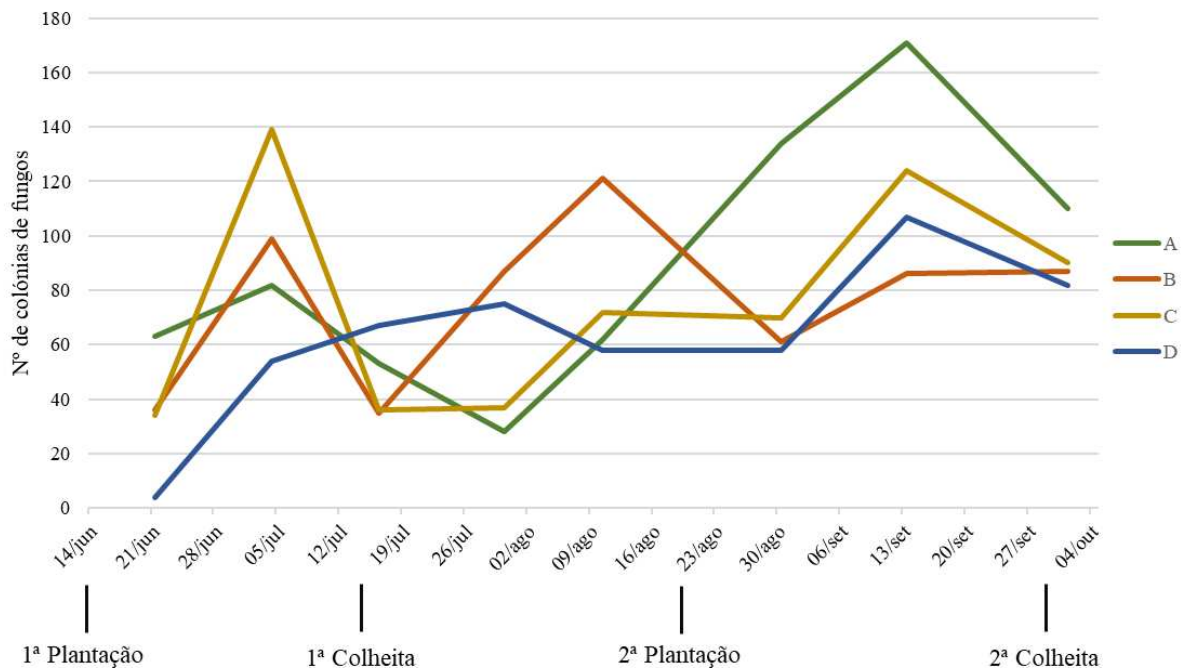


Figura 25 - Evolução do número de colônias de fungos contabilizados no plaqueamento do extrato de solo

De uma forma geral, no início do ensaio, na primeira amostra de terra retirada, verifica-se que o número de fungos que cresceram nas placas foi, de uma forma geral, reduzido. Isto pode dever-se ao período de vários meses, entre o final do outono e o início da primavera, em que o campo esteve semeado com culturas de cobertura e houve uma pausa na cultura habitualmente cultivada, a alfaca. Intervalos de cultivo de monoculturas, especialmente se forem utilizadas culturas de cobertura podem alterar o microbioma de fungos do solo (Ali et al., 2022). As mobilizações realizadas para a instalação da cultura são algo intensas, podendo levar a uma diminuição de fungos no solo.

Com o avançar das culturas há uma tendência de aumento no número de fungos contabilizados, com maior incidência nas amostras de 13 de setembro (com exceção da modalidade B). Este maior número de fungos no solo com o avançar da cultura poderá estar relacionado com a sucessão da mesma cultura no mesmo local, uma vez que foram realizadas duas plantações sucessivas.

Na modalidade A observa-se um ligeiro aumento do número de fungos após a primeira aplicação do complexo de rizobactérias VitaSoil e um decréscimo acentuado após a colheita, sugerindo que o complexo de rizobactérias promoveu um crescimento de fungos no solo e com a ausência da cultura estes fungos deixaram de se desenvolver. Após a segunda plantação e a nova aplicação de VitaSoil há um crescimento importante dos fungos do solo, seguido de uma redução abrupta até à colheita, podendo dever-se a uma diminuição dos recursos disponíveis e também da temperatura (ver 3.1.2.).

Na modalidade B há um crescimento do número de fungos até ao dia 4 de julho, após essa data observa-se um decréscimo. Segue-se um pico durante o período em que o solo estava sem qualquer cultura, este dado pode sugerir que a maioria dos fungos presentes no solo seriam independentes da cultura da alfaca que estava a ser cultivada. Após a segunda plantação ocorre novamente um aumento, menos acentuado, no número de fungos.

Na modalidade C há um aumento importante do número de fungos após a primeira aplicação do complexo de rizobactérias, mas logo a seguir há uma redução abrupta. Após a segunda aplicação de VitaSoil ocorre novamente um aumento do número de fungos no plaqueamento.

Na modalidade D há um aumento do número de fungos no solo durante a primeira cultura de alfaca, havendo uma redução durante o período sem cultura no solo. Após a segunda plantação ocorre novamente um aumento no número de fungos no solo, mas nunca atingindo os valores observados nas modalidades A e B.

Ao analisar ambos os ensaios realizados pode verificar-se que, de uma forma geral, há um maior desenvolvimento de fungos nas modalidades A e B, comparativamente à modalidade de controlo D, apesar de todas as flutuações que ocorreram ao longo dos ensaios e do comportamento distinto das mesmas modalidades nas duas plantações. Provavelmente a adição de matéria orgânica levou a um maior desenvolvimento de fungos. Sun et al. (2016) verificaram que a aplicação de matéria orgânica num longo período levou a um aumento do número de fungos do solo e a alterações na composição da comunidade de fungos do solo.

Para além da quantificação do número de colónias, contabilizou-se também a diversidade aparente de fungos por modalidade (Quadro 13).

Quadro 13 - Diversidade aparente de fungos contabilizados nas diferentes modalidades

Modalidade	21/jun	04/jul	16/jul	30/jul	10/ago	30/ago	13/set	01/out
A	5	6	5	4	5	3	5	4
B	4	4	5	6	5	4	3	4
C	5	5	5	4	4	5	6	4
D	2	5	5	6	4	5	5	4

Ao observar o Quadro 13 pode verificar-se que na diversidade aparente de fungos presentes nas diferentes amostras também não houve um efeito marcado dos tratamentos aplicados em cada modalidade. 15 dias após a primeira aplicação de VitaSoil, no dia 4 de julho, não há um efeito marcado deste produto, havendo um aumento ou manutenção da diversidade de fungos em todas as modalidades. O maior número de colónias de fungos identificadas é também o mesmo para todas as modalidades, 6, apenas identificadas em datas diferentes.

4.2.2. Bactérias

Após o plaqueamento do extrato de solo em meio LB, procedeu-se à contagem de colónias de bactérias, como se pode verificar nas Figuras 26 e 27. A evolução do número de colónias de bactérias contabilizadas no plaqueamento do extrato de solo ao longo de todo o ensaio está representada na Figura 28.

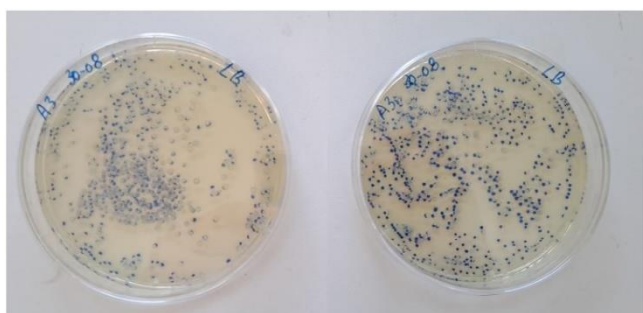


Figura 26 - Plaqueamento de bactérias (meio LB) da amostra A3 de 30/08/2024 (vista superior da placa)

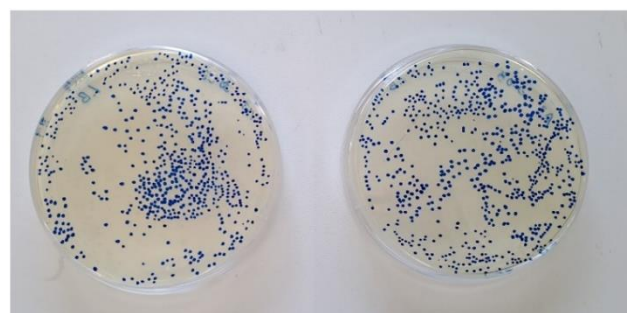


Figura 27 - Plaqueamento de bactérias (meio LB) da amostra A3 de 30/08/2024 (vista inferior da placa)

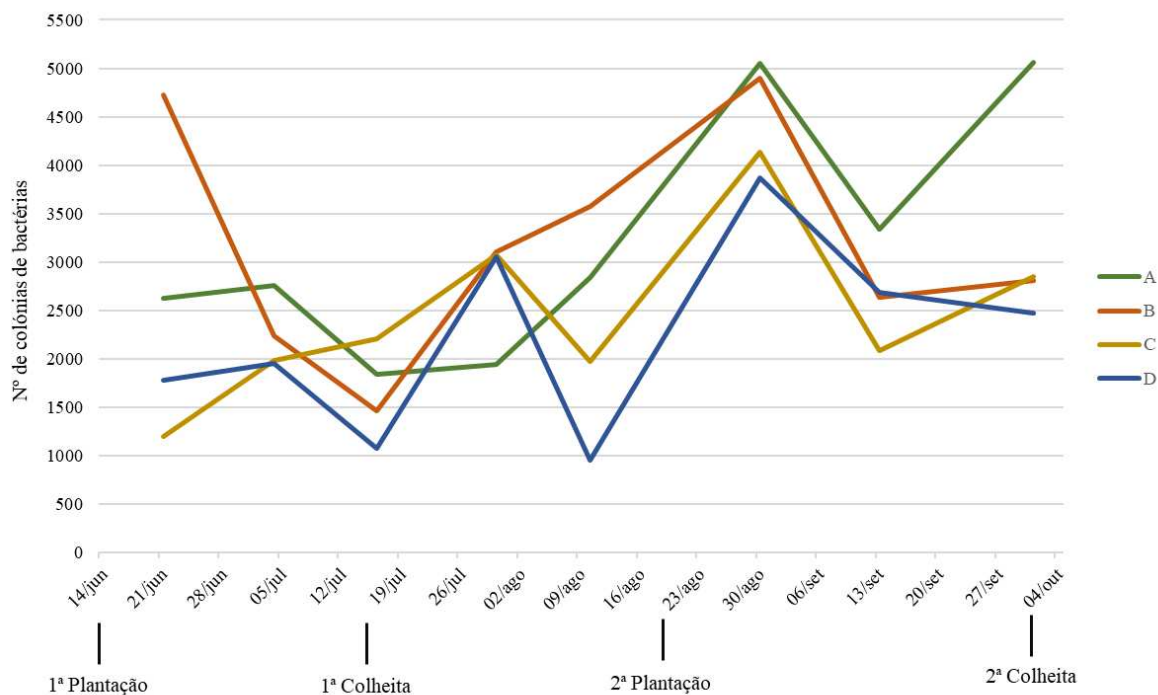


Figura 28 - Evolução do número de colónias de bactérias contabilizadas no plaqueamento do extrato de solo ao longo de todo o ensaio

No início da primeira plantação, as modalidades onde tinha sido previamente aplicado o adubo orgânico azotado (A e B) são as que apresentam maior número de bactérias no extrato de solo. As modalidades C e D apresentam menores valores.

Após 15 dias há um decréscimo elevado na modalidade B. Nas modalidades onde foi aplicado o complexo de rizobactérias (A e C) há um aumento no número de bactérias no solo. No controlo ocorre também um ligeiro aumento.

Até à primeira colheita há um ligeiro decréscimo no número de bactérias em todas as modalidades exceto na modalidade C.

Durante a época de pousio do terreno há alguma variação em todas as modalidades, mas de uma forma geral, há um maior crescimento de bactérias nos grupos onde foi aplicado o adubo orgânico azotado e um decréscimo nos outros dois grupos.

Após a 2ª plantação ocorre um aumento generalizado das bactérias contabilizadas em todas as modalidades, mas mais uma vez, superior nas modalidades onde foi aplicado o adubo orgânico azotado.

Após 15 dias há uma redução em todas as modalidades, não sendo visível nenhum efeito do complexo de rizobactérias VitaSoil, transparecendo uma persistência curta destas rizobactérias no solo.

Até à colheita há um aumento acentuado na modalidade A, sendo que todas as restantes mantêm o número de colónias contabilizadas.

De uma forma geral, verifica-se uma tendência de maior número de colônias de bactérias nas modalidades A e B, com adubo orgânico azotado, e menor número nas modalidades C e D. Esta tendência parece acentuar-se ao longo do tempo, podendo estar relacionado com um efeito cumulativo da aplicação de matéria orgânica.

Em ambos os ensaios parece verificar-se uma persistência das rizobactérias, aplicadas através do complexo VitaSoil, muito curta no solo. Este resultado é corroborado pelos trabalhos de Vuolo et al. (2022), em que, na sua revisão, referem que algumas bactérias promotoras do crescimento vegetal (onde se incluem *Azospirillum* spp. e *Azotobacter* spp.) têm por vezes um tempo de persistência muito curto na rizosfera, especialmente em condições de cultivo ao ar livre, levando a uma baixa eficiência como biofertilizantes.

Callaghan et al. (2022) referem que a adição de carbono orgânico é um dos fatores que pode aumentar a persistência de microrganismos inoculados, mas no presente estudo tal não se verificou.

Realizou-se também plaqueamento dos produtos VitaSoil e Fertimax, verificando-se o crescimento muito elevado de bactérias em ambos os produtos. Desta forma confirmou-se a presença de bactérias viáveis em ambos os produtos.

De forma a avaliar de forma mais clara o efeito cumulativo dos produtos aplicados realizou-se a soma do número total de colônias contabilizadas por modalidade durante todo o ensaio (Quadro 14).

Quadro 14 - Soma do número de colônias de bactérias contabilizadas por modalidade durante toda a duração do ensaio

Modalidade	Nº colônias de bactérias agrupado
A	25455
B	25458
C	19511
D	17841

Ao somar todas as colônias de bactérias contabilizadas pode constatar-se que não é evidente a ação do complexo rizosférico bacteriano VitaSoil no crescimento e desenvolvimento destas colônias.

O adubo orgânico azotado parece ter um efeito mais marcado de aumento do número de colônias presentes nas placas. Verifica-se que os números de colônias de bactérias contabilizadas são semelhantes nas duas modalidades onde este adubo foi aplicado, A e B. Nas modalidades onde não foi aplicado o adubo orgânico azotado (Fertimax), C e D, há um número bastante inferior de colônias contabilizadas. Estes resultados estão de acordo com Alori et al. (2023) e Zhen et al. (2014), que verificaram que a aplicação de um composto orgânico levou a um maior crescimento de bactérias.

4.2.3. Atividade desidrogenásica

A enzima desidrogenase é utilizada como um indicador geral da atividade microbiana do solo, pois existe no interior das células de qualquer microrganismo (Wolińska & Stepniewska, 2012). A atividade da enzima desidrogenase foi contabilizada através da quantificação da absorvância de cada uma das amostras recolhidas ao longo de todo o ensaio.

Na Fig. 29 pode observar-se o grupo de controlo onde não foi adicionado cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), ficando a amostra incolor. Na Fig. 30 observa-se a reação nas diferentes amostras, onde foi adicionado TTC. O TTC foi reduzido pelas desidrogenases presentes no solo, formando um produto insolúvel de cor vermelha o TPF, trifenilformazano.

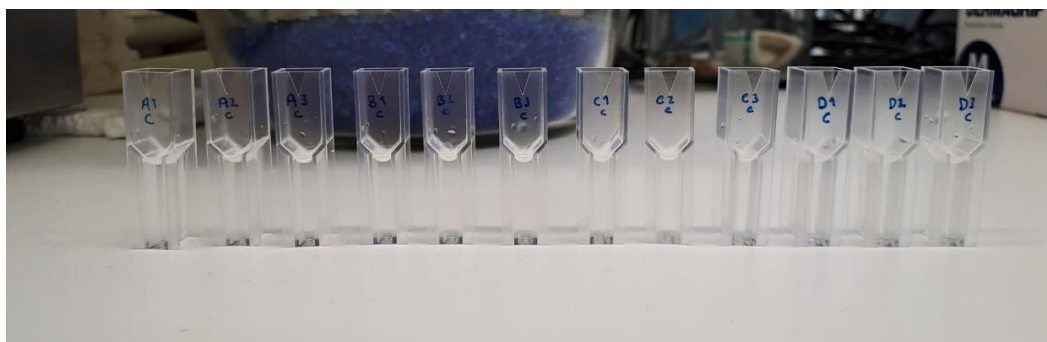


Figura 29 - Cuvetes do grupo de controlo para medição da atividade desidrogenásica (amostra de 4/7/24)

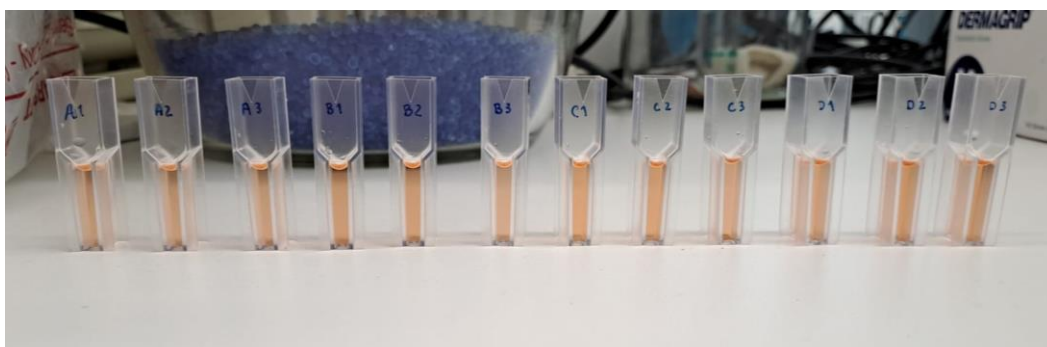


Figura 30 - Cuvetes do grupo de reação para medição da atividade desidrogenásica (amostra de 4/7/24)

A evolução da atividade desidrogenásica ao longo de todo o ensaio encontra-se representada na Figura 31.

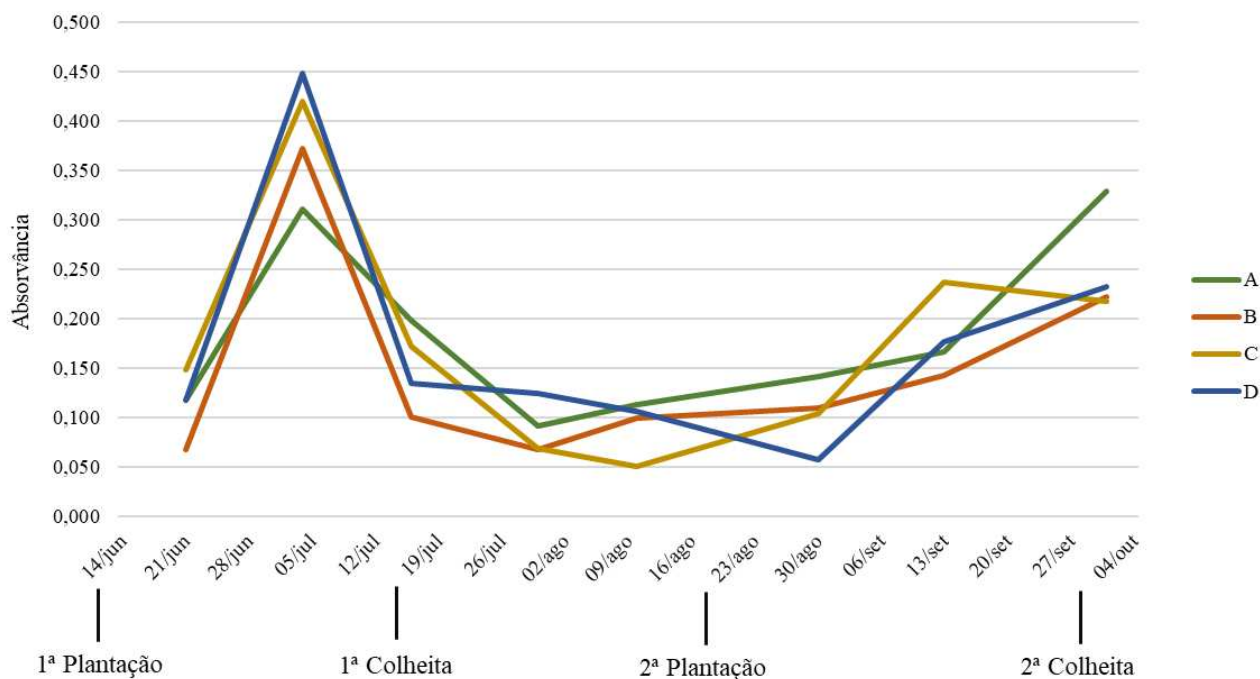


Figura 31 - Evolução da atividade da desidrogenase ao longo do ensaio

Na primeira plantação a atividade enzimática aumenta de forma considerável alcançando um pico na amostra de 4 de julho, sendo que o maior valor alcançado corresponde à modalidade D, o controlo. Após esta data todas as modalidades apresentam uma queda expressiva na atividade enzimática até à colheita. Após a 1ª colheita, durante o período sem cultivo, todas as modalidades apresentaram uma atividade enzimática baixa e similar.

Quando é realizada a 2ª plantação dá-se um aumento gradual da atividade da desidrogenase, excepto na modalidade D, cuja atividade enzimática só começa a aumentar após a amostra de 30 de agosto. Nas modalidades A, B e D há um aumento gradual até à data da colheita, a 1 de outubro. Na modalidade C há um ligeiro decréscimo até à data da colheita.

A modalidade D foi aquela em que a atividade enzimática que aparentou ter um comportamento mais variável; na primeira plantação teve o maior aumento de todas as modalidades e durante o período sem cultivo apresentou um valor de absorvância muito baixo. Esta modalidade apresenta uma resposta da atividade enzimática com grande volatilidade às condições do solo e à presença/ausência de cultura.

De forma a avaliar diferenças significativas da atividade enzimática da desidrogenase entre modalidades e entre datas realizaram-se testes de Tukey com nível de significância de 5% (Quadro 15).

Quadro 15 - Evolução da atividade enzimática da desidrogenase do solo nas diferentes modalidades durante toda a duração do ensaio, apresentada em valores de absorvância no comprimento de onda 485 nm

Modalidade	21/jun	04/jul	16/jul	30/jul	10/ago	30/ago	13/set	01/out
A	0,118 a ABC	0,311 b AB	0,198 a ABC	0,091 a C	0,113 a BC	0,141 a ABC	0,167 a ABC	0,330 a A
B	0,068 a B	0,372 ab A	0,101 a B	0,068 a B	0,100 a B	0,110 ab B	0,142 a B	0,223 a AB
C	0,148 a B	0,420 ab A	0,172 a B	0,069 a B	0,051 a B	0,104 ab B	0,237 a AB	0,217 a AB
D	0,117 a BC	0,448 a A	0,135 a BC	0,124 a BC	0,107 a BC	0,058 b C	0,177 a BC	0,233 a B

Letras maiúsculas correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) na linha (efeito da data)

Letras minúsculas correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) na coluna (efeito da modalidade)

Ao realizar um teste de Tukey aos valores medidos da absorvância verifica-se que na maioria das amostras não há diferenças significativas entre as modalidades, não havendo um padrão que relacione a atividade enzimática com as modalidades.

Apenas nas amostras de 4 de julho e de 30 de agosto há diferenças significativas entre algumas das modalidades. A 4 de julho a modalidade D apresenta uma atividade enzimática superior e significativamente diferente da modalidade A. Nesta data já tinha sido aplicado o complexo de rizobactérias VitaSoil nas amostras A e C, mas não é possível verificar se a diferença na atividade enzimática estaria relacionada com a sua aplicação uma vez que a amostra C não apresenta diferenças significativas para nenhuma das restantes.

Na amostra de 30 de agosto, a modalidade A apresenta uma atividade enzimática superior e significativamente diferente da amostra D. Na altura da recolha das amostras ainda não tinha sido aplicado o complexo de rizobactérias VitaSoil e, uma vez que a amostra B não apresenta diferenças significativas para nenhuma outra, não se pode correlacionar o aumento da atividade desidrogenásica com a aplicação do adubo orgânico azotado, que foi aplicado às amostras A e B.

A atividade desidrogenásica do solo é afetada pelo teor de água do solo, disponibilidade de oxigénio, potencial redox do solo, matéria orgânica, pH, profundidade do solo, temperatura, época do ano, presença de metais pesados e presença de fertilizantes e pesticidas (Wolińska & Stepniewska, 2012). A aplicação de fertilizantes orgânicos a longo prazo leva a um aumento da atividade da enzima desidrogenase no solo (Chu et al., 2007).

Estes dados reforçam a ideia de que não é possível associar de forma clara nenhum efeito da aplicação do adubo orgânico azotado Fertimax ou do complexo de rizobactérias VitaSoil à evolução da atividade da enzima desidrogenase.

4.2.4. Propriedades químicas do solo

Nas amostras de solo de 21 de junho (7 dias após a 1ª plantação), 10 de agosto (durante o período entre culturas) e 1 de outubro (dia da colheita da 2ª plantação) foram realizadas análises químicas a diversos parâmetros.

No Quadro 16 apresentam-se os resultados para os parâmetros pH, condutividade elétrica, teor de matéria orgânica, teor de azoto mineral do solo (na forma NH_4^+ e NO_3^-) e teores de fósforo e potássio extraíveis.

Quadro 16 - Evolução de diversos parâmetros químicos do solo nas diferentes modalidades ao longo do ensaio

Parâmetros	Modalidade	21/jun	10/ago	01/out
pH	A	7,9 a C	8,3 a B	8,6 a A
	B	8,0 a C	8,3 a B	8,5 a A
	C	8,0 a B	8,2 a B	8,5 a A
	D	8,1 a B	8,2 a B	8,6 a A
CE (mS/cm)	A	0,6 a A	0,2 a B	0,2 a B
	B	0,6 a A	0,3 a B	0,3 a B
	C	0,4 a A	0,2 a A	0,3 a A
	D	0,4 a A	0,3 a A	0,3 a A
M.O. (%)	A	2,23 a A	2,11 ab A	2,3 ab A
	B	2,43 a A	2,41 a A	2,52 a A
	C	1,96 a A	1,99 b A	1,95 b A
	D	2,18 a A	2,28 ab A	2,21 ab A
NH_4^+ (mg/kg)	A	2,45 a A	2,02 a A	2,37 a A
	B	2,43 a A	1,83 a A	1,82 a A
	C	1,65 b A	2,17 a A	2,03 a A
	D	1,95 ab A	1,95 a A	1,77 a A
NO_3^- (mg/kg)	A	71,4 a A	13,88 a B	6,27 a B
	B	59,98 a A	14,82 a B	9,52 a B
	C	44,13 a A	13,02 a B	5,60 a B
	D	43,85 a A	15,73 a B	5,30 a B
P_2O_5 (mg/kg)	A	461,8 ab A	390,8 a AB	341,1 b B
	B	525,8 a A	462,1 a A	446,4 a A
	C	346,1 b A	335,7 a A	261,7 b B
	D	429,4 ab A	411,3 a A	325,1 a A
K_2O (mg/kg)	A	370,7 a A	211,0 ab B	197,6 ab B
	B	334,3 ab A	228,4 a B	232,7 a B
	C	256,1 bc A	180,0 c B	161,2 b B
	D	246,3 c A	201,0 bc AB	147,4 b B

Letras maiúsculas correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) na linha (efeito da data)

Letras minúsculas correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) na coluna (efeito da modalidade)

Relativamente à reação do solo verifica-se que não há um efeito significativo das diferentes modalidades em nenhuma das datas. Observa-se que há um aumento de pH ao longo do tempo em todas as modalidades, mais significativo nas modalidades A e B.

A condutividade elétrica foi semelhante entre modalidades nas 3 datas analisadas. Nas modalidades A e B há um aumento ao longo do tempo, provavelmente provocado pela aplicação do adubo orgânico azotado. Roy & Kashem (2014) verificaram um aumento significativo da condutividade elétrica do solo em consequência da aplicação de diferentes tipos de estrumes. A alfaca é uma cultura sensível à salinidade, tolerando valores entre 1 e 3 mS/cm (Santos, 2015), pelo que a aplicação de estrumes ou adubos orgânicos deve ser ponderada. Os valores atingidos neste ensaio não foram críticos para o sucesso da cultura.

O teor de matéria orgânica no solo não apresenta diferenças significativas entre modalidades na 1ª data analisada. Nas amostras de 10 de agosto e de 1 de outubro já se verificam diferenças significativas entre modalidades. A modalidade B apresenta um teor de matéria orgânica superior à modalidade C, demonstrando que a aplicação do adubo orgânico azotado pode ter algum efeito no aumento do teor de matéria orgânica do solo. Ainda assim, verifica-se que ao longo do ensaio não há variações significativas do teor de matéria orgânica no solo em nenhuma das modalidades, mesmo nas modalidades A e B onde foi aplicado por duas vezes um adubo orgânico azotado e se poderia esperar um aumento do teor de matéria orgânica no solo. De acordo com Santos (2015), nos adubos orgânicos azotados com razão C/N (carbono azoto) inferior a 20 há uma rápida mineralização da matéria orgânica e a sua aplicação tem um impacto muito reduzido na formação de húmus no solo. O adubo orgânico azotado aplicado, Fertimax cavalo, apresenta uma razão C/N de 9,9 pelo que pode ter uma baixa contribuição para o aumento da matéria orgânica do solo.

De forma a melhor avaliar a evolução do teor de matéria orgânica no solo deveria ter sido recolhida uma amostra de solo previamente à primeira aplicação de Fertimax.

Em relação ao azoto mineral na forma NH_4^+ pode verificar-se que na amostra de 21 de junho as modalidades A e B apresentam maior quantidade de azoto mineral na forma de NH_4^+ do que a modalidade C. Nas modalidades A e B tinha sido aplicado adubo orgânico azotado a 11 de junho, pelo que este maior teor de NH_4^+ pode ser explicado pela sua recente aplicação.

O teor de azoto mineral na forma NO_3^- no solo não apresenta diferenças significativas entre modalidades em nenhuma das datas analisadas. Verifica-se que no início do ensaio o teor de NO_3^- no solo é elevado em todas as modalidades e com o decorrer do ensaio o teor de NO_3^- no solo diminui significativamente em todas as modalidades, provavelmente devido ao consumo das plantas.

O enterramento da cultura de cobertura, composta por fava e trigo, pode ter levado a um aumento do teor de azoto mineral no solo (Tedone et al., 2023).

Também a aplicação do adubo orgânico azotado pode ter contribuído para um maior teor de nitrato no solo, uma vez que este adubo apresenta uma baixa razão C/N (9,9). Em substâncias orgânicas com razão C/N inferior a 20 é favorecida a mineralização, ocorrendo assim um rápido aumento do teor de azoto mineral no solo (Santos, 2015).

A elevada quantidade de NO_3^- no solo de todas as modalidades pode também ajudar a explicar o aumento generalizado de pH que se verificou anteriormente. Quando o azoto é absorvido pelas plantas sob a forma de NO_3^- ocorre a formação de iões OH^- , o que leva a um aumento de pH na rizosfera (Santos, 2015).

O teor de fósforo extraível no solo na forma de P_2O_5 teve uma redução significativa ao longo do ensaio nas modalidades A e C. Ainda assim, os teores de fósforo no solo em todas as modalidades em todas as amostras correspondem a uma classe de fertilidade muito alta (LQARS, 2006).

O teor de potássio extraível no solo na forma de K_2O era, de uma forma geral, superior nas modalidades A e B relativamente às modalidades C e D. Os teores de potássio no solo nas modalidades C, na amostra de 10 de agosto e 1 de outubro e D na amostra de 1 de outubro correspondem a uma classe de fertilidade alta e todas as restantes amostras correspondem a uma classe de fertilidade muito alta (LQARS, 2006).

Os teores de micronutrientes no solo são apresentados no Quadro 17.

Quadro 17 - Evolução dos teores de micronutrientes no solo nas diferentes modalidades ao longo do ensaio

Parâmetros	Modalidade	21/jun	10/ago	01/out
Fe (mg/kg)	A	140,5 a A	134,7 b A	147,5 b A
	B	161,1 a AB	149,4 ab B	167,7 a A
	C	146,1 a B	145,0 ab B	159,5 ab A
	D	145,1 a A	158,5 a A	167,1 b A
Cu (mg/kg)	A	26,0 a A	25,6 a A	27,7 a A
	B	22,7 a A	22,7 a A	26,2 a A
	C	30,8 a A	30,6 a A	34,4 a A
	D	25,4 a A	25,8 a A	27,7 a A
Zn (mg/kg)	A	6,6 a A	5,2 a A	5,6 ab A
	B	6,1 ab A	5,6 a A	6,0 a A
	C	4,8 b A	5,3 a A	4,5 b A
	D	5,0 b A	5,0 a A	4,9 ab A
Mn (mg/kg)	A	248,1 a A	240,9 a A	246,8 b A
	B	238,8 a A	225,3 a A	243,9 b A
	C	251,4 a B	252,4 a B	273,3 a A
	D	229,6 a A	240,3 a A	254,7 ab A
B (mg/kg)	A	0,65 a A	0,63 a A	0,59 a A
	B	0,62 a A	0,62 a A	0,71 a A
	C	0,49 a A	0,52 a A	0,54 a A
	D	0,64 a A	0,59 a A	0,58 a A

Letras maiúsculas correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) na linha (efeito da data)

Letras minúsculas correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) na coluna (efeito da modalidade)

Relativamente aos micronutrientes no solo verifica-se que os teores de cobre e de boro não apresentam, em nenhuma das datas analisadas, diferenças significativas entre as modalidades e não apresentam também nenhuma diferença significativa na evolução ao longo do ensaio.

Quanto ao teor de zinco presente no solo observa-se uma tendência de um maior teor deste micronutriente nas modalidades A e B, o que poderá dever-se ao zinco fornecido pelo adubo orgânico azotado.

Os teores de ferro e manganês no solo apresentam algumas variações significativas entre modalidades e também ao longo do período de duração do ensaio, mas que não parecem ser explicadas por nenhuma diferença entre os tratamentos realizados às diferentes modalidades.

No Quadro 18 apresenta-se a evolução das bases de troca do solo ao longo do ensaio, para as diferentes modalidades.

Quadro 18 - Evolução das bases de troca nas diferentes modalidades ao longo do ensaio

Parâmetros	Modalidade	21/jun	10/ago	01/out
Na (cmol(+)/kg)	A	0,20 ab B	0,20 a B	0,30 a A
	B	0,23 a B	0,23 a B	0,37 a A
	C	0,17 b B	0,21 a B	0,31 a A
	D	0,19 ab B	0,23 a B	0,36 a A
K (cmol(+)/kg)	A	0,80 a A	0,45 ab B	0,42 ab B
	B	0,70 ab A	0,49 a B	0,49 a B
	C	0,56 b A	0,39 b B	0,36 ab B
	D	0,53 b A	0,43 ab AB	0,33 b B
Ca (cmol(+)/kg)	A	11,64 a A	11,17 a A	11,51 a A
	B	17,04 a A	16,60 a A	15,87 a A
	C	10,05 a A	10,21 a A	11,22 a A
	D	15,55 a A	14,97 a A	15,95 a A
Mg (cmol(+)/kg)	A	2,14 ab AB	2,07 a B	2,28 ab A
	B	2,22 a B	2,18 a B	2,47 a A
	C	1,87 b B	1,93 a B	2,14 b A
	D	2,04 ab A	2,03 a A	2,20 ab A

Letras maiúsculas correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) na linha (efeito da data)

Letras minúsculas correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) na coluna (efeito da modalidade)

No Quadro 18 pode verificar-se que há um aumento significativo de sódio no complexo de troca do solo em todas as modalidades ao longo do ensaio. Em sentido contrário verifica-se uma diminuição significativa de potássio no complexo de troca do solo ao longo do ensaio em todas as modalidades. O cálcio adsorvido no complexo de troca não sofre alterações significativas ao longo do ensaio em nenhuma das modalidades. Ocorre um aumento significativo de magnésio no complexo de troca do solo nas modalidades A, B e C.

4.3. Relação entre o efeito das modalidades no solo e o impacto na cultura e no solo

A modalidade A foi, inicialmente, esperada como a mais promissora em termos de produtividade devido ao efeito combinado das rizobactérias e do adubo orgânico. *Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp. são rizobactérias PGPR que têm a capacidade de fixar azoto atmosférico no solo (Cassán et al., 2020; Sumbul et al., 2020), produzir de hormonas de crescimento, solubilizar fósforo do solo (Aasfar et al., 2021), melhorar o crescimento radicular e aumentar da absorção de nutrientes, para além de induzir maior tolerância das plantas a diversos stresses (Bashan & De-Bashan, 2010).

O adubo orgânico azotado iria beneficiar o crescimento da cultura através do fornecimento de nutrientes, principalmente o azoto. Uma vez que o adubo apresenta uma baixa razão C/N o azoto iria ser mineralizado e estaria disponível para ser utilizado pela cultura (Santos, 2015).

Na modalidade B, esperava-se uma produtividade inferior à modalidade A, pois não teria os benefícios das rizobactérias PGPR, mas os nutrientes fornecidos pelo adubo orgânico azotado seriam vantajosos para o crescimento da cultura. Seguidamente a modalidade C teria uma produtividade inferior à modalidade B, pois não seria aplicado o adubo orgânico e, por fim, a modalidade D era esperada como a menos produtiva.

Contudo, o que se verificou, no primeiro ensaio, foi uma maior produtividade na modalidade B quando se aplicava apenas o adubo orgânico azotado e significativamente maior do que a modalidade de controlo, D. No segundo ensaio foram as duas modalidades em que se aplicou o adubo orgânico azotado que alcançaram maior produtividade A e B, com diferenças significativas para a modalidade de controlo D. Desta forma não se verifica que haja uma influência marcada das rizobactérias.

Relativamente ao impacto no solo, na modalidade A, onde foi aplicado adubo orgânico azotado e o complexo de rizobactérias à base de *Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp., esperava-se uma maior atividade biológica no solo, uma vez que o uso combinado destes produtos promove uma série de benefícios à atividade microbiana e à fertilidade do solo.

O adubo orgânico azotado é rico em matéria orgânica, apresentando um teor de 53%. A fertilização orgânica leva a um aumento da atividade biológica do solo (Kirchner et al., 1993; Marinari et al., 2000). Marinari *et al.* (2000) observou um aumento significativo da atividade desidrogensásica do solo quando era aplicada matéria orgânica. Ao adicionar o complexo de rizobactérias, esperava-se que essas bactérias se mantivessem no solo ao longo do ensaio, com as condições favoráveis introduzidas pela matéria orgânica veiculada pelo adubo orgânico. Assim, a atividade biológica no solo iria ser a mais elevada de todas as modalidades.

Na modalidade B, em que só foi aplicado o adubo orgânico azotado, esperava-se uma resposta inferior à modalidade A relativamente à atividade biológica do solo. A aplicação de matéria orgânica no solo seria benéfica para os microrganismos do solo, mas como não seriam adicionadas rizobactérias a atividade biológica do solo seria inferior à modalidade A.

A modalidade C, onde só foi aplicado o complexo de rizobactérias à base de *Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp., teria uma atividade biológica do solo inferior à modalidade B, uma vez que a não adição de matéria orgânica não seria tão favorável para o desenvolvimento de microrganismos no solo e as rizobactérias adicionadas não teriam condições tão favoráveis para a sua proliferação e para a sua atividade.

Finalmente, a modalidade D, em que nada foi adicionado, teria os valores de atividade biológica do solo mais reduzidos, sem adição de rizobactérias e sem adição de matéria orgânica que favorecesse os microrganismos autóctones desse solo.

Os resultados esperados não se verificaram totalmente. Relativamente à atividade desidrogenásica observou-se uma elevada flutuação ao longo do tempo e não foi possível diferenciar nenhum efeito entre as modalidades.

No total de colónias de bactérias contabilizadas ao longo de todo o ensaio as modalidades A e B apresentaram um valor elevado e semelhante entre si, a modalidade C apresentou um valor inferior e, por fim, a modalidade D apresentou o menor valor. Este resultado está mais próximo do esperado, mas demonstra que poderá haver um efeito mais pronunciado da aplicação de matéria orgânica do que do complexo de rizobactérias na atividade das bactérias do solo.

Ao ter sido realizado plaqueamento do produto VitaSoil verificou-se que as rizobactérias que este continha estavam vivas e o produto não aparentava ter perdido as suas propriedades. A não permanência destas rizobactérias no solo poderá estar relacionada com o curto ciclo cultural da alface e da realização de mobilizações do solo para a instalação da cultura relativamente intensas, com passagem de grade de discos e mais do que uma fresagem. Estas mobilizações de solo que ocorreram num período de tempo de dois meses poderão não ter permitido a manutenção e desenvolvimento das rizobactérias no solo.

Quanto às colónias de fungos contabilizadas também se observou uma elevada flutuação ao longo do ensaio, com uma tendência geral de um maior número de colónias de fungos contabilizadas nas modalidades A e B, onde tinha sido aplicado o adubo orgânico azotado, mas sem um efeito marcado do complexo de rizobactérias.

5. Conclusões

Os resultados deste estudo permitem concluir que há um claro efeito do adubo orgânico azotado no aumento de produtividade da alface. Na primeira plantação, a aplicação do adubo orgânico azotado resultou num aumento de 9% na massa média das alfaces em comparação com a modalidade de controlo, o que se traduz num acréscimo potencial de rendimento para o produtor de 3511 € por hectare. Na segunda plantação, a produtividade foi 16% superior ao controlo na modalidade com adubo orgânico e 19% superior na modalidade com a combinação de adubo orgânico com o complexo de rizobactérias, o que representa ganhos adicionais de 7087 €/ha e 8405 €/ha, respetivamente.

Contudo, o complexo de rizobactérias (*Azotobacter spp.* e *Azospirillum spp.*) não teve o impacto esperado na produtividade da cultura. A modalidade que combinava rizobactérias e adubo orgânico azotado não apresentou uma diferença significativa em relação à modalidade que utilizou apenas o adubo orgânico azotado. Adicionalmente, a modalidade que aplicou exclusivamente rizobactérias não se distinguiu significativamente do controlo em termos de produtividade.

Relativamente à atividade desidrogenásica do solo, observou-se uma grande variabilidade ao longo das duas plantações e entre modalidades, não sendo possível estabelecer uma correlação direta entre a aplicação do adubo orgânico ou das rizobactérias e a atividade desidrogenásica. Esta variabilidade sugere que pode haver influência de outros fatores na atividade enzimática do solo, como as condições ambientais e a interação com os microrganismos autóctones do solo.

No plaqueamento de fungos observou-se também bastante variabilidade, mas parece haver uma tendência de maior número de colónias contabilizadas no plaqueamento nas modalidades em que foi aplicado o adubo orgânico azotado, sem efeito marcado das rizobactérias.

No plaqueamento de bactérias as modalidades onde foi aplicado o adubo orgânico azotado têm tendencialmente maior número de colónias no plaqueamento, o que também é demonstrado quando se somaram todas as colónias contabilizadas ao longo dos dois ensaios. As rizobactérias não pareceram influenciar de forma significativa o crescimento de bactérias no solo, nem é evidente a sua manutenção no solo ao longo do tempo.

A realização deste estudo numa exploração agrícola permitiu testar e validar não só o efeito dos produtos, mas também a sua aplicabilidade no contexto prático de produção agrícola. Este estudo traz alguma informação útil para agricultores que procuram alternativas mais sustentáveis para a fertilização das culturas de forma a reduzir a dependência de produtos químicos de síntese.

Para futuros estudos sugere-se a aplicação de diferentes espécies de rizobactérias ou até de alguns fungos, com capacidade de estimular o crescimento das plantas e também com proteção contra agentes patogénicos. Pode também ser interessante a combinação destes microrganismos com diferentes culturas de cobertura para a época de inverno, quando não há cultivo de alface nos terrenos. Uma vez que a cultura da alface é afetada recorrentemente por fungos de solo, uma abordagem com grande interesse prático seria avaliar o efeito de algumas rizobactérias e das culturas de cobertura na diminuição dos ataques de fungos do solo.

6. Referências bibliográficas

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., & Hilali, A. (2021). Nitrogen fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
- Agriculture and Horticulture Development Board (AHDB). (2019). *Diseases of Lettuce* (T. O'Neill (ed.)). Agriculture and Horticulture Development Board (AHDB).
- Akram, M., Rizvi, R., Sumbulhttps, A., Ansari, R. A., & Mahmood, I. (2016). Potential role of bio-inoculants and organic matter for the management of root-knot nematode infesting chickpea Potential role of bio-inoculants and organic matter for the management of root-knot nematode infesting chickpea. *Cogent Food & Agriculture*, *2*, 1183457. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1183457>
- Ali, A., Elrys, A. S., Liu, L., Iqbal, M., Zhao, J., Huang, X., & Cai, Z. (2022). Cover plants-mediated suppression of Fusarium wilt and root-knot incidence of cucumber is associated with the changes of rhizosphere fungal microbiome structure-under plastic shed system of North China. *Frontiers in Microbiology*, *13*(April), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.697815>
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I., & Garbisu, C. (2003). Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on Environmental Health*, *18*(1), 65–73. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.1.65>
- Almeida, D. (2006). *Manual de culturas hortícolas Volume 1* (1st ed.). Editorial Presença.
- Alori, E. T., Olaniyan, F. T., Adekiya, A. O., Ayorinde, B. B., Daramola, F. Y., Joseph, A., Adegbite, K. A., Ibaba, A. L., Aremu, C. O., & Babalola, O. O. (2023). Response of soil microbial community (bacteria and fungi) to organic and inorganic amendments using tomato as a test crop. *Air, Soil and Water Research*, *16*, 1–13. <https://doi.org/10.1177/11786221231214063>
- Amaro, P. (2003). A protecção integrada. In *A Protecção Integrada*. ISA/Press.
- Aquilanti, L., Favilli, F., & Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of Azotobacter from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, *36*(9), 1475–1483. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.024>
- Ardakani, M. R., Mazaheri, D., Mafakheri, S., & Moghaddam, A. (2011). Absorption efficiency of N , P , K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L .) by *Azospirillum brasilense* , *Streptomyces* sp ., *Glomus intraradices* and manure application. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *17*(2), 181–192. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0065-7>

- Arora, H., Sharma, A., Poczai, P., Sharma, S., Haron, F. F., Gafur, A., & Sayyed, R. Z. (2022). Plant-derived protectants in combating soil-borne fungal infections in tomato and chilli. *Journal of Fungi*, 8(2), 213. <https://doi.org/10.3390/jof8020213>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria : context , mechanisms of action , and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Barassi, C. A., Ayrault, G., Creus, C. M., Sueldo, R. J., & Sobrero, M. T. (2006). Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae*, 109(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.02.025>
- Barrière, V., Lecompte, F., Nicot, P. C., Maisonneuve, B., Tchamitchian, M., & Lescourret, F. (2014). Lettuce cropping with less pesticides. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(1), 175–198. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0158-5>
- Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 108, pp. 77–136). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Blagodatskaya, E., & Kuzyakov, Y. (2013). Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 192–211. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024>
- Blok, I., & Plaats-Niterink, A. J. (1978). *Pythium uncinulatum* sp. nov. and *P. tracheiphilum* pathogenic to lettuce. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84(4), 135–147. <https://doi.org/10.1007/BF01976302>
- Callaghan, M. O., Ballard, R. A., & Wright, D. (2022). Soil microbial inoculants for sustainable agriculture : Limitations and opportunities. *Soil Use and Management*, 38, 1340–1369. <https://doi.org/10.1111/sum.12811>
- Cardoso, J. (1965). *Os solos de Portugal: Sua classificação, caracterização e gênese*. Direção-Geral dos Serviços Agrícolas.
- Casida, L. E., Klein, D. A., & Santoro, T. (1964). Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*, 98(6), 371–376. <https://doi.org/10.1097/00010694-196412000-00004>

- Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., de Carlan, C. L. N., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F. O., de Souza, E., Zorita, M. D., de-Bashan, L., & Mora, V. (2020). Everything you must know about Azospirillum and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), 461–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Cassán, F., & Diaz-Zorita, M. (2016). Azospirillum sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 117–130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>
- Chen, X., Pizzatti, C., Bonaldi, M., Saracchi, M., Erlacher, A., Kunova, A., Berg, G., & Cortesi, P. (2016). Biological control of lettuce drop and host plant colonization by rhizospheric and endophytic streptomycetes. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00714>
- Chu, H., Lin, X., Fujii, T., Morimoto, S., Yagi, K., Hu, J., & Zhang, J. (2007). Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2971–2976. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.031>
- Comissão Europeia. (2020). *A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system (COM/2020/381 final)*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52020DC0381>
- Dias-Arieira, C. R., Mattei, D., Puerari, H. H., & Ribeiro, R. C. F. (2015). Use of organic amendments in the management of root-knot nematode in lettuce. *Horticultura Brasileira*, 33(4), 488–492. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000400013>
- Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR). (2024). *Sistema de informação geográfica para o ordenamento agrícola e florestal: Cartografia dos solos*. <https://portalgeo.dgadr.pt/portal/apps/webappviewer/index.html?id=fa72f8d433e54513b4b54562a6bcb3f0>
- El-Badry, M. A., Elbarbary, T. A., Ibrahim, I. A., & Abdel-Fatah, Y. M. (2016). Azotobacter vinelandii evaluation and optimization of abu tartur egyptian phosphate ore dissolution. *Saudi Journal of Pathology and Microbiology*, 1(3), 80–93. <https://doi.org/10.21276/sjpm.2016.1.3.2>
- Elnahal, A. S. M., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E.-S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., AbuQamar, S. F., & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology*, 162(4), 759–792. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7>
- Fasciglione, G., Casanovas, E. M., Quillehauquy, V., Yommi, A. K., Goñi, M. G., Roura, S. I., & Barassi, C. A. (2015). Azospirillum inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 195, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.015>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2024). *FAOSTAT: Crops and livestock products*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

- Gabinete de Planeamento Políticas e Administração Geral (GPP). (2020). *Análise setorial frutas e hortícolas*.
https://www.gpp.pt/images/PEPAC/Anexo_NDICE_ANLISE_SETORIAL___FH.pdf#page=10.08
- Galindo, F. S., Filho, M. C. M. T., Buzetti, S., Pagliari, P. H., Santini, J. M. K., Alves, C. J., Megda, M. M., Nogueira, T. A. R., Andreotti, M., & Arf, O. (2019). Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with. *Agronomy Journal*, *111*(4), 1985–1997. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.07.0481>
- Gardé, A., & Gardé, N. (1981). *Culturas Hortícolas* (5th ed.). Clássica Editora.
- Gordon, T. R., & Koike, S. T. (2015). Management of Fusarium wilt of lettuce. *Crop Protection*, *73*, 45–49.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.011>
- Hassouna, M. G., El-Saedy, M. A. M., & Saleh, H. M. A. (1998). Biocontrol of soil-borne plant pathogens attacking cucumber (*Cucumis sativus*) by Rhizobacteria in a semiarid environment. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, *12*(4), 345–357. <https://doi.org/10.1080/15324989809381523>
- Instituto Nacional de Estatística (INE). (2002). *Estatísticas da Horticultura 1995-2001*.
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=140013&PUBLICACOESstema=Qualquer&PUBLICACOESmodo=2&xlang=pt
- Instituto Nacional de Estatística (INE). (2023). *Estatísticas Agrícolas 2022*.
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=137687&PUBLICACOESmodo=2
- Instituto Nacional de Estatística (INE). (2024). *Base de dados*.
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpgid=ine_tema&xpid=INE&tema_cod=1510
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). (2023). *Normal Climatológica – Lisboa / Gago Coutinho 1981-2010*. https://www.ipma.pt/bin/file.data/climate-normal/cn_81-10_LISBOA_GAGO_COUTINHO.pdf
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). (2024). *Normais climatológicas*.
<https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/?print=true>
- Jnawali, A. D., Ojha, R. B., & Marhatta, S. (2015). Role of Azotobacter in soil fertility and sustainability—a review. *Advances in Plants & Agriculture Research*, *2*(6), 250–253.
<https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>
- Katan, J. (2004). Role of cultural practices for the management of soilborne pathogens in intensive horticultural systems. *Acta Horticulturae*, *635*, 11–18. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.635.1>
- Kirchner, M., Wollum, A. I., & King, L. (1993). Soil microbial populations and activities in reduced chemical input agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, *57*, 1289–1295.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1993.03615995005700050021x>

- Kizilkaya, R. (2009). Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *Journal of Environmental Biology*, 30(1), 73–82.
- Kumar, S., Chaudhuri, S., & Maiti, S. K. (2013). Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil - A Review. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 13(7), 898–906.
<https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.13.7.2801>
- Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva (LQARS). (2006). *Manual de fertilização das culturas* (INIAP).
- Lana, M. do C., Dartora, J., Marini, D., & Hann, J. E. (2012). Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. *Revista Ceres*, 59(3), 399–405. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000300016>
- Latef, A. A. H. A., Alhmad, M. F. A., Kordrostami, M., Abo-Baker, A. B. A. E., & Zakir, A. (2020). Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 1293–1306.
<https://doi.org/10.1007/s00344-020-10065-9>
- Lenart, A. (2011). Occurrence, characteristics, and genetic diversity of *azotobacter chroococcum* in various soils of southern Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(2), 415–424.
- Liu, C. W., Sung, Y., Chen, B. C., & Lai, H. Y. (2014). Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4), 4427–4440. <https://doi.org/10.3390/ijerph110404427>
- MADRP. (2006). *Produção integrada em hortícolas - Família das asteráceas - Alface*. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direção-geral de proteção das culturas.
- Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., Aeron, A., Kumar, B., Kumar, S., Tewari, S., & Arora, N. K. (2012). Integrated approach for disease management and growth enhancement of *Sesamum indicum* L. utilizing *Azotobacter chroococcum* TRA2 and chemical fertilizer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(10), 3015–3024. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1112-4>
- Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., & Grego, S. (2000). Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties. *Bioresource Technology*, 72, 9–17. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00094-2)
- Maroto, J. (2002). *Horticultura herbácea especial* (5th ed.). Ediciones Mundi-Prensa.
- Martinez, M. M., Gutiérrez-Romero, V., Janssens, M., & Ortega-blu, R. (2010). Biological soil quality indicators : a review. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. (pp. 319–328).

- Moreno, A., & Fereres, A. (2012). *Virus diseases in lettuce in the mediterranean basin* (pp. 247–288).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00007-5>
- Nielsen, M. N., & Winding, A. (2002). Microorganisms as indicators of soil health. In *NERI Technical Report No. 388*. National Environmental Research Institute, Denmark.
- Okumura, R. S., de Cinque Mariano, D., Dallacort, R., de Albuquerque, A. N., da Silva Lobato, A. K., Guedes, E. M. S., de Oliveira Neto, C. F., da Conceição, H. E., & Alves, G. A. R. (2013). Azospirillum: A new and efficient alternative to biological nitrogen fixation in grasses. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *11*(1), 1142–1146.
- Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied Soil Ecology*, *86*, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>
- Patrício, F. R. A., Sinigaglia, C., Barros, B. C., Freitas, S. S., Neto, J. T., Cantarella, H., & Ghini, R. (2006). Solarization and fungicides for the control of drop, bottom rot and weeds in lettuce. *Crop Protection*, *25*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.002>
- Ribeiro, H. M., Fangueiro, D., Alves, F., Ventura, R., Coelho, D., Vasconcelos, E., Cunha-Queda, C., Coutinho, J., & Cabral, F. (2010). Nitrogen mineralization from an organically managed soil and nitrogen accumulation in lettuce. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *173*(2), 260–267.
<https://doi.org/10.1002/jpln.200900082>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, *17*, 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- Rodríguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., & Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, *91*, 552–555. <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0566-0>
- Roy, S., & Kashem, M. A. (2014). Effects of organic manures in changes of some soil properties at different incubation periods. *Open Journal of Soil Science*, *04*(03), 81–86. <https://doi.org/10.4236/ojss.2014.43011>
- Sahoo, R. K., Ansari, M. W., Dangar, T. K., Mohanty, S., & Tuteja, N. (2014). Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. *Protoplasma*, *251*, 511–523. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0547-2>
- Saltão, B., & Moreira, J. (2006). *Rotação de culturas horticolas em estufa*. Direção Regional de Agricultura da Beira Litoral.
- Santos, J. Q. (2015). *Fertilização. Fundamentos agroambientais da utilização dos adubos e corretivos* (Plubindust).

- Santos, M. I., Grácio, M., Silva, M. C., Pedroso, L., & Lima, A. (2023). One health perspectives on food safety in minimally processed vegetables and fruits: from farm to fork. *Microorganisms*, *11*(12), 2990. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122990>
- Savary, S., Mille, B., Rolland, B., & Lucas, P. (2006). Patterns and management of crop multiple pathosystems. *European Journal of Plant Pathology*, *115*, 123–138. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0651-z>
- Shirinbayan, S., Khosravi, H., & Malakouti, M. J. (2019). Alleviation of drought stress in maize (*Zea mays*) by inoculation with *Azotobacter* strains isolated from semi-arid regions. *Applied Soil Ecology*, *133*(September 2018), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.015>
- Sowley, E. N. K., Dewey, F. M., & Shaw, M. W. (2010). Persistent, symptomless, systemic, and seedborne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, *126*, 61–71. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9524-1>
- Sumbul, A., Ansari, R. A., Rizvi, R., & Mahmood, I. (2020). *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(12), 3634–3640. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004>
- Sun, R., Dsouza, M., Gilbert, J. A., Guo, X., Wang, D., Guo, Z., Ni, Y., & Chu, H. (2016). Fungal community composition in soils subjected to long-term chemical fertilization is most influenced by the type of organic matter. *Environmental Microbiology*, *18*(12), 5137–5150. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13512>
- Tedone, L., Ali, S. A., & Mastro, G. De. (2023). The effect of tillage on faba bean (*Vicia faba* L.) nitrogen fixation in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum* (Desf)) -Based rotation under a mediterranean climate. *Agronomy*, *123*, 105. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/agronomy13010105>
- Tripathi, V., Arora, D., Ahlawat, V., Lahari, P., Kumar, A., & Kumari, A. (2022). Soilless cultivation in lettuce: A review. *Ecology, Environment and Conservation*, *28*(04), 1891–1898. <https://doi.org/10.53550/eec.2022.v28i04.036>
- Vincent, C., Weintraub, P., & Hallman, G. (2009). Physical control of insect pests. In *Encyclopedia of Insects* (pp. 794–798). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00209-5>
- Vuolo, F., Novello, G., Bona, E., Gorrasi, S., & Gamarelo, E. (2022). Impact of plant-beneficial bacterial inocula on the resident bacteriome: current knowledge and future perspectives. *Microorganisms*, *10*, 2462. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122462>
- Wolińska, A., & Stepniewska, Z. (2012). Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. In *Dehydrogenases* (pp. 183–209). <https://doi.org/10.5772/48294>
- Xu, X., Schimel, J. P., Janssens, I. A., Song, X., Song, C., Yu, G., Sinsabaugh, R. L., Tang, D., Zhang, X., & Thornton, P. E. (2017). Global pattern and controls of soil microbial metabolic quotient. *Ecological Monographs*, *87*(3), 429–441. <https://doi.org/10.1002/ecm.1258>

- Yang, J., Kloepper, J., & Ryu, C. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(January 2020), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Zalidis, G., Stamatiadis, S., Takavakoglou, V., Eskridge, K., & Misopolinos, N. (2002). Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88(2), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00249-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00249-3)
- Zhen, Z., Liu, H., Wang, N., Guo, L., Meng, J., Ding, N., Wu, G., & Jiang, G. (2014). Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in China. *PLoS ONE*, 9(10), e108555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108555>