

## EMPREGO DE BIOMASSA DE *Nostoc commune* EM ALFACE COMO BIOFERTILIZANTE ALTERNATIVO À ADUBAÇÃO QUÍMICA

## USE OF *Nostoc commune* BIOMASS IN LETTUCE AS AN ALTERNATIVE BIOFERTILIZER TO CHEMICAL FERTILIZATION

Receipt of originals: 11/15/2024  
Acceptance for publication: 12/09/2024

### JONATHAN SZVONKA MUNHOZ

Graduanda em Ciências Biológicas na Escola de Medicina e Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brasil.  
E-mail: jonathan5munhoz@gmail.com Orcid: <https://orcid.org/0009-0007-1252-7378>

### MARIA JULIA JAKUBOSKI DE VECHI

Graduanda em Ciências Biológicas na Escola de Medicina e Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brasil.  
E-mail: mariajulijakuboskidevechi@gmail.com  
Orcid: <https://orcid.org/0009-0005-0234-491X>

### LETICIA DE PIERRI

Doutora em Produção vegetal pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Escola de Medicina e Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brasil. E-mail: mariana.noya@pucpr.br  
Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2761-2010>

### MARIANA GRASSI NOYA

Doutora em Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Escola de Medicina e Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brasil. E-mail: leticia.pierrri@pucpr.br  
Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-4233-7034>

### RESUMO

O crescimento constante da população global e a exaustão dos recursos naturais de energia apresentam uma ameaça iminente para a satisfação das necessidades ambientais, de alimentos e de energia de forma sustentável. Nesse cenário, a busca por alternativas econômicas e ambientalmente amigáveis aos fertilizantes químicos comerciais, que não apenas contribuem significativamente para a poluição, mas também levantam preocupações em relação à saúde humana e animal, tem ganhado destaque. A biofertilização surge como uma opção altamente viável, oferecendo sustentabilidade e aproveitando recursos naturais. O uso de algas como biofertilizantes é um campo de estudo em crescimento, prometendo soluções notáveis a curto prazo. Entre esses organismos fotoautotróficos, as cianobactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, em particular do gênero *Nostoc*, apresentam-se como as mais promissoras. Sua capacidade de converter nitrogênio atmosférico em uma forma

absorvível e utilizável pelo metabolismo das plantas, o  $NH_4$ , torna-as altamente atraentes. Este estudo concentrou-se na avaliação do potencial do uso de biomassa de cianobactérias do gênero *Nostoc*, produzida em biorreatores, como biofertilizante no cultivo de alface (*Lactuca sativa*). Foram testadas três dosagens crescentes em comparação com um grupo controle. Superar as dificuldades de isolamento da cepa e eliminar contaminações exigiu a exploração de várias técnicas, cujos métodos mais eficazes são detalhados neste artigo, assim como as técnicas de produção em larga escala usando biorreatores e a preservação por liofilização. A análise estatística, realizada de acordo com os pressupostos da Anova, confirmou a eficácia do uso desses microrganismos como biofertilizantes. Além disso, identificou a quantidade adequada e os níveis de eficiência. Surpreendentemente, a menor dosagem testada, correspondente a 25% de biomassa, demonstrou atender às demandas nutricionais das plantas, impulsionando seu crescimento. Esse resultado, até então escasso na literatura, revela um avanço significativo nas aplicações práticas de cianobactérias, particularmente do gênero *Nostoc*, como biofertilizantes.

**Palavras-chave:** Nitrogênio. Biotecnologia. Cianobactérias. Recursos renováveis. Sustentabilidade.

#### **ABSTRACT**

The constant growth of the global population and the depletion of natural energy resources present an imminent threat to meeting environmental, food and energy needs sustainably. In this scenario, the search for economical and environmentally friendly alternatives to commercial chemical fertilizers, which not only contribute significantly to pollution but also raise concerns regarding human and animal health, has gained prominence. Biofertilization appears as a highly viable option, offering sustainability and taking advantage of inexhaustible resources. The use of algae as biofertilizers is a growing field of study, promising notable short-term solutions. Among these photoautotrophic organisms, cyanobacteria that fix atmospheric nitrogen, particularly from the genus *Nostoc*, are the most promising. Their ability to convert atmospheric nitrogen into an absorbable and usable form for plant metabolism,  $NH_4$ , makes them highly attractive. This study focused on evaluating the potential use of cyanobacteria biomass of the genus *Nostoc*, produced in bioreactors, as biofertilizer in lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation. Three different dosages were tested in comparison with a control group. Overcoming the difficulties of isolating the strain and eliminating contamination required the exploration of several techniques, the most effective methods of which are detailed in this article, as well as large-scale production techniques using bioreactors and preservation through freeze-drying. Statistical analysis, carried out in accordance with Anova assumptions, confirmed the effectiveness of using these microorganisms as biofertilizers. Furthermore, it identified the appropriate quantity and efficiency levels. Surprisingly, the lowest dosage tested, corresponding to 25% biomass, was shown to meet the nutritional demands of plants, boosting their growth. This result, until then scarce in the literature, reveals a significant advance in the practical applications of cyanobacteria, particularly of the *Nostoc* genus, as biofertilizers.

**Keywords:** Nitrogen. Biotechnology. Cyanobacteria. Renewable resources. Sustainability.

## 1 INTRODUÇÃO

Entre os seres mais antigos que habitam a Terra, inquestionavelmente encontram-se as cianobactérias (KOMÁREK et al., 2014). Elas, ao longo da escala evolutiva, se adaptaram e se desenvolveram para habitar as mais diversas regiões e sobreviver em condições extremas (ITEMAN et al., 2000). Esses organismos possuem um sistema fotossintético completo, e ecologicamente se encontram reconhecidos como seres pertencentes às plantas unicelulares, as microalgas (KOMÁREK, 2010).

Há séculos, têm sido alvo de interesse científico e econômico, quando reconhecidas as suas múltiplas capacidades de sínteses, esse grupo de prokaryotos fotoautotróficos é eficiente, por exemplo, na produção de metabólitos biologicamente ativos capazes de codificar diversos BGC (MAY et al., 2020). Membros da ordem Nostocales, como as espécies do gênero *Nostoc*, oriundas de hábitat terrestre, são fortes contribuintes para a fertilidade do solo, causando assim, grande vantagem agrícola (GALHANO et al., 2010).

As espécies do gênero *Nostoc*, diferentemente dos vegetais, possuem a capacidade de aproveitar, metabolizar e fixar nitrogênio proveniente diretamente da atmosfera. Isso se deve a dois fatores, a presença de uma célula especializada denominada heterocisto, e a atividade enzimática da nitrogenase. A ação dessa enzima, possibilitada pela produção de ATP e NADPH, reduz o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em íons de amônio ( $NH_4^+$ ), forma utilizável e absorvível pelas raízes das plantas, entretanto a atividade na nitrogenase é inibida quando há a presença de oxigênio, contudo, a parede expressa dos heterocistos impede a entrada de  $O_2$ , facilitando assim a fixação de nitrogênio no interior da célula (REVIERS, 2010).

O mecanismo transporte de substâncias, como o nitrogênio fixado, entre células de cianobactérias filamentosas heterocitadas manteve-se sendo uma incógnita durante muito tempo, havendo apenas hipóteses, até então nunca comprovadas, como a mais aceita, onde possivelmente existiriam canalículos que

atravessariam os nódulos polares dos heterocistos, se comunicando com as células vegetativas vizinhas. Omairi-Nasser; Haselkorn e Austin II (2014) comprovam a existência de tais canais comunicantes e aferem suas medidas mediante técnicas de microscopia eletrônica e tomografia 3D, cujas amostras foram previamente submetidas a congelamento rápido e de alta pressão.

Os canalículos, que rompem o peptidoglicano entre as células e permitem o transporte de substâncias como açúcares e nitrogênio em forma de arginina, não são considerados plasmodesmas, pois não possuem uma membrana interna ou externa que facilite a comunicação entre as células. Entretanto, no ponto de junção das células há um septo onde esses canais estão contidos (Figura 1), tanto entre células vegetativas, quanto entre o heterocisto e células vegetativas (OMAIRI-NASSER; HASELKORN E AUSTIN II, 2014).

O gênero de Cyanobacteria selecionado para esse estudo, *Nostoc*, detém alta capacidade de constituir relações simbióticas com diversos tipos de organismos, principalmente as plantas, como os membros do gênero *Cycas*, com as quais estabelece um consórcio simbiótico em suas raízes (REVIERS, 2010). Entretanto, as dificuldades taxonômicas de *Nostoc*, levaram sua identificação a ser investigada por métodos moleculares, especialmente a análise filogenética do gene 16S rRNA, gerando uma abordagem polifásica, que se mostra muito eficiente na busca por torná-lo um gênero monofilético, isso levou à descrição de novos gêneros, morfologicamente similares a *Nostoc*, sendo eles *Mojavia*, *Desmonostoc*, *Halotia*, *Aliinostoc*, *Komarekiella* e *Desikachara*, os quais passaram a abrigar espécies antes pertencentes a esse gênero (SINGH et al., 2020).

Morfologicamente, esse gênero tem como caracteres descritivos a presença de tricomas isopolares unisseriados não ramificados, e neles a ocorrência de acinetos e heterocistos intercalados, essa colônia sempre envolta por uma mucilagem exopolissacarídica (SINGH et al., 2020). As variações nos padrões de disposições dos tilacóides (visíveis somente por microscopia eletrônica de transmissão) presentes no interior citoplasmático das células de cianobactérias, também são caracteres taxonômicos eficientes para diferenciações morfológicas tanto para grupos filamentosos quanto para unicelulares (KOMÁREK, 2016).

Diversos estudos têm trazido o uso de biofertilizantes a base de algas, entre os organismos mais populares encontram-se as cianobactérias fixadoras de nitrogênio, que indicam um forte potencial a ser explorado (SHOLKAMY; EL-KOMY; ALI, 2015). Já a aplicação de fertilizantes nitrogenados tem se tornado cada vez mais inviável na agricultura, quando visto por um viés sustentável e econômico, devido ao seu alto valor de comercialização, e seus grandes prejuízos ao ecossistema quando usados de forma exacerbada na produção vegetal. Eles podem afetar diretamente a microfauna (anelídeos, himenópteros, coleópteros, fungos e bactérias, dentre outros) causando um desequilíbrio, e por consequência, resultando em um maior uso futuro de produtos compensadores, uma vez que a interação ecológica dessa microfauna age como um regulador de fertilidade (CIVITEREZA, 2021), podendo gerar um déficit na polinização, produção de túneis por minhocas e redução de micorrizas e rizóbios no solo.

Os efeitos negativos dos aditivos nitrogenados não se limitam somente ao ambiente, podendo trazer consequências nocivas à saúde humana, uma vez que esses produtos podem causar intoxicação, manifestando-se de variadas formas, em alguns casos pode ocasionar o óbito. Dentre os problemas causados encontram-se lesões aos rins, redução da fertilidade, danos ao sistema nervoso, convulsões, envenenamento e câncer (CIVITEREZA, 2021).

Cerca de 70% de toda matéria-prima utilizada pelo Brasil na produção de fertilizantes químicos é advinda de importação (MAPA, 2020), em grande parte, oriunda da Rússia, sendo isto um agravante no emprego desses aditivos na agricultura, tendo em vista que a grande exportadora encontra-se, no atual contexto, em um conflito armado com sua nação vizinha, Ucrânia, inviabilizando a importação desses produtos, levando em conta que as seguradoras não consideram viável fazer seguros dos navios de carga, que vão até a Rússia buscar as mercadorias, enquanto permanecer a guerra (FORBES, 2022). Essas questões econômicas, somadas às ambientais anteriormente mencionadas, evidenciam a necessidade de buscar métodos alternativos a serem empregados como adubo na produção agrícola, sendo os biofertilizantes uma opção bastante convidativa.

A biofertilização encontra-se em ascensão devido às suas vantagens em relação aos químicos (HERRMANN & LESUEUR, 2013). Quando analisado por um

parâmetro de aproveitamento, os adubos orgânicos têm um maior índice de absorção por parte das plantas, maiores teores totais de nutrientes, inclusive nitrogênio, teor de água e relação C/N (GOMES et al., 2005). Além do seu melhor aproveitamento no corpo vegetal, há uma vantagem em seu custo monetário que acaba por ser cerca dez vezes menor em relação aos fertilizantes nitrogenados (MONTROYA et al., 2010).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi empregar biomassa de *Nostoc* como biofertilizante em mudas de alface em diferentes dosagens, visando suprir as demandas nutricionais da planta, colocando-se como método alternativo a fertilização química.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA, TRIAGEM E ISOLAMENTO DA AMOSTRA

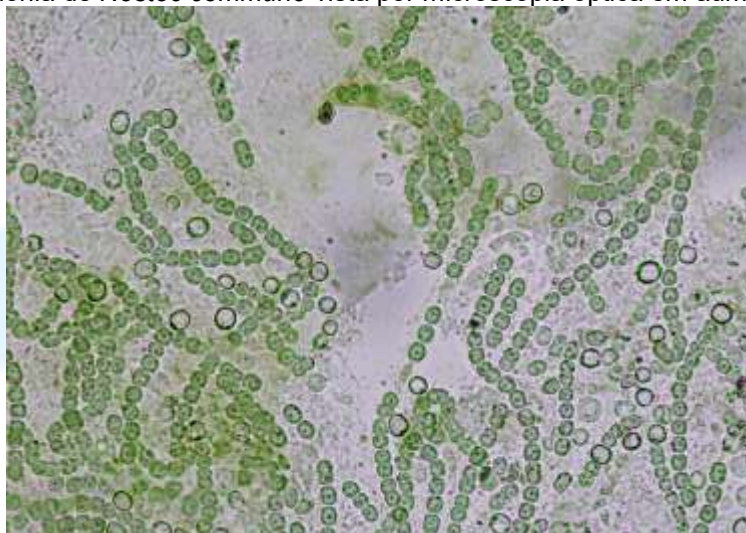
A coleta foi realizada na Fazenda Experimental Gralha Azul, sob as coordenadas -25.65623, -49.27865, no município de Fazenda Rio Grande, Paraná. Colônias de cianofíceas, encontradas dentro de casas de vegetação com irrigação por aspersão, o que possibilitou alta umidade do ambiente, sendo propício para o crescimento dessas algas, foram retiradas do solo com auxílio de uma espátula de polietileno de alta densidade e inseridas em frascos transparentes, também de polietileno, com tampa, numerados de 1 a 11. Os frascos foram transportados até o laboratório em caixa de isopor forrada com gelo, objetivando minimizar os impactos causados nas células ao retirá-las do seu habitat. As colônias de *Nostoc* nem sempre são tão evidentes no ambiente, fato que em partes dificulta a coleta, isso se dá principalmente em locais e períodos de estiagem, que ocasiona perda de volume e de sua acentuada coloração verde, tal como a consistência gelatinosa de sua mucilagem polissacarídica. Nesses períodos as colônias se confundem facilmente com o solo, considerando que perdem espessura e ficam com tonalidade amarronzada e até mesmo preta, com um forte aspecto de ausência de vida. Entretanto, é característico desse grupo resistir a longos períodos de condições extremas, conseguindo reativar seu metabolismo logo que entram em contato com água. As amostras encontradas nesse estado de desidratação foram submetidas a uma etapa de hidratação após a

coleta, isso se deu submergindo a colônia em água destilada dentro de um recipiente fechado, fazendo a troca dessa água a cada 3 horas, repetindo-se até que seja possível observar o retorno de seus aspectos naturais de consistência e coloração.

Devido a grande quantidade de sedimentos, folhas e galhos que vieram aderidos às mucilagens, as amostras passaram por um processo de assepsia, submergindo as colônias a enxágues consecutivos em dH<sub>2</sub>O, auxiliado por jatos de pisset e remoção manual de fragmentos com pinças quando necessário, essa etapa é essencial para a redução de contaminantes durante o isolamento do material coletado.

Com o uso de pipetas de Pasteur, foram montadas lâminas para análise microscópica de cada amostra, previamente macerada, em pistilo, manualmente, de modo a eleger a amostra mais pura e livre de contaminações por outros microrganismos entre as coletas. De modo geral, encontrou-se grandes quantidades de diatomáceas, clorófitas, outros gêneros de cianofíceas, rotíferas, nematódeos, anelídeos e protozoários. Em meio às onze amostras analisadas, apenas uma foi diagnosticada como absolutamente livre de outros organismos, ao comparar sua estrutura microscópica com ilustrações presentes na Chave para Identificação e Descrições de Gêneros de Algas de Água Continentais do Brasil (BICUDO & MENEZES, 2006), inferiu-se que poderia tratar-se de um espécime de *Nostoc commune*, uma espécie de interesse para esse estudo, identificada após esse momento como *Nostoc cf. commune* (**Figura 1**).

Figura 1 – Colônia de *Nostoc commune* vista por microscopia óptica em aumento de 1000x.



Fonte: O Autor, (2024).

O processamento da amostra para se obter repiques axênicos iniciou-se com as mais rígidas e criteriosas medidas de higienização e esterilização por calor úmido de todos os aparatos a serem utilizados, seguindo rigorosamente todos os métodos discriminados no Manual para Cultivo de Cianobactérias (JACINAVICIUS et al., 2013). Após múltiplas tentativas, sem êxito, de isolar o inóculo por meio de repiques, foi necessário recorrer a um protocolo capaz de inibir a presença de fungos, bactérias e pequenos invertebrados. Para isso a amostra, previamente macerada, foi submetida a fluxos de seringa e banho de ultra-som para romper a mucilagem que envolve a colônia dissociar as células dos tricomas (FIORE et al., 2000), permitindo assim a liberação dos acinetos, que foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e ressuspensos em solução salina a 0,85%, para então serem submetidos a uma lavagem em hipoclorito de sódio a 1%, visto que a espessa parede celular dos acinetos livres resiste a ação do mesmo (VAZ, 2010).

O procedimento consistiu em imergir a amostra em solução de hipoclorito de sódio 1% por dez segundos, cuja remoção da solução foi feita por meio de uma bomba de sucção a vácuo com uma membrana de ultra-filtração de 0,22 µm. O excedente retido na membrana seguiu para plaqueamento em meio BG-11 (-N) solidificado com ágar. As placas foram encubadas em câmara de crescimento a 24 °C e fotoperíodo de 16 horas (JACINAVICIUS et al., 2013). Repiques foram realizados a cada 15 dias, esse procedimento foi repetido por 3 vezes até constatar-se a pureza do inóculo. Entre

cada repique, os inóculos passaram por um protocolo para lavagem de células de cianobactérias com extran® 0,1% desenvolvido por Ricardo Y. Honda e Elaine Crespim – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, (CENA-USP) como citado no Manual para Cultivo de Cianobactérias por (JACINAVICIUS et al., 2013), que consiste em sequenciais enxagues de pellets em solução de extran® 0,1, e resuspensão em meio BG-11, eliminando assim um percentual da mucilagem polissacarídica da colônia e bactérias que crescem aderida a ela. As placas de inóculos que vieram a apresentar sinais de contaminação por fungos e bactérias, foram submetidas a luz germicida (UV) por vinte minutos, quantas vezes foram necessárias, procedimento que se mostrou muito eficiente.

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA AMOSTRA

Nos estudos microbianos, são corriqueiras as dificuldades nas identificações taxonômicas, as variadas divergências nas organizações de clados, vêm dividindo opiniões de especialistas, essas dificuldades se dão principalmente pela inviabilidade de análises e avaliações morfológicas quando necessário chegar a um nível de gênero ou espécie, seja pela constante semelhança morfológica desses organismos ou pela impossibilidade de visualizar padrões de microestruturas em microscopia óptica. Tradicionalmente, a amplificação por PCR e sequenciamento do gene 16S (RNA ribossômico) tem sido utilizado para identificação molecular de cianobactérias, entretanto, estudos mais recentes indicam maior viabilidade na amplificação e sequenciamento da região intergênica, o espaçador interno transcrito (ITS), presente entre os genes 16S RNA e 23S RNA (ITEMAN et al., 2000), como constatado no estudo "An Evaluation of Four Phylogenetic Markers in *Nostoc*: Implications for Cvanobacterial Phylogenetic Studies at the Intrageneric Level" (HAN; FAN; HU, 2008) que estabelece uma comparação entre quatro marcadores, para quatro genes distintos de *Nostoc* - rpoC1, hetR, robLX e ITS 16S tRNA - 23S rRNA, avaliando suas eficiências em estudos filogenéticos para alcançar o nível intragênico. Por conseguinte, o marcador para ITS mostra-se o mais informativo quando seu produto sequenciado é comparado aos bancos de dados, sendo este, o mais indicado para verificações taxonômicas. Iteman et al. (2000) ressalta que "as regiões de ITS

cianobactérias investigadas até o momento variam em tamanho de 354 a 545 nucleotídeos" e a transcrição primária do operon do rRNA pode sofrer emparelhamento em regiões complementares, ocasionando uma dupla fita, sendo esta, uma estrutura secundária (ITEMAN et al., 2000).

Contudo, por suspeitar-se que a cepa isolada nesse trabalho se tratava da espécie lectótipo do gênero, *Nostoc commune*, o anelamento apenas no gene 16S, possivelmente seria suficiente que o sequenciamento confirmasse a espécie, que por sua vez, foi confirmada com 100% de compatibilidade.

O processamento da amostra para realização do sequenciamento molecular só foi possível após ser obtida a pureza do inóculo. O sequenciamento do gene 16s do exemplar, realizado pela empresa GoGeneticAgro® iniciou-se pela extração do material genético, utilizando Loccus Extracta Kit Fast – DNA e RNA viral; PCR convencional; gel de eletroforese; purificação de Produto de PCR com Exo/Sap; marcação de DNA purificado com BigDye; purificação e análise em Genetic Analyser 3500xL, pop7, capilar 50cm - reação de Sequenciamento Sanger, utilizando reagentes da Thermo Fisher Scientific, e entrega de arquivos de sequência e laudo. Os dados moleculares confirmarem a identificação da cepa como *Nostoc commune*, após sequenciar todas as zonas conservadas do gene 16S através dos marcadores universais 27F (5' AGATTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3').

### 2.3 PRODUÇÃO E CONSERVAÇÃO DE BIOMASSA PARA USO EXPERIMENTAL

Um inóculo de *Nostoc commune* (**Figura 2**), previamente isolado em placa de meio de cultura Ágar BG-11, e posteriormente cultivadas em meio BG-11 líquido sob aeração constante utilizando um compressor de ar para aquário, afim de acelerar o crescimento do cultivo, foi, após 15 dias, transferido para um biorreator da marca TECNAL® e modelos Tec-bio-flex Controlador, com capacidade de 5 litros, onde foram introduzidos 4 litros de meio BG-11 junto com o inóculo, que foram mantidos sob agitação constante de 100 rpm, temperatura de 25° C, aeração constante por compressor de ar, pH 7,4 sendo ajustado pelo equipamento quando necessário e iluminação por 24 horas/dia. A cada 3 semanas a biomassa produzida no biorreator

foi retirada, colocada em provetas de 1 litro de volume, onde ficou decantando por 1 hora e o líquido foi separado da massa decantada por sifonagem do Princípio de Pascal. Quatro meses se passaram até que a quantidade de biomassa necessária fosse atingida. Para que não houvesse morte celular dentro da massa produzida, até que fosse produzida a quantidade necessária, recorreu-se ao processo de liofilização da biomassa.

Figura 2 – Tricoma de *Nostoc commune* fixado em mitose visto por microscopia eletrônica de varredura em aumento de 20.000x.



Fonte: O Autor, (2024).

Devido a grande quantidade de biomassa necessária para o estabelecimento dos testes, e a impossibilidade de produzi-la em grande escala de forma simultânea, o método de liofilização para preservar o produto assim que retirado do fotobiorreator, foi o mais indicado, consistindo em retirar de dentro da célula tudo que se encontra em estado líquido, e posteriormente congelado. Isso é feito por liquefação, do estado sólido diretamente para o estado gasoso, sem que a célula se rompa, ficando assim com seu metabolismo inativo. Esse método se mostra muito eficiente para isso, podendo preservar essas culturas por anos (GHERNA, 1994).

O procedimento consistiu em congelar a biomassa a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 horas antes de encaminhá-la para a liofilização. O liofilizador, modelo LV2000 e marca TERRONI®,

quando ligado, seu condensador vai a  $-30^{\circ}\text{C}$  e então sua bomba de vácuo é ligada, gerando por consequência um vácuo dentro do equipamento. A temperatura interna do aparelho chega a  $-50^{\circ}\text{C}$  e na sequência sobe gradativamente até chegar em  $30^{\circ}\text{C}$ , esse processo demora de 24 a 30 horas. A massa liofilizada foi submetida a moagem em moinho industrial, e armazenada em recipientes plásticos vedados, em temperatura ambiente, até reunir toda a quantidade requerida para os testes.

## 2.4 EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a determinação das dosagens de biomassa de *Nostoc* a serem introduzidas no plantio das mudas experimentais, primordialmente foi pesado o volume de substrato a ser utilizado, que foi de 940g por vaso. O volume da rega foi determinado introduzindo água no vaso com substrato até que se inicia-se o gotejamento água pelo fundo, o volume de rega foi de 200ml. O preparo da biomassa total para as dosagens utilizou 1kg de biomassa liofilizada em pó, diluído em 2300ml de água deionizada, ficando com um aspecto pastoso e homogêneo. As dosagens de biomassa de alga foram determinadas de acordo com os percentuais de 25, 50 e 75% do volume da rega, para isso foram utilizadas provetas graduadas de 200ml, onde foi introduzida biomassa de alga em 25% de seu volume, posteriormente 50, e 75%, essas quantidades foram pesadas e através dos valores de pesagem obteve-se as dosagens para todas as repetições, cada uma recebeu o percentual de massa homogeneizado em 200ml de água.

O ensaio experimental, iniciado em 11 de maio de 2023 e observado por 45 dias, até 26 de junho de 2023, contou com três dosagens e mais o grupo controle, cada um com seis repetições. Para sua montagem foram compradas mudas de alface em loja de produtos agrícolas e plantadas em vasos contendo substrato da marca EntreFlores®, composto por casca de *Pinus* compostada e casca de arroz carbonizada. Cada repetição recebeu uma dosagem de biomassa de alga, excluindo-se o grupo controle. Os vasos foram mantidos em laboratório sob temperatura ambiente em prateleira com fotoperíodo de 12 horas, a distribuição dos vasos contou com delineamento inteiramente casualizado (DIC), as mudas foram regadas com água

torneiral a cada 7 dias com 200ml cada, com auxílio de um béquer de vidro graduado em mililitros.

Ao término do período de análise, cada muda de alface foi removida do substrato e suas raízes foram lavadas cuidadosamente em água corrente. Com o auxílio de balança analítica de precisão e uma placa de Petri, foi aferida a massa fresca total de cada repetição, consecutivamente, com uma lâmina de bisturi foram separadas raízes da parte aérea, e cada uma das partes foi pesada separadamente. Logo após, cada planta foi acondicionada em sacos de papel *Kraft* e submetida a secagem em estufa a 60°C por 12 horas, após esse período as repetições foram retiradas dos sacos de papel e colocadas em cadinhos para mais 12 horas de secagem.

### 3.5 ANÁLISES QUÍMICA E ESTATÍSTICA DAS AMOSTRAGENS EXPERIMENTAIS

Para constatar a viabilidade da aplicação de *Nostoc commune*, espécie fixadora de nitrogênio atmosférico, como biofertilizante em mudas de alface, optou-se por quantificar as concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) no tecido vegetal e no substrato de cada repetição. Para essa análise foi usado o protocolo de (EMBRAPA, 2009), com metodologia adaptada por esse trabalho da forma apresentada em sequência. As amostras foram secas em estufa a no máximo 60°C, pois o nitrogênio (N<sub>2</sub>) é volátil, e temperaturas mais elevadas resultariam perdas do elemento. Após secagem absoluta, as amostras foram moídas, acondicionadas em frascos plásticos e seguiram para análise química.

A composição do substrato, formulado a base de material vegetal, possibilitou que a quantificação da concentração de nitrogênio no substrato fosse realizada através do mesmo protocolo utilizado para quantificá-lo no tecido vegetal. O protocolo mencionado foi adaptado da forma que segue. Para digestão H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kjeldahl), transferiu-se 100mg de amostra para tubo digestor e adicionou-se 1g de mistura de catalítica de sais (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + CuSO<sub>4</sub> [10:1]), 5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% e 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %. Na sequência colocou-se os tubos em bloco digestor, o equipamento foi aquecido lentamente até atingir 350°C, iniciou-se o aquecimento em 100°C por 1 hora, aumentou-se para 250°C por mais 1 hora, e na sequência, 350°C até que fosse

possível visualizar o material totalmente solubilizado em tom de verde acentuado, não se completou o volume com água, evitando uma diluição desnecessária. Esperou-se o resfriamento dos tubos, onde o líquido ficou totalmente branco e translúcido.

Para a destilação (Kjeldahl), transferiu-se todo o extrato digerido de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para o destilador Kjeldahl, conectou-se um béquer de 100mL contendo 35mL de solução  $\text{H}_3\text{BO}_3$  3% com solução alcoólica de verde-de-bromocresol 0,1% e vermelho-de-metila 0,1%, na ponta do destilador e adicionou-se 10mL de NaOH no material digerido. Abriu-se a torneira do vapor de água e destilou-se até completar 45mL de solução, a coloração da solução de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  passou da tonalidade de vinho para verde. Então titulou-se com a solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ . O ponto inicial da titulação foi a tonalidade verde, e o ponto de virada se deu ao atingir novamente coloração de vinho, levemente acinzentada. O cálculo se deu pela fórmula  $\text{N-NH}_4\text{g kg}^{-1} = (\text{Vb} - \text{Va}) \times 1,4$  onde:  $\text{Va}$  = volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gasto no branco, em mL.  $\text{Vb}$  = volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gasto na amostra, em mL.

Na análise estatística, todos os dados foram analisados quanto aos pressupostos da Anova de normalidade e homogeneidade das variâncias. Em caso de dados não normais e/ou não homogêneos, os mesmos foram transformados por função logarítmica e/ou adição de uma constante ( $X = X + 2$ ) quando  $X > 0$ . Na sequência, foi realizada a análise de variância com posterior post-hoc test (Tukey) e regressão para comparação de médias ( $p < 0,05$ ). Em caso de dados não normais mesmo após transformação, os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, e posterior regressão. Todos os testes estatísticos foram realizados através do software Assistat® versão 7.7 pt (2023).

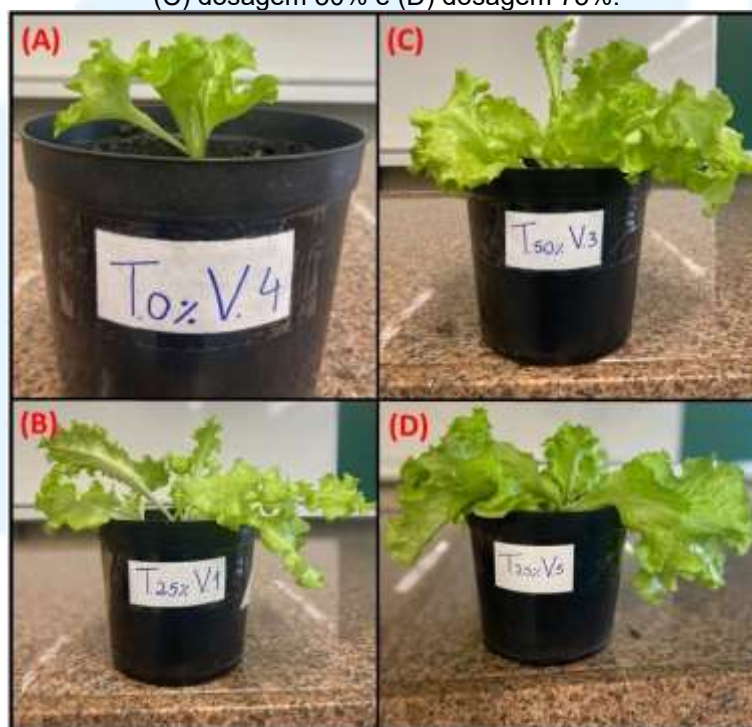
### 3 RESULTADOS

Houve dificuldade de identificar morfologicamente espécies do gênero *Nostoc*, com isso foi necessário recorrer a métodos modernos de identificação molecular, que foram possíveis após a purificação e isolamento da amostra selecionada. Espécies distintas do gênero *Nostoc*, quando misturadas em um meio de cultura estabelecem uma competição (FUNASA, 2003) assim que os níveis de nutrientes começam a baixar, resultando na liberação de cianotoxinas e consequentemente na morte das

colônias (BARBOSA, 2009). Portanto, resultou na necessidade de identificar e isolar uma única espécie do gênero, para então realizar a produção de biomassa a partir de uma amostra totalmente pura, como mencionado,

O experimento, aplicação de dosagens de *Nostoc commune* em mudas de alface, após 45 dias de observação, mostrou notáveis resultados visuais, onde o grupo controle se apresentou em proporções mínimas quando comparado já com a dosagem de 25%. A adição da biomassa de *Nostoc commune* no substrato de plantio se mostrou significativamente eficiente como biofertilizante. O nitrogênio amoniacal proveniente da fixação dos heterocistos das cianobactérias, foi de possível absorção pelas raízes das mudas de alface, isso pode ser comprovado ao comparar a variação de tamanho das mudas ao final do período de observação (**Figura 3**).

Figura 3 – Mudanças de alface após 45 dias de observação, onde (A) grupo controle, (B) dosagem 25%, (C) dosagem 50% e (D) dosagem 75%.



Fonte: O Autor, (2024).

Os dados de pesagem da massa fresca total foram analisados pelos pressupostos da Anova e constatou-se que os mesmos (**Tabela 1**), são considerados normais. No entanto, esses não apresentaram homogeneidade de variâncias, o que os levou à transformação por meio de função logarítmica, após isso foi possível aferir

a homogeneidade dos dados, por conseguinte, levados à análise de variância. Os resultados de média do parâmetro massa fresca de alface, evidenciaram que, estatisticamente, houve diferenças significativas entre todos os tratamentos, sendo o valor de 75% de biofertilizante o mais efetivo.

Tabela 1 – Tabulação de dados brutos da pesagem da massa fresca (g).

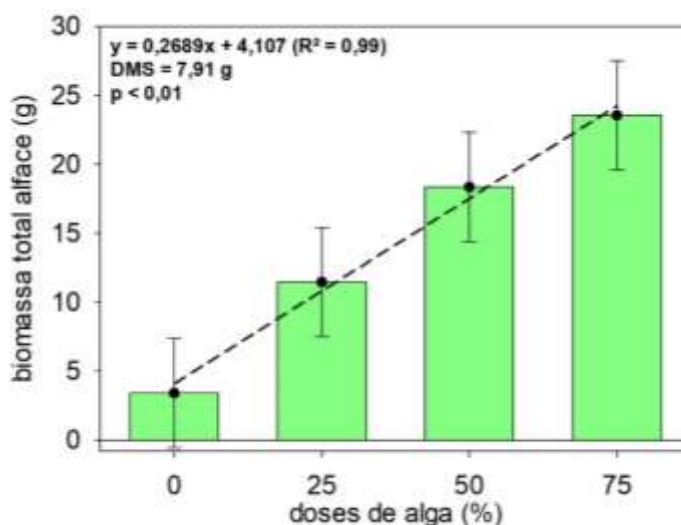
Tratamento	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	MÉDIA
Dosagem 0%	6,40	4,96	2,31	2,68	2,18	2,01	<b>20,54</b>
Dosagem 25%	15,33	9,99	9,08	14,06	9,72	10,59	<b>68,77</b>
Dosagem 50%	16,22	21,95	23,76	18,96	15,38	15,79	<b>112,06</b>
Dosagem 75%	14,71	22,26	27,94	13,41	35,83	27,1	<b>141,25</b>

Fonte: O autor (2024).

A biomassa fresca total da alface foi 6,9 vezes superior no tratamento 4 (75%) em relação ao tratamento 1 (controle). O tratamento 3 (50%) não se diferiu do tratamento 4 (75%), bem como foi equivalente ao tratamento 2 (25%), sendo todos superiores ao controle. A análise de regressão indicou ajuste linear dos dados ( $R^2 = 0,99$ ), enquanto o ajuste quadrático não foi significativo (**Figura 4**).

A aplicação de *Nostoc commune* como biofertilizante foi eficiente na produção de alface devido a sua fixação de nitrogênio atmosférico, totalmente absorvível pelas plantas quando convertido em  $NH_4$ .

Figura 4 – Biomassa fresca total (g) de alface (*Lactuca sativa*) submetida a doses crescentes de biomassa de *Nostoc commune*. Barras de erro indicam a diferença mínima significativa (DMS) de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). Análise de regressão indicou ajuste linear dos dados.



Fonte: O autor (2024).

Os resultados de média do parâmetro teor de nitrogênio de alface, evidenciaram que, estatisticamente, houve diferenças significativas entre o tratamento controle e os demais, e que se mostraram iguais entre eles (Tabela de médias 2).

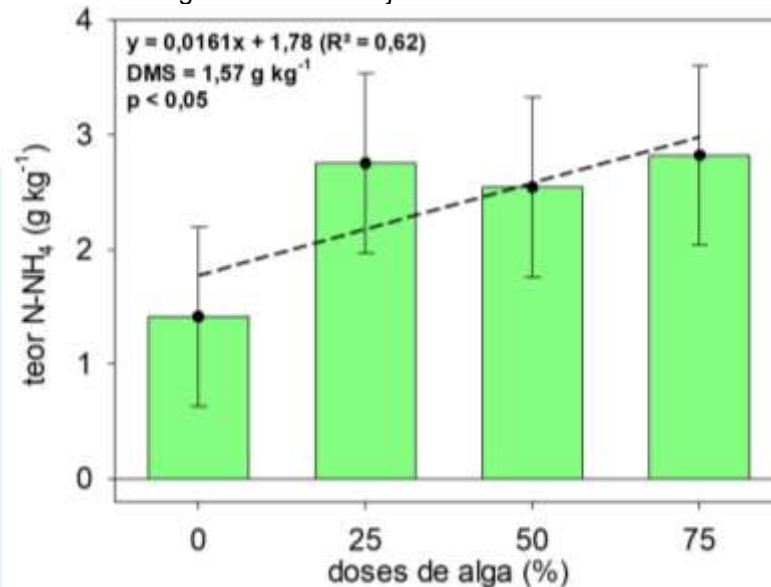
Após realizada a análise química do tecido vegetal, que determinou a concentração de nitrogênio total presente nas amostras, os dados dessa análise (**Tabela 2**) foram considerados normais e homogêneos pelos pressupostos da Anova, isso os levou para a análise de variância. O teor de nitrogênio total da alface foi 2,9 vezes superior no tratamento 4 (75%) em relação ao tratamento 1 (0%). Nos tratamentos 2 (25%), 3 (50%) e 4 (75%), o teor absorvido por miligrama foi considerado equivalente, e ainda que sejam superiores ao grupo controle, não apresentaram diferença mínima significativa, não havendo variância considerável entre nenhum dos quatro tratamentos. A análise de regressão indicou ajuste linear dos dados ( $R^2 = 0,99$ ), enquanto o ajuste quadrático não foi significativo. Logo, o teor de nitrogênio amoniacal absorvido por miligrama na alface se mantém invariável (**Figura 5**), isso possivelmente se dá por atingir o limite de demanda necessário pela planta, que é inferior à oferta de nitrogênio no substrato.

Tabela 2 – Tabulação de dados brutos do teor de nitrogênio amoniacal presente por Kg de alface (Lactuca sativa).

Tratamento	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	MÉDIA
Dosagem 0%	0,1875	0,2253	0,1461	0,1003	0,1238	0,1003	<b>0,1472</b>
Dosagem 25%	0,5774	0,2922	0,3502	0,6646	0,2922	0,2922	<b>0,4114</b>
Dosagem 50%	0,2922	0,6374	0,3502	0,3765	0,3765	0,2922	<b>0,3875</b>
Dosagem 75%	0,4014	0,3502	0,4248	0,3765	0,4248	0,6512	<b>0,4381</b>

Fonte: O autor (2023).

Figura 5 – Teor de nitrogênio amoniacal absorvido (g) de alface (*Lactuca sativa*). Barras de erro indicam a diferença mínima significativa (DMS) de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Análise de regressão indicou ajuste linear dos dados.



Fonte: O autor (2024).

O teor de nitrogênio calculado acima não é um dado suficientemente conclusivo para constatar os resultados desse trabalho, visto que apenas indicam a demanda do vegetal e a média do que foi disponibilizado de nitrogênio no substrato e do quanto foi absorvido por miligrama de massa seca. Portanto, para obter os resultados, foi necessário calcular o Fator de Diluição, levando em conta que o teor de nitrogênio obtido acima corresponde ao que continha em 0,1g de massa seca de alface, sendo assim, cabe calcular o valor que corresponde ao que contém de nitrogênio na massa seca total do corpo vegetal de cada amostra. O teor de umidade da alface corresponde a 80% de sua massa total (DOURADO-NETO et al, 2023), logo, o valor da massa seca equivale a 20% da massa total, com isso, a partir dos dados de pesagem da massa fresca total obtidos, foi possível calcular a massa seca total das repetições de alface, e consequentemente o conteúdo total de nitrogênio amoniacal diluído nessa massa.

Os dados de conteúdo total de N-NH<sub>4</sub> obtidos (**Tabela 3**), foram analisados pelos pressupostos da Anova e foram considerados normais, entretanto para obter a homogeneidade foi necessário aplicar uma constante ( $X = X + 2$ ). O conteúdo total de nitrogênio presente no corpo da alface foi 13 vezes superior no tratamento 4 (75%) em relação ao tratamento 1 (0%). Nos tratamentos 2 (25%), 3 (50%) e 4 (75%), o conteúdo total de N-NH<sub>4</sub> foi considerado equivalente, e ainda que sejam superiores

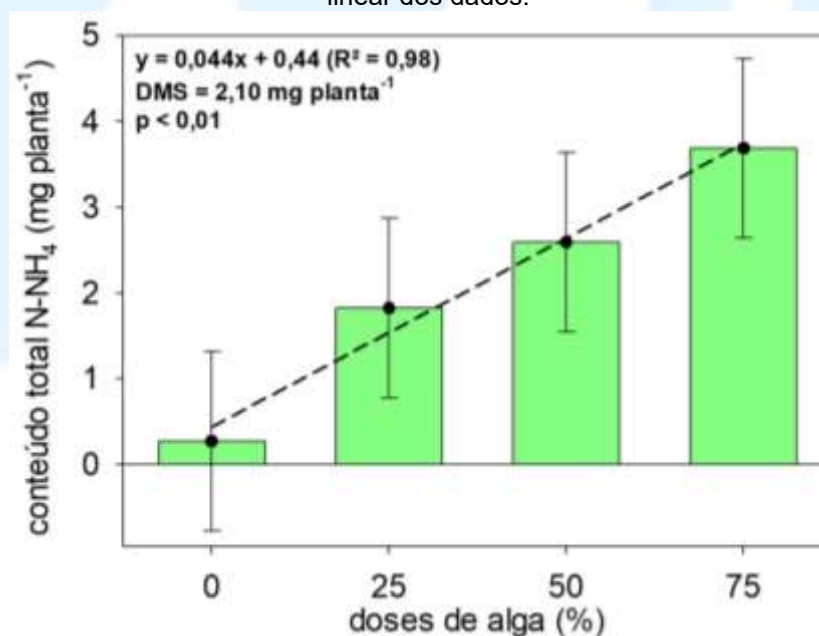
ao grupo controle, não apresentaram diferença mínima significativa, havendo variância considerável somente entre o grupo controle os outros tratamentos. A análise de regressão indicou ajuste linear dos dados ( $R^2 = 0,99$ ), enquanto o ajuste quadrático não foi significativo (**Figura 6**). Logo, conclui-se que o tratamento de 25% de biomassa de alga exerce função suficiente de biofertilizante, havendo perda desnecessária de material nos demais, assim como, o maior teor de nitrogênio contido em cada tratamento, se deu pelas maiores dimensões que as repetições tomaram devido a maior oferta de nitrogênio disponível no substrato.

Tabela 3 – Tabulação de dados brutos do conteúdo total de N-NH<sub>4</sub> (mg Kg<sup>-1</sup> massa seca de alface).

Tratamento	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	MÉDIA
Dosagem 0%	0,53	0,45	0,17	0,18	0,16	0,14	<b>0,27</b>
Dosagem 25%	3,13	1,06	1,10	3,51	1,03	1,12	<b>1,82</b>
Dosagem 50%	1,72	5,14	2,87	2,18	1,98	1,67	<b>2,59</b>
Dosagem 75%	2,00	2,69	4,01	1,72	5,15	6,56	<b>3,69</b>

Fonte: O autor (2024).

Figura 6 – Conteúdo total de N-NH<sub>4</sub> (g Kg<sup>-1</sup>) massa seca de alface (*Lactuca sativa*) submetida a doses crescentes de biomassa de *Nostoc commune*. Barras de erro indicam a diferença mínima significativa (DMS) de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). Análise de regressão indicou ajuste linear dos dados.



Fonte: O autor (2024).

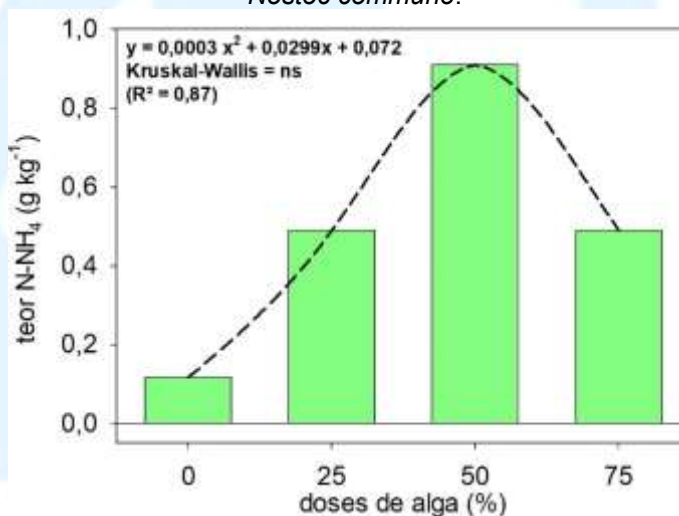
Quanto aos dados de teor total de N-NH<sub>4</sub> quantificados no substrato (**Tabela 4**) onde cada repetição foi plantada, foram considerados não normais, e então analisados por Kruskal-Wallis, que não indicou diferença mínima significativa entre os tratamentos, entretanto a regressão apontou ajuste quadrático significativo, onde até o tratamento 3 (50%) houve incremento de nitrogênio no substrato, sendo esse o maior índice de nitrogênio, enquanto que no último tratamento (75%) a dosagem de biomassa de alga diminuiu o teor de N-NH<sub>4</sub> no substrato (**Figura 7**).

Tabela 4 – Tabulação de dados brutos do conteúdo total de N-NH<sub>4</sub> (mg Kg<sup>-1</sup> substrato).

Tratamento	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	MÉDIA
Dosagem 0%	0,56	-0,14	-0,14	0,14	0,28	0	
Dosagem 25%	0,28	0,14	0,56	0,28	0,56	1,12	<b>0,49</b>
Dosagem 50%	-0,14	0,56	0,56	0,98	1,54	1,96	
Dosagem 75%	0,42	0,56	0,56	0,42	0,42	0,56	<b>0,49</b>

Fonte: O autor (2024).

Figura 7 - Conteúdo total de N-NH<sub>4</sub> (g Kg<sup>-1</sup>) substrato submetido a doses crescentes de biomassa de *Nostoc commune*.



Fonte: O autor (2024).

#### 4 DISCUSSÃO

Conforme os dados obtidos nesse trabalho, onde constatou-se que a biomassa de cianobactérias subsidiou com maestria as demandas nutricionais da planta, tal como a suficiência da menor dosagem aplicada, 25% de biomassa de *Nostoc*, nota-se compatibilidade com os resultados de (HERNÁNDEZ-REYES et al, 2019), que ao aplicarem essa espécie no cultivo de milho azul, constataram que a produção de

massa fresca das plantas que receberam *Nostoc commune* como biofertilizante, é equivalente a massa fresca produzida pelas plantas que receberam fertilizante químico, com o ganho de não elevarem a acidez do solo, além de não ser um método caro e poluente.

Devido aos teores de 25% já demonstrarem eficiência, e conforme (CORDEIRO et al., 2017) em sua pesquisa, que indicaram que concentrações de 0,05 g L<sup>-1</sup> A biomassa da microalga *Asterarcys quadricellulare*, uma dosagem também intermediária, constata-se que a aplicação de algas, mesmo em pequenas quantidades, já se mostra promissora.

Os presentes dados obtidos também são convergentes com os resultados de (HERNÁNDEZ-REYES, 2019) que, ao aplicar um tratamento com o consórcio de cianobactérias, esse, apresentou a maior altura de planta e número de folhas por planta, o que se refletiu na quantidade de forragem produzida (12,5 t/ha). A produção de grãos foi semelhante entre o consórcio de cianobactérias e o tratamento com fertilizante químico (1,76 e 2,07 t/ha, respectivamente).

A medição do nitrogênio amoniacal do tecido vegetal de cada uma das repetições implementadas desse trabalho pode comprovar a eficiência desses seres como biofertilizantes, assim como aferiu que a menor dosagem utilizada foi suficiente para suprimir a demanda nutricional da planta. Contudo, era espado que houvesse o estabelecimento de uma relação simbiótica entre as colônias de *Nostoc* e as raízes das alfices, como ocorre com plantas do gênero *Cycas*, entretanto, embora as colônias permaneçam vivas e viáveis no substrato após a colheita, os nódulos simbióticos não puderam ser encontrados nas raízes, fato que não diminuiu sua eficiência.

A dosagem intermediária dos citados trabalhos, possivelmente se mostra mais eficiente devido ao fato de que a abundância de nitrogênio disponível para as plantas não exija um crescimento significativo das raízes, o que pode levar a uma absorção insuficiente de outros nutrientes. O excesso de nitrogênio, pode também inibir a absorção de outros nutrientes porque as plantas têm uma capacidade limitada de absorver nutrientes do solo. Quando há um excesso de nitrogênio, as plantas podem absorvê-lo em excesso, o que pode levar a um desequilíbrio nutricional e à inibição da absorção de outros nutrientes (ESCH, 2014).

As cianobactérias fixadoras de nitrogênio, em especial as espécies do gênero *Nostoc*, têm um comprovado potencial biofertilizante a ser explorado, sua eficiência na produção vegetal aliada aos fatores ambientais aos quais elas corroboram, como redução da poluição proveniente de fertilizantes químicos e seus efeitos na saúde humana e animal, e aos fatores econômicos devido a sua rápida produção, custos baixos e mão de obra quase mínima, deixam um respaldo para uma maior exploração de uso e aperfeiçoamento de técnicas de produção.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos em especial ao Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira por todo suporte em todo o desenvolvimento desse trabalho. Por todo suporte técnico agradecemos aos Profs. Drs. Ana Cristina de Seixas Greca, Patrícia Maria Stuelp Campelo, Rodrigo de Andrade Kersten, Selene Esposito, Sheron Campos Cogo e Paulo Cesar Soares Junior. Aos biólogos Acir José Franco e Larissa Juliana Pimentel.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA, T. **Cianobactérias tóxicas e processos de remoção**. 2009. Monografia apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Curso de Especialização em Microbiologia Ambiental e Disponível em: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99UHCT/1/monografia\\_tassa.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99UHCT/1/monografia_tassa.pdf). Acesso em: 25 jul 2023.

BICUDO, C; MENEZES, M. **Gênero de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrição**. [S. l.]: Rima Editora, 2006. v. 2.

CANAL RURAL, ministério confirma que Rússia embarcou fertilizantes ao Brasil. [S. l.], 7 mar. 2022. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/ministerio-russia-embarcou-fertilizantes-brasil/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

CIVITEREZA, G. Os Impactos da Adubação Mineral no Meio Ambiente. 20 de maio de 2021. Disponível em: <https://www.terradecultivo.com.br/os-impactos-da-adubacao-mineral-no-meio-ambiente/> Acesso em: 17 abr. 2022.

CORDEIRO, E.C.N. et al. Microalga Biofertilizer Triggers Metabolic Changes Improving Onion Growth and Yield. **Horticulturae**, Brasil, v. 8, n. 3, p. 223, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-7524/8/3/223>. Acesso em: 20 fev 2024.

DOURADO-NETO, D. et al. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.58, n.1, p.181-185, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/cLm34PS9cXPfkkDYyyKsn3f/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 25 jul 2023.

ESCH, C. A Native Cyanobacteria, Nostoc, as a Biofertilizer, **Semantic Scholar**, 2014. Disponível em: [https://digitalcommons.wku.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1467&context=student\\_honors](https://digitalcommons.wku.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1467&context=student_honors). Acesso em: 20 fev 2024.

IORE, M. F. et al. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Canadá, v. 39, p. 159-169, janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701299001104>. Acesso em: 15 abr 2023.

FORBES, **Ministério confirma que Rússia embarcou fertilizantes ao Brasil**. [S. l.], 18 abr. 2022. Disponível em: <https://forbes.com.br/forbesagro/2022/04/navios-com-fertilizante-russo-chegam-ao-brasil-apesar-de-sancoes/>. Acesso em: 20 abr. 2022

FUNASA. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. – Brasília: Ministério da Saúde: **Fundação Nacional de Saúde**, 2003. 56 pg.

GALHANO, V. Morphological, biochemical and molecular characterization of Anabaena, Aphanizomenon and Nostoc strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. **Hydrobiologia**, Suíça, v. 663, p. 187–203, março, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10750-010-0572-5>. Acesso em: 14 abr 2023.

GHERNA, R. L. Culture Preservation. In: GERHARDT, P. et al. (Org) Methods for General and Molecular Bacteriology. Massachusetts, **American Society for Microbiology**, 1994. p. 279–291.

GOMES, J. A.; C. A. Scapim; A. de Lucca e Braccini; P. S. Vidigal Filho; E. Sagrilo; F. Mora. Adubações orgânica e mineral, produtividade do milho e características físicas e químicas de um Argissolo Vermelho Amarelo. **Acta Scien Agron.**, Maringá, v. 27, n. 3, p. 521-529, 2005. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3030/303026559020.pdf>. Acesso em: 25 jul 2023.

HAN, D.; FAN, Y.; HU, Z. An evaluation of four phylogenetic markers in Nostoc: implications for cyanobacterial phylogenetic studies at the intrageneric level. **Current Microbiology**, Suíça, v. 58, p. 170–176, fevereiro, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18972163/>. Acesso em: 14 abr 2023.

HERNÁNDEZ-REYES, B. M. *et al.* Uso potencial de cianobacterias como biofertilizante para el cultivo de maíz azul en la ciudad de México. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. Cidade do México, v. 10, n. 1, p. 13 – 27, 2019. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/333458447\\_uso\\_potencial\\_de\\_cianobacterias\\_como\\_biofertilizante\\_para\\_el\\_cultivo\\_de\\_maiz\\_azul\\_en\\_la\\_ciudad\\_de\\_mexico?enrichid=rgreq-fc1ffdef1e6f05c73a264eb183edc97d-xxx&enrichsource=y292zxjqywdlozmzmzq1odq0nztbuzo3njqwntm4nda0nzzgymdlamt\\_u1ote3njazotmwoq%3d%3d&el=1\\_x\\_3&esc=publicationcoverpdf](https://www.researchgate.net/publication/333458447_uso_potencial_de_cianobacterias_como_biofertilizante_para_el_cultivo_de_maiz_azul_en_la_ciudad_de_mexico?enrichid=rgreq-fc1ffdef1e6f05c73a264eb183edc97d-xxx&enrichsource=y292zxjqywdlozmzmzq1odq0nztbuzo3njqwntm4nda0nzzgymdlamt_u1ote3njazotmwoq%3d%3d&el=1_x_3&esc=publicationcoverpdf). Acesso em: 22 jul 2022.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859– 8873, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24037408/>. Acesso em: 25 jul 2023.

ITEMAN, I. et al. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. **Microbiology**, Inglaterra, v. 146, p. 1275–1286, junho, 2000. Disponível em: [https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-146-6-1275#abstract\\_content](https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-146-6-1275#abstract_content). Acesso em: 14 abr 2023.

JACINAVICIUS, F. et al. Manual para Cultivo de Cianobactérias. São Paulo: **Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa em Ficologia**, 2013. Disponível em: [https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/wp-content/uploads/sites/235/2013/09/virtuais\\_4cianobact%C3%A9rias.pdf](https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/wp-content/uploads/sites/235/2013/09/virtuais_4cianobact%C3%A9rias.pdf). Acesso em: 15 abr 2023.

KOMÁREK, J. et al. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. **Preslia**, Praga, v. 86, p. 295–335, dezembro, 2014. Disponível em: <https://www.preslia.cz/article/pdf?id=103>. Acesso em 14 abril 2023.

MAY, D. S. et al. <sup>15</sup>N Stable Isotope Labeling and Comparative Metabolomics Facilitates Genome Mining in Cultured Cyanobacteria. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 15, p. 758–765, fevereiro, 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acscchembio.9b00993>. Acesso em: 14 abr 2023.

SINGH, P. et al. Phylogenetic evaluation of the genus *Nostoc* and description of *Nostoc neudorfense* sp. nov., from the Czech Republic. **Microbiology**, Inglaterra, v. 70, p. 2740–2749, março, 2020. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004102>. Acesso em: 14 abr 2023.

KOMÁREK, J. Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. **Hydrobiologia**, Suíça, v. 639, p. 231–243, fevereiro, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10750-009-0030-4>. Acesso em 14 abr 2023.

KOMÁREK, J. Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: state as of 2014. **Hydrobiologia**, Suíça, v. 764, p. 259–270, março, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10750-015-2242-0>. Acesso em: 14 abr 2023.

KOMÁREK, J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. **European Journal of Phycology**, Inglaterra, v. 51, p. 346–353, maio, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09670262.2016.1163738>. Acesso em: 14 abr 2023.

MIYAZAWA, M. et al. Análise química de tecido vegetal. In: SILVA, F. C. (Editor) **Manual para análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA, 2009. p. 191 – 234. Disponível em: [file:///C:/Users/User/Downloads/Manual-de-analises-quimicas-de-solos-plantas-e-fertilizantes-ed02-reimpressao-2014%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/Manual-de-analises-quimicas-de-solos-plantas-e-fertilizantes-ed02-reimpressao-2014%20(2).pdf). Acesso em: 22 jul 2023.

MONTOYA, M, *et al.* Capacidad de biofertilización de un consorcio microbiano fotosintético fijador de nitrógeno. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional., **Simpósio internacional de produção alcoveholes y leveduras**, 2010. Disponível em: [https://drive.google.com/drive/folders/1gWqg\\_6y6nR7kzuwThgonujsrafrMzEqE](https://drive.google.com/drive/folders/1gWqg_6y6nR7kzuwThgonujsrafrMzEqE). Acesso em: 25 jul 2023.

OMAIRI-NASSER, A.; HASELKORN, R.; AUSTIN II, J. Visualization of channels connecting cells in filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. **The FASEB Journal**, Chigago, v. 28, p. 1-7, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24675362/>. Acesso em: 25 jul 2023.

REVIERS, B. Cyanophyta. In: \_\_\_\_\_. **Biologia e Filogenia das Algas**. Porto Alegre, Artmed, 2010, cap. 1, p. 21–33.

VAZ, Marcelo Gomes Marçal Vieira. **Diferenciação celular em nostoc spp: efeito da intensidade luminosa e do padrão de sobreposição dos filamentos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 80. 2010. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/5321>. Acesso em: 25 jul 2023.