

Avaliação do potencial fertilizante e bioestimulante da biomassa de microalgas obtidas no tratamento de águas de escorrência agrícola

Marta Baioneta Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia do Ambiente

Orientadores: Professora Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga

Professor Doutor Henrique Manuel Filipe Ribeiro

Júri:

Presidente: Doutora Cláudia Saramago de Carvalho Marques dos Santos Cordovil, Professora associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga, 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.

2022

Aos meus Pais e à minha Irmã Inês ...

"If you can dream it, you can do it."

Walt Disney

I. Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, Prof.^a Doutora Paula Alvarenga e o Prof.^o Doutor Henrique Ribeiro, por todo o apoio e esclarecimentos prestados ao longo da realização deste trabalho, bem como, toda a disponibilidade e acompanhamento ao longo da realização do mesmo. Gostaria, igualmente, de agradecer à Prof.^a Doutora Mariana Mota, pelo acompanhamento durante a realização dos ensaios e pela disponibilidade e simpatia com que me recebeu e apoiou. Um agradecimento especial também à Allmicroalgae, pelo apoio na produção das microalgas para a realização deste trabalho, em especial à Doutora Joana Laranjeira Silva, Doutora Helena Cardoso e Dra. Inês Guerra. Também não posso deixar de agradecer aos(as) Técnicos(as) dos Laboratórios do Instituto Superior de Agronomia que me apoiaram na realização deste trabalho: ao Eng^o Miguel Martins, à D. Paula Gonçalves, D. Nídia, Sr. José Felício e Sr. Domingos.

Também quero agradecer a todos os Professores deste *mui nobre* Instituto que, ao longo destes 5 anos de percurso académico, se mostraram sempre disponíveis para me apoiar e para esclarecer as minhas dúvidas, independentemente de ser ou não sua aluna.

Aos meus colegas de faculdade que direta e indiretamente me ajudaram a chegar aqui, um muito obrigada, à Ana Marujo, Ana Sousa, Carolina, Joana Marques, Joana Silva, Maria, Margarida, Patrícia entre tantos outros que fazem parte desta grande família que é o ISA. À Ana, Jéssica, Patrícia, Rodrigo, João e Guilherme e a todos os meus amigos um grande obrigada pela dedicação e apoio incondicional, pelos momentos de descanso e companheirismo que me proporcionaram, muito preciosos nestes últimos meses.

Não posso ainda deixar de agradecer, também, a toda a minha família, que me apoiou nesta jornada, desde a minha, Avó, Tios, Tias, Madrinha e restantes, que me proporcionaram chegar ao fim deste desafio. Aos meus Pais e Irmã que, não apenas agora, mas sempre, me deram força para ultrapassar os obstáculos da minha vida e que me apoiaram incondicionalmente durante estes 5 anos de curso.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto AgriWW2Fertilizer, do LEAF/ISA. FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do Projeto LEAF (Ref. UIDB/04129/2020 e UIDP/04129/2020).



II. Resumo

A poluição gerada pela água de drenagem agrícola pode afetar o nível de eutrofização e contaminação das massas de água superficiais, o que deve ser prevenido.

As microalgas têm sido utilizadas no tratamento de águas residuais, aproveitando os nutrientes e a água para o seu cultivo. Este trabalho teve como principal objetivo encontrar uma solução para a carga poluente da água drenante da cultura intensiva de milho, utilizando-a para o crescimento de microalgas (*Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*), a utilizar como fertilizante orgânico ou como bioestimulante. Foi possível fazer o cultivo dessas microalgas em água de drenagem agrícola, com degradação dos herbicidas previamente quantificados até concentrações não detetadas, obtendo-se concentrações finais de 2 g N/L em ambas as suspensões.

O seu potencial como fertilizante foi avaliado pelo crescimento de alface, com substituição de 50% da fertilização mineral azotada (0,5, 1,0 e 2,5 g N/vaso) por via orgânica. A dose mais baixa de N permitiu uma biomassa estatisticamente superior, relativamente ao controlo de fertilização mineral. O solo beneficiou com a fertilização orgânica, comprovado pelo aumento da atividade enzimática da desidrogenase, que foi estatisticamente superior na dose 2,5 g N/vaso com *S. obliquus*, que levou também a um aumento no teor em matéria orgânica. Por outro lado, a fertilização mineral provocou um aumento de 3x na condutividade elétrica do solo, relativamente à fertilização com microalgas, evidenciando que se podem evitar problemas de salinização secundária do solo com este tipo de fertilização orgânica.

Avaliou-se o potencial bioestimulante da biomassa das microalgas, por medição da sua atividade-semelhante a reguladores de crescimentos (auxinas, citocininas e giberelinas), com sementes de alface, utilizando a suspensão original das microalgas, a sua biomassa após centrifugação, ou por aplicação de ultrassons. A atuação das microalgas como bioestimulante, pelo menos com esta semente, não foi clara, mas foi evidente o seu bom desempenho como fertilizante orgânico.

Palavras-chave: tratamento de águas; microalgas (*Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*); fertilizante orgânico; reguladores de crescimento; alface.

III. Abstract

The pollution generated by agricultural drainage water can affect the level of eutrophication and contamination of surface water bodies, which should be prevented. Microalgae have been used in the treatment of wastewater, taking advantage of nutrients and water for their cultivation.

The main objective of this work was to find a solution for the pollutant load of draining water from intensive corn crop, using it for the growth of microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*), to be used as organic fertilizer or as a biostimulant. It was possible to grow these microalgae in agricultural drainage water, with degradation of herbicides previously quantified to undefined concentrations, obtaining final concentrations of 2 g N/L in both suspensions.

Its potential as fertilizer was evaluated by lettuce growth, with a replacement of 50% nitrogenized mineral fertilization (0,5, 1,0 e 2,5 g N/pot) organically. The lower dose of N allowed a statistically higher biomass compared to mineral fertilization control. The soil benefited from organic fertilization, proven by increased enzymatic activity of dehydrogenase, which was statistically higher in the dose 2,5 g N/pot with *S. obliquus*, which also led to an increase in organic matter content. On the other hand, mineral fertilization caused a 3x increase in soil electrical conductivity compared to microalgae fertilization, evidencing that secondary soil salinization problems can be avoided with this type of organic fertilization.

The biostimulant potential of microalgae biomass was evaluated by measuring its activity-similar to growth regulators (auxins, cytokinins and gibberellins), with lettuce seeds, using the original suspension of microalgae, their biomass after centrifugation, or by application of ultrasound. The performance of microalgae as a biostimulant, at least with this seed, was not clear, but its good performance as an organic fertilizer was evident.

Keywords: water treatment; microalgae; (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*); organic fertilizer; biostimulant.

IV. Índice

| | |
|---|-----|
| I. Agradecimentos | ii |
| II. Resumo | iii |
| III. Abstract..... | iv |
| IV. Índice..... | v |
| V. Índice de Figuras..... | vii |
| VI. Índice de Quadros | x |
| VII. Lista de Abreviaturas | xi |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Considerações iniciais | 1 |
| 1.2. Objetivos | 3 |
| 1.3. Estrutura da dissertação..... | 3 |
| 2. Revisão bibliográfica | 5 |
| 2.1. Poluição difusa das águas com químicos de origem agrícola | 5 |
| 2.1.1. Nutrientes | 6 |
| 2.1.2 Pesticidas | 7 |
| 2.1.3 Legislação de proteção da qualidade das águas..... | 8 |
| 2.2. Tratamento de águas de drenagem agrícolas..... | 10 |
| 2.2.1 Zonas húmidas artificiais..... | 11 |
| 2.2.2 Valas de drenagem com vegetação..... | 12 |
| 2.2.3. Tratamento com microalgas | 13 |
| 2.3. Microalgas | 14 |
| 2.3.1. O que são? | 14 |
| 2.3.2 Utilização de microalgas | 15 |
| 2.3.3 Utilização de microalgas para tratamento de efluentes | 17 |
| 2.3.4 Utilização de microalgas como biofertilizantes ou bioestimulantes | 19 |
| 2.4. Casos de estudo de utilização de microalgas como fertilizantes orgânicos | 22 |
| 3. Materiais e métodos | 24 |
| 3.1. Caraterização do local da amostragem e da amostra de água | 24 |
| 3.2. Seleção e crescimento das microalgas na água de drenagem agrícola..... | 26 |
| 3.3 Avaliação do potencial fertilizante da suspensão de microalgas | 27 |
| 3.4 Avaliação do potencial bioestimulante das microalgas <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> | 30 |
| 3.4.1 - Ensaio preliminares para seleção do meio de germinação | 31 |
| 3.4.2 - Preparação das placas de <i>Petri</i> com as suspensões de microalgas para avaliação do seu potencial bioestimulante..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 3.4.3 - Avaliação do efeito semelhante à auxina (IBA) e à citocinina (BAP) - Ensaio de germinação com <i>L. sativa</i> | 33 |
| 3.4.4 - Avaliação do efeito semelhante à giberelina (GA ₃) - Ensaio de germinação com <i>L. sativa</i> | 35 |
| 3.5 Determinações analíticas..... | 35 |
| 3.5.1 Caracterização físico-química da água e das suspensões de microalgas..... | 35 |
| 3.5.2. Análises ao material vegetal..... | 37 |
| 3.5.3. Análise físico-químicas ao solo..... | 37 |
| 3.5.4. Determinação da atividade enzimática da desidrogenase..... | 38 |
| 3.6. Análise dos resultados e tratamento estatístico | 39 |
| 4. Resultados e discussão | 40 |
| 4.1. Caracterização da água de drenagem agrícola e das suspensões de <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> obtidas por crescimento na água de drenagem agrícola..... | 40 |
| 4.2 Avaliação da suspensão de microalga como fertilizante orgânico..... | 42 |
| 4.2.1 – Efeitos das suspensões de <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> na planta..... | 42 |
| 4.2.2 - Efeitos das suspensões de <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> nos parâmetros físico-químicos do solo | 49 |
| 4.2.3 - Efeitos das suspensões de <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> nas propriedades bioquímicas do solo..... | 52 |
| 4.3 Avaliação do potencial bioestimulante de <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> utilizando sementes de alface | 53 |
| 4.3.1 – Avaliação do efeito semelhante à giberelina - germinação | 54 |
| 4.3.2 - Avaliação do efeito semelhante à auxina – formação de raízes..... | 57 |
| 4.3.3 - Avaliação do efeito semelhante à citocinina - expansão da raiz do cotilédone | 59 |
| 5. Conclusão..... | 62 |
| 6. Referências bibliográficas..... | 64 |
| Anexos | 74 |
| Anexo I - Plano de fertilização..... | 74 |
| Anexo II – Variações da temperatura e quantidade de água repostas durante o ensaio de crescimento de <i>Lactuca sativa</i> (Nadine)..... | 75 |
| Anexo III - Produtos fitofarmacêuticos aplicados no decorrer do ensaio | 76 |
| Anexo IV - Resultados aos parâmetros das plantas, absorvância ótica e N (g/kg) | 77 |

V. Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 3.1 - Enquadramento geográfico do local de amostragem, São João da Ribeira (39°17'13.6"N 8°53'37.6"W), próximo do concelho de Rio Maior (Portugal)..... | 24 |
| Figura 3.2 - (A) Lagoa de drenagem onde foi recolhida a água de drenagem agrícola utilizada neste estudo (9/julho/2021), e (B) saída do sistema de drenos que recolhe a água de drenagem subterrânea. | 25 |
| Figura 3.3 - Estado das plantas nos dias em que se procedeu à leitura da absorvância ótica. 30 | |
| Figura 3.4 - Metodologia adotada para a preparação do meio de germinação. A - Colocação de nutrientes em frascos; B - Autoclavagem durante 1h a 120°C e C - Placas de Petri plaqueadas com o meio de germinação. | 31 |
| Figura 3.5 - Germinação das sementes de <i>L. sativa</i> em papel de filtro + água desionizada (A) e em meio de germinação (B), evidenciando a melhor resposta em meio de crescimento. | 31 |
| Figura 3.6 - Descrição da preparação das placas de Petri, com diferentes soluções: (i) controlo negativo, com água desionizada; (ii) controlo positivo, com o regulador de crescimento que se pretendia avaliar (IBA ou BAP); e (iii) extratos de microalgas (Martins et al., 2022). | 33 |
| Figura 3.7 - Procedimento para a determinação do potencial bioestimulante da microalga <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> (Martins et al., 2022). | 34 |
| Figura 3.8 - Exemplificação das placas de Petri com material vegetal para avaliação de: (A) efeito semelhante à auxina; (B) efeito semelhante à citocinina; e (C) efeito semelhante à giberelina..... | 35 |
| | |
| Figura 4.1 - Fim do ensaio com alface, <i>L. Sativa</i> (var. Nadine), 14 semanas de crescimento após a transplantação. | 43 |
| Figura 4.2 - Resultados aos parâmetros seguintes: (A) biomassa fresca da planta de alface (variedade Nadine); (B) N total; (C) teor total de P; e (D) teor total de K (média ± desvio padrão, n= 4). As colunas marcadas com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de <i>C. vulgaris</i> ; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de <i>S. obliquus</i> | 44 |
| Figura 4.3 - Evolução da absorvância ótica nas folhas de alface nas cinco últimas semanas de crescimento (média ± desvio padrão = 4). Os resultados medidos em 14 de junho marcados com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: controlo; | |

M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.....48

Figura 4.4 - Resultados obtidos às amostras de solo: (A) pH; (B) condutividade elétrica (CE); (C) matéria orgânica (MO); (D) N Kjeldahl; (E) P extraível; e (F) K extraível (média ± desvio padrão, n= 4). As colunas marcadas com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.....51

Figura 4.5 - Efeitos dos tratamentos na atividade da desidrogenase do solo (média ± desvio padrão, n= 4). As colunas marcadas com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.....53

Figura 4.6 - Avaliação da germinação de sementes de *L. sativa* - efeito semelhante à giberelina (média ± desvio padrão da média). Colunas marcadas com a mesma letra não apresentam resultados significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). A – suspensão de microalgas; B – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada; C – suspensão de microalgas submetida a ultrassons, e D – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons. C: controlo com água desionizada; GA0.3, GA0.7 e GA1.0: controlo positivo utilizando GA₃ em diferentes concentrações; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *S. obliquus*.....56

Figura 4.7 - Avaliação do enraizamento e indução do alongamento da raiz, após um período de 7 dias. (média ± desvio padrão da média). Colunas marcadas com a mesma letra não apresentam resultados significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). A – suspensão de microalgas; B – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada; C – suspensão de microalgas submetida a ultrassons, e D – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons. C: controlo com água desionizada; IBA0.3, IBA0.7 e IBA1.0: controlo positivo utilizando IBA em diferentes concentrações; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *S. obliquus*.....58

Figura 4.8 - Avaliação da atividade da BAP (expansão da raiz do cotilédone), após um período de 7 dias. (média ± desvio padrão da média). Colunas marcadas com a mesma letra não apresentam resultados significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). A – suspensão

de microalgas; B – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada; C – suspensão de microalgas submetida a ultrassons, e D – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons. C: controlo com água desionizada; BAP0.3, BAP0.7 e BAP1.0: controlo positivo utilizando BAP em diferentes concentrações; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *S. obliquus*.60

VI. Índice de Quadros

| | |
|---|----|
| Quadro 3.1 - Pesticidas quantificados na água de escoamento, utilizado para o crescimento de microalgas (todos os herbicidas) (média ± DP, n=3)..... | 26 |
| Quadro 3.2 - Caracterização do solo utilizado no ensaio de avaliação de microalgas como potencial fertilizante orgânico..... | 27 |
| Quadro 3.3 - Descrição do ensaio de crescimento de alface utilizando a suspensão de microalgas (<i>C. vulgaris</i> (CV) e <i>S. obliquus</i> (SO)), para substituir o N mineral de cobertura aplicação (n = 4). C: controlo sem adubação; M: adubação mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: <i>C. vulgaris</i> aplicado em doses de 0,5, 1,0 e 2,5 g N/vaso; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: <i>S. obliquus</i> aplicado em doses de 0,5, 1,0 e 2,5 g N/vaso. | 28 |
| Quadro 4.1 - Caracterização da água de drenagem agrícola, utilizada no cultivo de microalgas, (média ± DP, n=3)..... | 40 |
| Quadro 4.2 - Caracterização da água após o cultivo suspensão das culturas de microalgas (<i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i>) (valores médios ± DP, n=3). | 42 |
| Quadro 4.3 - Quantificação de macronutrientes secundários (Ca, S e Mg) a na biomassa da alface (variedade Nadine) (média ± desvio padrão, n= 4). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de <i>C. vulgaris</i> ; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de <i>S. obliquus</i> | 46 |
| Quadro 4.4 - Quantificação de micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Na, Mn e B) na biomassa da alface (variedade Nadine) (média ± desvio padrão, n= 4). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de <i>C. vulgaris</i> ; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de <i>S. obliquus</i> | 47 |
| Quadro 4.5 - Concentração de micronutrientes extraíveis (Fe, Mn, Cu, Zn e B) no solo e da capacidade de troca catiónica (CTC) (média ± desvio padrão, n= 4). C: controlo; M controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de <i>C. vulgaris</i> ; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de <i>S. obliquus</i> | 52 |
| Quadro 4.6 - Índice de germinação (média, n= 4)..... | 57 |

VII. Lista de Abreviaturas

| Sigla | Significado |
|-----------------|---|
| AEA | Agência Europeia do Ambiente |
| BAP | Benzilaminopurina |
| CBO | Carência Bioquímica de Oxigênio |
| CBPA | Código de Boas Práticas Agrícolas |
| CE | Condutividade Elétrica |
| CQO | Carência Química de Oxigênio |
| CTC | Capacidade de Troca Catiônica |
| CV | <i>Chlorella vulgaris</i> |
| EPA | Agência de Proteção Ambiental dos EUA (do Inglês <i>Environmental Protection Agency</i>) |
| FAO | Organização para a Alimentação e Agricultura (do Inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>) |
| GA ₃ | Ácido Giberélico |
| IBA | Ácido Indolbutírico |
| ICP-OES | Espetrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente (do Inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>) |
| IG | Índice de Germinação |
| INE | Instituto Nacional de Estatística |
| ISO | Organização Internacional de Normalização (do Inglês <i>International Organisation for Standardisation</i>) |
| MO | Matéria Orgânica |
| MS | Matéria Seca |
| SO | <i>Scenedesmus obliquus</i> |
| SST | Sólidos Suspensos Totais |
| ZH | Zonas Húmidas |
| ZV | Zonas Vulneráveis |

1. Introdução

1.1. Considerações iniciais

O uso de recursos naturais produz subprodutos e/ou resíduos que, frequentemente, leva à libertação de contaminantes no ambiente, prejudicando a qualidade do meio recetor natural (Chinnasamy *et al.*, 2009).

A conservação da qualidade dos recursos naturais existentes, nomeadamente das reservas de água superficiais e subterrâneas, constitui uma grande preocupação, não só em termos ambientais como, também, sociais (Alvarez *et al.*, 2021). Um dos maiores desafios ambientais é, precisamente, manter a qualidade da água para consumo humano, sendo esta um dos principais requisitos para a sobrevivência dos seres vivos. A água drenante de áreas de agricultura intensiva (água residual agrícola) é a principal fonte a comprometer a qualidade da água em lagos, rios e pântanos e contribui, também, para a contaminação dos lençóis freáticos (Marella *et al.*, 2021). A poluição gerada pelo escoamento agrícola está a afetar o nível de eutrofização em corpos de água superficial (FAO, 2021). Em 2018, os setores de atividade que mais contribuíram para a emissão de substâncias acidificantes e eutrofizantes foram o setor agrícola com 34,5% do total (34,0% em 2017), o setor industrial com 27,5% (26,9% em 2017) e o setor dos transportes com 23,1% (23,1% em 2017) (INE, 2019). É, por isso, muito importante reduzir o impacto das diferentes atividades humanas na qualidade das águas superficiais e subterrâneas, nomeadamente aquele com origem na atividade agrícola. Utilizando as microalgas é possível tratar as águas residuais agrícolas, reduzir a sua toxicidade, recuperar os seus nutrientes e reduzir o uso de fertilizantes minerais (Franchino *et al.*, 2016). Estas águas podem, assim, desempenhar um papel fundamental na economia circular (Uhlenbrook *et al.*, 2017).

As microalgas podem desempenhar um papel relevante na transformação dos resíduos e águas residuais em biomassa e água tratada, as quais podem ser, subsequentemente, reutilizadas (Abalde *et al.*, 1995). As microalgas apresentam elevadas taxas de crescimento e, por isso, a produção de biomassa por unidade de tempo é elevada (Kapoor *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2019). Apresentam, ainda, um elevado interesse numa perspetiva de economia circular, devido ao facto de poderem assimilar nutrientes a partir do meio em que ocorre o seu crescimento, que são incorporados na sua biomassa, a qual pode ser valorizada sob diferentes formas (Lukyanov *et al.*, 2021). De facto, as microalgas podem ser utilizadas para o tratamento

de águas residuais, na produção sustentável de alimentos, produção de biocombustíveis, utilização como suplementos alimentares, rações para animais, e em formulações utilizadas na aquicultura (Gouveia *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2017). Quando esta biomassa é aplicada na agricultura, facilita a disponibilização de nutrientes para a planta, mantém o carbono orgânico e a fertilidade do solo, melhora o crescimento das plantas e, conseqüentemente, aumenta o rendimento das colheitas, podendo ser designada de biofertilizante ou bioestimulante¹, dependendo do efeito que exerça sobre a cultura (Renuka *et al.*, 2018), ou, simplesmente, fertilizante orgânico.

Esta estratégia é um processo *win-win* porque, não só o tratamento de efluentes com microalgas tem menores gastos energéticos, menores emissões de gases com efeito de estufa e menores custos do que os sistemas convencionais, como, também, o facto de se utilizarem águas residuais como fonte de nutrientes permite a redução dos custos na produção da biomassa de microalgas (Navarro-Lopez *et al.*, 2020).

As águas residuais agrícolas podem conter níveis mais elevados de matéria orgânica e de nutrientes, como azoto (N), fósforo (P), potássio (K), relativamente às águas residuais municipais (Wang *et al.*, 2018). Os nutrientes, caso estejam presentes no meio natural em excesso, são considerados poluentes, porque podem estimular a eutrofização das águas superficiais e poluir as águas subterrâneas (Vymazal & Brezinova, 2018). Os nutrientes são essenciais ao cultivo das microalgas (Abdelaziz *et al.*, 2013), sendo, a aquisição de nutrientes para o seu cultivo, a parcela que apresenta maiores custos de produção. Por isso, ao aproveitar os nutrientes existentes nas águas de escorrência agrícola para a produção de microalgas conseguimos fazer baixar esses custos (Andrade & Andrade, 2018).

Remover os nutrientes das águas de escorrência possibilita o seu reaproveitamento e, caso seja interessante, a utilização da própria água após o tratamento, contribuindo para a sua circularidade. Em certos casos, a biomassa das microalgas funciona como um bioestimulante que, quando aplicado em pequenas quantidades, facilita os processos fisiológicos da planta, resultando numa melhor nutrição, tolerância ao *stress*, rendimento ou qualidade, sem causar danos e, melhor ainda, podendo contribuir para uma melhoria das propriedades do solo (Kapoores *et al.*, 2021). Os bioestimulantes não fornecem diretamente nutrientes às culturas. Em vez disso, facilitam a absorção de nutrientes ao modificar a rizosfera (intensificando as interações planta-microrganismos) e o metabolismo da planta, originando um aumento da

¹ No presente trabalho, utilizou-se o termo comum bioestimulante e biofertilizante. Contudo, de acordo com o Regulamento (UE) 2019/1009 Do Parlamento Europeu E Do Conselho de 5 de junho de 2019, a designação correta para se referir estes tipos de fertilizantes são: bioestimulante microbiano ou não microbiano.

eficiência no uso dos nutrientes, da tolerância ao *stress* abiótico e da melhoria da qualidade da cultura (Drobek *et al.*, 2019).

Deste modo, é promovida a circularidade, tanto dos nutrientes como da água, fechando o ciclo dos nutrientes, reduzindo as emissões indesejáveis para o ambiente e o risco de poluição das águas, diminuindo a pegada hídrica da agricultura intensiva e, ainda, diminuindo a ecotoxicidade das águas de escorrência. A biomassa produzida pelas microalgas é apontada por alguns autores como uma alternativa eficiente aos fertilizantes minerais (Abdelaziz *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019), podendo a recuperação do N, P e K, através da produção da biomassa de microalgas, suprir as necessidades destes nutrientes na agricultura até 13,4% da sua procura (Fernández-Arévalo *et al.*, 2017). O uso destes fertilizantes orgânicos é essencial para a transição para um sistema de produção agrícola mais sustentável e eficiente em termos de recursos. No entanto, são necessárias mais pesquisas para determinar quais as microalgas mais adequadas para o tipo de água de drenagem a tratar, qual a suplementação em nutrientes que é necessária e qual o real benefício para as plantas da aplicação ao solo da biomassa obtida pelo crescimento das microalgas (Coppens *et al.*, 2016).

1.2. Objetivos

Tendo em consideração o exposto, é objetivo deste trabalho avaliar uma solução para a diminuição da carga poluente das águas drenantes de áreas agrícolas, através do seu aproveitamento para o crescimento de microalgas a serem utilizadas como fertilizante orgânico ou bioestimulante. São objetivos específicos:

1 – Avaliar as características físico-químicas das águas drenantes de uma zona agrícola de cultura intensiva de milho, nomeadamente as concentrações de nutrientes e de pesticidas.

2 – Avaliar o potencial fertilizante e bioestimulante da suspensão de microalgas produzidas, utilizando as águas drenantes consideradas.

1.3. Estrutura da dissertação

O presente estudo centra-se em avaliar o valor fertilizante e bioestimulante da biomassa de microalgas obtidas no tratamento de águas de escorrência agrícola, sendo a dissertação subdividida nos seguintes capítulos:

Capítulo 1. Introdução: enquadramento do tema, com a descrição dos objetivos deste trabalho.

Capítulo 2. Revisão bibliográfica.

Capítulo 3. Material e métodos: breve caracterização do local das amostragens, descrição das metodologias utilizadas na caracterização das amostras e descrição dos ensaios efetuados na avaliação do potencial fertilizante ou bioestimulante.

Capítulo 4. Resultados e discussão: apresentação e discussão dos resultados obtidos nos ensaios realizados.

Capítulo 5. Conclusão: considerações finais acerca deste estudo, destacando as principais conclusões e desenvolvimentos futuros.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Poluição difusa das águas com químicos de origem agrícola

De acordo com a Agência Europeia do Ambiente (AEA, 2011), a poluição difusa, não possui um ponto de descarga conhecido (origem não pontual). Define-se como o transporte de poluentes para cursos de águas superficiais ou subterrâneos, como compostos azotados (em especial nitratos) ou fosfatados, conseguindo alterar a qualidade da água, tornando-a imprópria para a maioria dos usos.

Segundo Novotny (2005), a poluição difusa está sobretudo relacionada com o “mau” uso da terra, sendo a atividade agrícola uma das causas, nomeadamente através da: fertilização, aplicação de fitofármacos, aplicação de estrumes, chorumes e lamas de depuração, escorrências de silagens, e rega de campos agrícolas com água de má qualidade.

Foi na Conferência da Associação Internacional da Água em Teolo (Itália, 1997), com o apoio de muitos trabalhos científicos, que se estabeleceu esta ligação, entre o setor agrícola e a poluição dos meios hídricos. O problema da poluição difusa foi, primeiramente, observado em lagos e, mais tarde, identificado em quase todos os corpos de água. Os problemas derivavam, direta e indiretamente, da eutrofização da água, provocando morte generalizada de peixes, devido à falta de oxigénio disponível e de inesperadas mudanças na base da cadeia alimentar (Novotny, 2005).

Os químicos de origem agrícola constituem uma fonte de poluição difusa, uma vez que são originados maioritariamente em grandes áreas, e o ponto exato da sua entrada na rede hidrográfica não pode ser identificado com precisão (Zuazo *et al.*, 2009). Por esse motivo, a agricultura é uma das principais fontes de poluição difusa e de impactes negativos na qualidade da água em rios e lagos, a segunda maior fonte de poluição em zonas húmidas, e é um dos principais contribuintes para a poluição de estuários e de águas subterrâneas EPA (2005). Os impactes negativos provocados pelos químicos de origem agrícola podem observar-se na poluição da água, do solo e do ar, com a destruição de habitats e a diminuição da biodiversidade.

A aplicação de fertilizantes que excedem as necessidades das plantas, sejam minerais ou orgânicos (*e.g.*, estrumes, chorumes, composto e lamas de depuração), principalmente antes da ocorrência de eventos de precipitação, promove a lixiviação/escoamento desses nutrientes

e, assim, acabam por chegar aos diversos recursos hídricos, causando proliferação de algas e a diminuição do oxigénio, o que é letal para a maioria dos seres aquáticos.

Os métodos de rega adotados pelos agricultores podem potenciar este fenómeno de poluição difusa. Segundo, o novo Código de Boas Práticas Agrícolas (CBPA), o impacto erosivo da precipitação e/ou da rega é o principal responsável por perdas de nitratos e fósforo presentes nas camadas superficiais do solo, através de escoamento superficial, ou para as camadas mais profundas do solo, de onde as raízes das plantas não conseguem absorver nutrientes. A rega por si só, quando a temperatura é favorável, promove boas condições de humidade no solo, estimulando o processo de mineralização da matéria orgânica, originando, assim, concentrações de nitratos e de fósforo inorgânico no solo mais ou menos elevadas. Estes nutrientes, por percolação e arrastamento, podem atingir as águas superficiais e subterrâneas. De notar que, em muitos casos, quando as práticas culturais são adequadas, consegue-se manter uma boa eficiência na rega, e o risco de arrastamento de nutrientes até poderá ser maior na agricultura de sequeiro do que na agricultura de regadio (Zuazo *et al.*, 2009).

2.1.1. Nutrientes

Nutrientes, como o N, P, K, cálcio (Ca), enxofre (S), cobre (Cu), zinco (Zn), entre outros, são essenciais para o crescimento das plantas, produção de alimentos e, em última análise, para a nutrição adequada dos seres humanos. Os principais nutrientes aplicados na agricultura como fertilizantes são o N, o P e o K. A utilização destes nutrientes em excesso, como já foi referido, pode causar a eutrofização das águas superficiais, a contaminação das águas subterrâneas, para além de conduzir a consequências nefastas nos solos e na atmosfera (Solovchenko & Verschoor, 2016; Cameira & Mota, 2017). As consequências da eutrofização podem ser: o aparecimento de condições de toxicidade para organismos aquáticos e bentónicos; a redução da biodiversidade e substituição por espécies dominantes que, em alguns casos, podem ser algas prejudiciais aos organismos já existentes; o aumento da turbidez; a diminuição do oxigénio dissolvido e, naturalmente, uma diminuição da vida de espécies piscícolas e, simultaneamente, impactes na paisagem (Zuazo *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2013; Debajyoti *et al.*, 2022). Caso a água seja, de algum modo, utilizada para consumo humano, esta diminuição da sua qualidade leva ao aumento dos custos associados ao seu tratamento.

O N (nutriente crítico e necessário no crescimento das plantas), utilizado pelo setor agrícola, é um dos principais poluidores ambientais. O nitrato (NO_3^-) é emitido para o

compartimento ambiental hídrico, e a emissão de amoníaco (NH₃) e óxido nitroso (N₂O) para a atmosfera (Cameira e Mota, 2017). O NH₃ causa acidificação e eutrofização do ecossistema, devido à sua contribuição para as chuvas ácidas e o N₂O é um potente gás de efeito de estufa. No entanto, é a utilização desse nutriente e de outros, como o P, que faz com que, atualmente, haja mais alimentos *per capita* do que há cinquenta anos, promovendo a produção de alimentos em países que sofriam escassez de alimentos (Novotny, 2005).

O N na forma de nitrato é muito solúvel na água e, pelo facto de se apresentar na forma aniónica, não é retido por adsorção no complexo de troca do solo. Por esse motivo, é facilmente arrastado pelas águas das chuvas ou das regas. Por outro lado, o P não é tão facilmente lixiviado, na medida em que forma compostos menos solúveis, sofrendo acumulação no solo. De facto, o ciclo do P, interage sobretudo com os ecossistemas terrestres e aquáticos. A remoção de P do solo é feita através da absorção pela planta, que é, posteriormente, colhida. Contudo, o solo não tem uma taxa de acumulação e de assimilação ilimitadas (Novotny, 2005). Quando atinge o limite, o transporte deste nutriente para os ecossistemas aquáticos aumenta (Novotny, 2005).

Salomons & Stol (1995), têm investigado o potencial esgotamento da acumulação de P nos solos. Estima-se que este nutriente, tenha uma taxa de acumulação a nível mundial de 3,1 kg/ha.ano e nas áreas de agricultura intensiva seja de 18 kg/ha.ano.

Embora o excesso de nutrientes nas águas de escorrência agrícola possa ser um problema, pode ser vantajoso utilizar essas águas como fontes de nutrientes e água de baixo custo para o crescimento de microalgas. Desde modo, através de tecnologias inovadoras é possível aumentar a produção e a eficiência agrícola e diminuir a perdas de nutrientes (Zainith *et al.*, 2021).

2.1.2 Pesticidas

“Pesticidas” é um termo vasto, utilizado para designar produtos químicos que têm como objetivo impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer tipo de pragas associadas à agricultura, reduzindo as perdas na produção (Hallmann & Rampelotto, 2019). Podem ter uma natureza química variada (*e.g.*, , organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides) e classificam-se de acordo com o organismo alvo em: inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, etc. (Jayaraj *et al.*, 2016).

Um pesticida é constituído por uma substância ativa (produto orgânico, inorgânico, natural, sintético ou biológico), que é misturada com outras substâncias que ajudam à sua aplicação, constituindo-se assim a sua formulação comercial. Os pesticidas são desenvolvidos de forma a potenciar a sua toxicidade relativamente ao organismo alvo, afetando as suas atividades fisiológicas (Jayaraj *et al.*, 2016). Porém, estas substâncias químicas podem atingir as águas por meio de aplicação direta e excessiva em culturas, escoamento superficial agrícola, transporte pelo vento, volatilização, lixiviação e deposição atmosférica, alterando o equilíbrio do ecossistema, promovendo a bioacumulação, com efeitos nefastos na biodiversidade do compartimento ambiental atingido (Sabzevari *et al.*, 2022). A bioacumulação, é um processo que ocorre quando um dado composto químico é absorvido e armazenado nos tecidos e órgãos específicos dos indivíduos que ocupam níveis tróficos mais baixos nas cadeias alimentares.

Pimentel (1995), alega que uma parte muito pequena dos pesticidas aplicados às culturas é que, efetivamente, atingem o organismo alvo. Por consequência, a restante parte contamina os compartimentos ambientais circundantes (solo, água e atmosfera). Através do desenvolvimento de vários estudos científicos, observou-se que os pesticidas geralmente se encontravam nas massas de água superficiais em concentrações que excedem os limites que possibilitam uma boa qualidade ecológica (Liess *et al.*, 2021). Devido ao risco que os pesticidas apresentam, é necessário propor listas prioritárias de pesticidas, para uso na agricultura em todo o mundo, sendo cada vez mais importante e urgente usá-las de forma consciente.

De facto, o uso de pesticidas tem desempenhado um papel fundamental na redução da propagação de doenças e na produção de alimentos, estimando-se que os problemas fitossanitários conduzam à perda de um terço da produção agrícola mundial por ano, mesmo com um consumo de mais de dois milhões de toneladas de pesticidas (Jayaraj *et al.*, 2016).

2.1.3 Legislação de proteção da qualidade das águas

O Decreto-Lei n.º 235/97, de 3 de setembro, transpôs para a legislação portuguesa a Diretiva 91/676/CEE, de 1991, referente à proteção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola. Mais tarde este Decreto, foi alterado e republicado pelo Decreto-Lei n.º 68/99, de 11 de março.

De acordo com esta legislação, é exigido que todos os países membros da União Europeia definam zonas vulneráveis (ZV). Isto é, devem identificar as águas superficiais que já estão excessivamente poluídas com nitratos, ou que estão em risco de serem poluídas no futuro, a fim de proteger os recursos hídricos. Esta Diretiva determinou que todos os

estados-membros elaborassem o primeiro CBPA, publicado em 1997, devendo este ser aplicado voluntariamente pelos agricultores.

Mais tarde, foi instituído pela Portaria n.º 259/2012, de 28 de agosto, um único programa de ação para as ZV. Foram anteriormente identificadas 9 ZV em Portugal Continental pela Portaria n.º 164/2010: Esposende/Vila do Conde, Estarreja/Murtosa, Litoral Centro, Tejo, Beja, Elvas, Estremoz/Cano, Faro e Luz/Tavira. As medidas enumeradas nessa Portaria, juntamente com o CBPA, são obrigatórias, adaptadas em função das culturas e condições edafoclimáticas.

De forma a responder às necessidades acrescidas que foram sendo identificadas, em fevereiro de 2018 procedeu-se à emissão do Despacho n.º 1230/2018, que fez alterações ao CBPA para a proteção dos recursos hídricos. Atualmente o CBPA, tenta expor boas práticas agrícolas que visam a redução das perdas de azoto e de fósforo do solo. Descrevendo orientações e diretrizes que auxiliem os agricultores sobre a aplicação de adubos contendo azoto e fósforo, corretivos orgânicos, estrumes e chorumes e lamas de depuração. Assim como, qual a melhor época e técnicas de aplicação, sem apresentar riscos elevados de contaminação ambiental. Dispõe de informações para o correto armazenamento e manuseamento de adubos inorgânicos e efluentes pecuários e aplicação de fertilizantes em situações especiais (por exemplo, terrenos declivosos, adjacentes a cursos de água e próximos de captações de água). Regulamenta ainda a gestão e utilização do solo e da rega, e a elaboração de planos de fertilização, para uma determinada exploração agrícola.

No entanto, não é só a atividade agrícola que tem de cumprir a legislação para alcançar o bom estado de todas as águas, as estações de tratamento de águas residuais urbanas, localizadas em zonas vulneráveis, também estão sujeitas a um rigoroso controlo das suas descargas para o meio, em termos de N e P total, através do Decreto-Lei n.º 348/98, de 9 de novembro.

Um bom estado químico das águas superficiais e subterrâneas, é alcançado por uma massa de água que preencha as condições definidas no anexo V da Diretiva-Quadro da Água (DQA), publicada na EU em 2000 (Diretiva 2000/60/CE). As substâncias perigosas de acordo com a DQA, são: “substâncias ou grupos de substâncias tóxicas, persistentes e suscetíveis de bioacumulação, e ainda outras substâncias que suscitem preocupações da mesma ordem“. Para além da preocupação com estas substâncias, existe ainda o controlo de substâncias prioritárias que podem causar graves consequências nas massas de águas e é imperativo tomar medidas. A lista de substâncias prioritárias, engloba metais pesados (*e.g.*, cádmio (Cd), mercúrio (Hg),

chumbo (Pb) e níquel (Ni)), e diversos pesticidas (*e.g.*, alacloro, atrazina, clorfenvinfos, clorpirifos, diurão, endossulfão, isoproturão, lindano, simazina e trifluralina) (CE 2001).

A prioridade das substâncias é atribuída com base no risco que representam para o meio aquático, tendo em consideração o nível de ecotoxicidade aquática e toxicidade humana.

As medidas preventivas também permitem reduzir o impacto na qualidade das águas, são exemplos, o controlo da qualidade das águas através das redes de monitorização, adoção de técnicas agrícolas menos prejudiciais, preparação de mapas de vulnerabilidade e definição das ZV à poluição das águas.

2.2. Tratamento de águas de drenagem agrícolas

As águas residuais agrícolas são, principalmente, produzidas pelo setor pecuário. Nas últimas décadas, observou-se um decréscimo das explorações pecuárias de pequenas dimensões, tendo aumentado o número de exploração de grandes dimensões, que se concentraram geograficamente, resultando isso no risco de descarga de elevadas concentrações de nutrientes numa só área (Kellogg *et al.*, 2021). Os efluentes pecuários, tipicamente com uma razão N:P entre 2 e 8, são, muitas vezes, aplicados como fertilizantes. Contudo, as culturas apresentam exigências de nutrientes com um rácio N:P e disponibilidade diferentes das existentes nos efluentes pecuários. Logo, os nutrientes não são completamente assimilados, podendo acumular-se nos solos e, conseqüentemente, sofrer escoamento superficial e provocar eutrofização das águas recetoras (Cai *et al.*, 2013).

Contudo, não é só o setor pecuário o responsável pelo excesso de nutrientes em diversos recursos hídricos, o escoamento da irrigação agrícola e a produção agroindustrial por exemplo laticínios, processamento de batata, viveiro de plantas, processamento de açúcar e águas residuais da aquicultura, também causam esse problema. Além de nutrientes, essas águas apresentam elevadas concentrações de matéria orgânica em relação aos efluentes municipais (Healy & Flynn, 2011), causando poluição difusa.

O método mais direto para evitar a poluição pelo escoamento de águas de drenagem agrícola seria a minimização dessa drenagem. Isso pode ser conseguido através da manutenção da inclinação do terreno e pela sua cobertura com vegetação, o que promove uma maior infiltração na matriz do solo e, também, uma redução da erosão do solo. Exemplo realizar lavouras de contorno e construir tanques agrícolas para receber o escoamento. A construção de

tanques, pode apresentar a vantagem de armazenamento de água para posterior uso na irrigação (Zuazo *et al.*, 2009).

É importante o tratamento de águas drenantes de zonas agrícolas, de forma a não causar graves consequências para a biodiversidade, reduzindo a poluição difusa que não é uniforme nem previsível, pois está associada às práticas agrícolas e às condições climáticas (Wang *et al.*, 2018). Algumas soluções apontadas na literatura passam pelo tratamento de águas de drenagem agrícola em zonas húmidas artificiais e em valas de drenagem com vegetação, sendo que ambos os tratamentos potenciam a remoção dos nutrientes do efluente, permitindo o seu tratamento e descarga com menor carga poluente.

2.2.1 Zonas húmidas artificiais

Uma zona húmida (ZH) é uma zona de transição, entre o meio terrestre e o aquático, na qual o solo está saturado na maior parte do ano, e onde existem plantas características de ZH designadas por macrófitas (*e.g.*, *Typha*, *Phragmites*, *Eichhornia*, *Azolla*, *Lemna*) (Rai, 2008). As ZH podem constituir uma importante ferramenta para o tratamento das águas, proporcionando um meio para os microrganismos degradarem os contaminantes orgânicos, como compostos orgânicos voláteis, contribuindo para a absorção de metais pelas plantas, ou para a sua adsorção na rizosfera (Rai, 2008). Por esse motivo, podem ser utilizadas zonas húmidas artificiais (ZHA), construídas de modo a potenciar o tratamento de efluentes, contribuindo para a diminuição do risco de emissão para o meio aquático de diferentes tipos de contaminantes, como nutrientes, pesticidas, metais, e diferentes famílias de contaminantes orgânicos (Zuazo *et al.*, 2009; Gilliam, 1994). Os dois principais mecanismos que permitem a diminuição da concentração de nutrientes nas ZHA são a absorção pelas plantas e a desnitrificação. Este processo é mediado por bactérias anaeróbias facultativas, o nitrato é reduzido e, em última análise, produz N molecular (N₂), através de uma série de produtos gasosos intermediários de óxido de N. Contudo, devido à perda de N₂ este não é um processo eficiente, e não é desejável.

Por outro lado, no sedimento, com características redutoras, são removidos, especialmente, metais, através de processos que envolvem: 1) ligação a material particulado, como solo e sedimentos; 2) precipitação; 3) absorção por algas, macrófitas e bactérias; e 4) remoção da biomassa (Rai, 2008).

As ZHA apresentam a vantagem de serem uma tecnologia de baixo custo e baixa manutenção, que permitem tratar diferentes tipos de efluentes (Rai, 2008), podendo, com facilidade, serem consideradas para o tratamento de águas de drenagem agrícola. Contudo, a vegetação pode levar longos períodos a estabelecer-se completamente e, quando a vegetação não está na fase de crescimento, a remoção de nutrientes não é tão eficiente quanto o desejado. Segundo alguns autores, apenas são eficazes para o tratamento de pequenas quantidades de escoamento, porque um escoamento elevado rapidamente esgotaria a capacidade do sistema de retirar nutrientes (Zuazo *et al.*, 2009). Existem, ainda, problemas relacionados com a biomassa das macrófitas, após o término do seu “ciclo de vida”, pois pode conter poluentes que precisam de ser “destruídos”, o que pode ser feito utilizando a biomassa das macrófitas para a produção de biogás (Rai, 2008).

Para além da remoção de nutrientes, as ZHS atuam como zona tampão para os herbicidas, tendo contribuído para uma redução de 98% nas concentrações de metolaclo e de terbutilazina, dois dos principais herbicidas aplicados ao milho, nas suas águas de drenagem (Pappalardo *et al.*, 2015). Estas zonas, de acordo com Stehle *et al.* (2011), têm uma capacidade de mitigação de 70% dos pesticidas escoados, e, de acordo com Maillard *et al.*, (2011), essa taxa pode variar entre 39-100%.

2.2.2 Valas de drenagem com vegetação

As valas de drenagem com vegetação são mais recentes, relativamente às ZHA, mas constituem, igualmente, uma técnica eficaz para o tratamento de águas drenantes de zonas agrícolas, permitindo a eliminação de nutrientes e sólidos suspensos e, conseqüentemente, contribuindo para a diminuição da poluição difusa de origem agrícola (Moore *et al.*, 2010; Vymazal & Brezinova, 2018). A sua grande eficácia é devida às múltiplas interfaces entre a água, os sedimentos e a vegetação aquática, o que permite a atenuação da poluição difusa (Moore *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016; Moeder *et al.*, 2017). Contudo, se não for uma técnica bem gerida, pode provocar eutrofização das águas, pelo facto de representar uma ligação direta entre campos agrícolas e cursos de água naturais.

Diversos estudos científicos, demonstraram que as plantas macrófitas utilizadas nas valas de drenagem permitem que haja uma área de superfície capaz de reduzir a velocidade do escoamento, filtrar os sólidos suspensos e promover a absorção de nutrientes. Para além disso,

microalgas bentônicas e algas epífitas que possam desenvolver-se naquele meio são identicamente eficientes na remoção de nutrientes (O'Brien *et al.*, 2014).

Um estudo de dois anos a uma vala de drenagem, realizado por Vymazal & Brezinova (2018), com *Phragmites australis*, *Glyceria maxima* e *Typha latifolia*, mostrou uma elevada remoção de nutrientes, orgânicos e sólidos em suspensão de água de drenagem agrícola. Os resultados deste estudo revelaram que a vala de drenagem com vegetação natural, tem uma eficiência de tratamento equivalente ao tratamento com áreas húmidas construídas em termos de nutrientes, sólidos suspensos e substâncias orgânicas.

2.2.3. Tratamento com microalgas

O crescimento da população global coincidiu com a intensificação da agricultura, desenvolvimento industrial e urbanização, levando a um aumento acentuado na produção de resíduos e poluição ambiental. Isto levou à necessidade de aplicar planos de tratamento adequados para a redução e remoção dos poluentes (Geremia *et al.*, 2021).

As tecnologias de tratamento biológico têm sido utilizadas na recuperação de águas residuais, visto que têm a capacidade de remoção de nutrientes e metais tóxicos a limites aceitáveis, que permitam a sua reutilização ou descarga (Cicek, 2003; Cai *et al.*, 2013). De entre os vários tratamentos biológicos, as microalgas têm revelado uma considerável eficiência no tratamento de diferentes tipos de águas residuais, sendo viável a sua utilização posterior, nomeadamente como biocombustível. Em comparação com outras matérias-primas para biocombustíveis, as microalgas apresentam as seguintes vantagens (Cai *et al.*, 2013):

- As microalgas não competem com as culturas por terra arável e água doce, porque podem ser cultivadas em água salobra, utilizando terras não cultiváveis;
- Estas podem crescer rapidamente e ter alto teor de lípidos de 20-50% com base no peso seco, além disso, têm a capacidade para fixar o dióxido de carbono, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa e melhorando a qualidade do ar;
- Podem utilizar nutrientes da maioria das águas residuais, proporcionando um método alternativo para o tratamento de águas residuais;
- Subprodutos do cultivo de microalgas após a extração de lípidos, nomeadamente resíduos de biomassa de algas, podem ser utilizados como fonte de azoto, como ração animal rica em proteínas ou fertilizante para as culturas.

O cultivo de microalgas para produção de biocombustível tem sido realizado à escala laboratorial e comercial, fazendo uma seleção das espécies para o desenvolvimento de sistemas de cultivo eficientes. Um sistema de produção de biocombustíveis de algas depende do projeto de vários subsistemas, incluindo o cultivo de microalgas, a sua colheita a partir do meio de crescimento, e a extração dos lípidos. A colheita da biomassa das microalgas emprega métodos como filtração, sedimentação, centrifugação ou floculação. As algas multicelulares podem ser colhidas mais facilmente, manualmente ou mecanicamente, o que pode sugerir que estas são melhores candidatas para a remoção dos nutrientes de ambientes aquáticos. No entanto, as microalgas costumam ter maior produtividade lipídica por área de cultivo (Cai *et al.*, 2013).

No campo ambiental, o acoplamento do crescimento de microalgas ao tratamento de efluentes parece ser uma solução promissora para superar os altos custos atuais do cultivo de microalgas e, ao mesmo tempo, resolver problemas específicos de tratamento, como o cumprimento dos padrões nacionais de concentração de nutrientes em efluentes. A este respeito, os resíduos agrícolas parecem ser bons candidatos e, entre outros, o digestado obtido através do processo de digestão anaeróbia é particularmente promissor para a produção de microalgas, pelo seu alto teor de nutrientes mineralizados (Li *et al.*, 2019).

2.3. Microalgas

2.3.1. O que são?

As algas, geralmente, dividem-se em dois grandes grupos, as macro e as microalgas, e estima-se que sejam responsáveis por 75% da produção mundial de oxigénio (Richmond, 2004).

As macroalgas, também conhecidas como algas marinhas, são algas multicelulares que crescem em água salgada ou doce. Possuem elevadas taxas de crescimento e podem atingir os 60 metros (m) de comprimento. Atualmente, são classificadas em quatro grupos que, em certa medida, leva em consideração a sua pigmentação: diatomáceas (*Bacillariophyceae*), algas verdes (eucarióticas, *Chlorophyceae*), algas douradas (*Chrysophyceae*) e algas verde-azuladas (cianobactérias, *Cyanophyceae*) (Anastopoulos & Kyzas, 2015).

As microalgas são geneticamente diversificadas (mais de 200 000 espécies), não sendo apenas um termo filogenético, mas sim funcional, que inclui, por exemplo, procariontes e eucariontes. Podem ser encontradas em ambientes marinhos e de água doce, em comparação

com as macroalgas as dimensões são bastante inferiores, podendo atingir dimensões de 400 micrómetro (μm). Com base na sua biomassa, as microalgas constituem o maior grupo de produtores primários, sendo responsáveis por, aproximadamente, 32% da fotossíntese a nível global (Zainith *et al.*, 2021), podendo fornecer inúmeros produtos e serviços (Hallmann & Rampelotto, 2019). São capazes de assimilar nutrientes frequentemente encontrados em efluentes, o que significa que as microalgas podem ser uma opção promissora para o seu tratamento.

Comparativamente com as culturas tradicionais, as microalgas possuem diversas vantagens, nomeadamente: (i) não precisam de pesticidas ou de herbicidas; (ii) são ricas numa variedade de compostos bioativos; (iii) não exigem disponibilidade de terra arável, podendo ser cultivadas em áreas menores do que as culturas tradicionais (i.e., utilizando fotobiorreatores em lagoa aberta, em placa, em tubos transparentes); (iv) o desenvolvimento não é restringido pela época do ano, podendo até sobreviver em condições adversas; e (v) têm a capacidade de absorver o excesso nutrientes das águas residuais utilizando estes nutrientes essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento (Bhatnagar *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2022).

2.3.2 Utilização de microalgas

O rápido crescimento demográfico, combinado com a escassez de terras aráveis, escassez hídrica e diminuição da biodiversidade, originaram a necessidade de procurar opções alternativas à produção agrícola. Existem milhares de espécies de microalgas (mais de 200 000) que, atualmente, estão poucos explorados e que podem ter uma vasta utilização (Hallmann & Rampelotto, 2019). Podem ser utilizadas na alimentação humana, pois são uma fonte alternativa de macro (proteínas e hidratos de carbono) e micronutrientes (carotenoides, ácidos fenólicos, vitaminas e minerais) (Wong *et al.*, 2022). No entanto, ainda são poucas as espécies de microalgas aprovadas, pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), para o uso na alimentação humana. Algumas delas são a *Chlorella vulgaris*, a *Spirulina*, a *Tetraselmis chuii*. A utilização das microalgas na alimentação tem a vantagem de estas apresentarem uma maior produtividade (maior rendimento por unidade de área), melhor sistema de proteção contra ambientes agressivos e *stress* oxidativo e, quando comparadas com as culturas tradicionais ricas em proteínas (*e.g.*, soja e nozes), apresentam um valor nutricional semelhante (Bleakley *et al.*, 2017).

Considerando a composição da biomassa das microalgas, rica em proteínas (geralmente 50 a 70% da sua composição), lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, sais minerais e ácidos gordos, a prática mais comum é a utilização da biomassa das microalgas para a produção de rações para alimentação animal (ex. gatos, cães, peixes, pássaros, cavalos, gado bovino) (Chew *et al.*, 2017; Zhuang *et al.*, 2022).

Por outro lado, os hidratos de carbono presentes na biomassa de microalgas podem ser utilizados como fonte de substituição de açúcares simples e biomassa lignocelulósica tratada nas indústrias de fermentação (Chew *et al.*, 2017).

As microalgas são, também, bastante ricas em lípidos, moléculas que podem representar, aproximadamente, 30 a 50% do seu peso total. Por esse motivo, as microalgas podem ser utilizadas como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel (Chew *et al.*, 2017), ou como fonte de bio-hidrogénio via digestão anaeróbica, biogás, bioetanol e biometanol (Ali *et al.*, 2021). De acordo com Aron *et al.* (2020), as microalgas são consideradas a terceira e a quarta (quando geneticamente modificadas) gerações de biocombustíveis, como fontes de energia mais sustentáveis. No entanto, estes ainda não são economicamente competitivos, em comparação com os biocombustíveis de primeira e segunda geração.

As microalgas são consideradas potenciais substitutos de matérias-primas nas indústrias farmacêutica e cosmética. De facto, existem diversos ingredientes bioativos com qualidades terapêuticas que podem ser sintetizados pelas microalgas (*e.g.*, antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos e antimicrobianos), os quais podem ser utilizados com benefício direto para a saúde humana (Guidetti *et al.*, 2016).

Embora as microalgas possam ser utilizadas em todas estas aplicações, atualmente, apenas algumas estão aplicadas à escala comercial. Isso deve-se aos altos custos associados à produção de biomassa, o que é um fator limitante à comercialização de produtos de alto valor. Porém, mais recentemente, a utilização de microalgas tem vindo a emergir em áreas como o tratamento de efluentes, o que permitirá a sua produção de forma mais económica, reciclando águas e nutrientes de outras atividades, e permitindo o aumento da sustentabilidade na sua produção.

2.3.3 Utilização de microalgas para tratamento de efluentes

No tratamento de efluentes, o objetivo principal é a remoção/diminuição da concentração da sua carga orgânica, normalmente expressa através da carência bioquímica de oxigênio (CBO)², ou do ter em sólidos suspensos totais (SST)³, mas também a redução das concentrações de bactérias coliformes e de nutrientes, como N e P.

O tratamento de efluentes utilizando microalgas remonta à década de 50, tendo o engenheiro William Joseph projetado este tipo de tratamento como uma alternativa às tradicionais lagoas de estabilização. As vantagens da aplicação de microalgas para o tratamento de efluentes são, principalmente, três: remoção de nutrientes, desinfecção e remoção de metais pesados (Geremia *et al.*, 2021).

As microalgas têm a capacidade de se desenvolverem em diferentes ambientes e substratos, como águas residuais. Ao crescerem nestes ambientes, são capazes de assimilar nutrientes essenciais ao crescimento e diminuir a carência química de oxigênio (CQO)⁴ do efluente. A remoção de nutrientes dos efluentes durante a fase de crescimento, pode reduzir até 20% os custos do tratamento (Geremia *et al.*, 2021). Para além de assimilarem nutrientes, são igualmente capazes de remover produtos farmacêuticos, metais pesados, microrganismos patogênicos e realizarem a captação de CO₂. Reduz-se, assim, o risco de eutrofização, facilita o cumprimento dos valores limite para as descargas no meio natural (Decreto-Lei 236/98) e, ainda, existe a possibilidade de valorização tanto da água tratada como da biomassa de microalga produzida (Ali *et al.*, 2021).

De acordo com estudos de Encarnação *et al.* (2020), mais de 200 substâncias com origem em produtos farmacêuticos, são libertadas no ambiente. Essas substâncias abrangem os anti-inflamatórios não esteroides, antibióticos, β -bloqueadores, antidepressivos e antiepiléticos. Nesses estudos, constatou-se que as microalgas conseguem remover eficazmente esses compostos dos efluentes.

A presença de metais pesados, pode influenciar o crescimento de microalgas, se estiverem presentes em quantidades elevadas, comprometendo o seu crescimento, a eficiência

² Carência Bioquímica de Oxigênio - quimicamente é a quantidade de oxigênio dissolvido que é consumido durante a oxidação biológica aeróbia da matéria orgânica e/ou inorgânica, contida na amostra, após incubação a 20°C, em ambiente escuro. Usualmente, é estabelecido um período de incubação de 5 dias, medindo-se a CBO₅.

³ SST - Os sólidos suspensos totais são partículas que pelas suas dimensões são removíveis por filtração através de uma membrana 0,45 μ m.

⁴ Carência Química de Oxigênio – quimicamente é quantidade de oxigênio molecular, equivalente à quantidade de dicromato de potássio que é consumido na oxidação da matéria orgânica e/ou inorgânica, dissolvida e em suspensão. Este parâmetro avalia a qualidade das águas e a quantidade de carga química presente.

de assimilação de nutrientes, e, para além disso, a valorização da sua biomassa fica comprometida, (Ahluwalia & Goyal, 2007). Por sua vez, se as concentrações de metais pesados não forem muito elevadas, o processo de remoção é eficaz, devido à elevada área superficial e elevada afinidade.

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos ou fechados. Um sistema aberto refere-se, geralmente, a um tanque aberto amplamente exposto ao meio ambiente, podendo apresentar diferentes configurações (*e.g.*, , *raceway* e lagoas abertas circulares). Os sistemas fechados, ou fotobiorreatores, podem ser classificados em vários tipos: tubular, coluna, placa plana, membrana e o sistema de cultivo acoplado mais recentemente proposto. Existem vantagens e desvantagens associadas a cada um desses sistemas de cultura, embora os sistemas fechados tenham demonstrado fácil otimização, alta transferência de massa, alta produtividade e menos contaminação, em condições mais controladas, possuem um custo superior e uma configuração mais complicada (Moreno-Garcia *et al.*, 2017).

Na utilização de microalgas para tratamento de águas residuais, existe, na verdade, um consórcio de microalgas e bactérias. Verifica-se que a composição do consórcio determina a produção de oxigénio, o consumo de dióxido de carbono e a fixação de azoto e fósforo. Assim, as microalgas geram oxigénio durante a fase de crescimento e produzem ácidos gordos e hidratos de carbono. Por seu lado, as bactérias consomem oxigénio e oxidam a matéria orgânica em matéria inorgânica, libertando compostos inorgânicos para serem assimilados pelas microalgas. Quando a biomassa atinge uma taxa de crescimento ideal, pode ser extraída para a produção de biocombustíveis, bioenergia e aditivos alimentares (Ali *et al.*, 2021).

Vários autores reportaram a produção de microalgas com diferentes tipos de efluentes. Nie *et al.* (2018) cultivaram a microalga *Golenkinia* SDEC-16 em efluentes provenientes de águas residuais de um campus. Esta microalga apresentou excelentes resultados na remoção de nutrientes sendo, assim, promissora para ser uma matéria-prima para a produção de biocombustíveis e tratamento de águas residuais. Efluentes de águas residuais municipais, foram estudados por Ansari *et al.* (2019) e de águas residuais domésticas por Tang *et al.* (2018) a. Já Gupta *et al.* (2016), utilizaram uma água residual doméstica bruta, e Van Den Hende *et al.* (2011), introduziram microalgas, no tratamento secundário de águas residuais. Efluentes de águas russas, foram utilizados por Karray *et al.* (2022) para o crescimento de microalgas e Ferreira *et al.* (2017) testaram a utilização de efluentes pecuários para o crescimento de microalgas.

Contudo, os efluentes pecuários não podem ser usados diretamente para a produção de microalgas, devido à presença de sólidos em suspensão e às concentrações elevadas em ião

amónio (aproximadamente metade do azoto está na forma de ião amónio e metade está na forma de azoto orgânico). Assim, os dejetos animais devem sofrer, previamente digestão anaeróbia, que permite a redução da sua toxicidade para as microalgas (Cai *et al.*, 2013).

O tratamento de águas residuais através de microalgas apresenta o inconveniente de, durante o processo produtivo, formar-se biomassa que é necessário separar, para realizar descarga da água residual tratada no meio hídrico recetor e aproveitamento da biomassa das microalgas. Assim, é necessário um processo de colheita que acarreta custos e pode ser moroso. Normalmente, os processos de base química (floculação e coagulação química), mecânica (centrifugação, filtração tangencial, sedimentação e flotação) e elétrica (eletroforese), são os mais utilizados. São necessários mais estudos, para aperfeiçoar os métodos mais eficazes para cada efluente, método de colheita, e, técnicas para um maior rendimento da biomassa de microalgas de forma eficiente e a tornar o processo rentável (Zhuang *et al.*, 2022).

2.3.4 Utilização de microalgas como biofertilizantes ou bioestimulantes

Desde meados do século XX até hoje, os fertilizantes e estimulantes químicos ajudam na alimentação mundial. Isso tem sido feito através do fornecimento dos nutrientes necessários, como fósforo (P), azoto (N) e potássio (K), às plantas, sendo que estes quando utilizados em excesso, são responsáveis pela poluição ambiental. O uso excessivo destes agroquímicos sintéticos resulta na degradação do sistema ecológico existente no nosso planeta, originado eutrofização, infertilidade de solos e perda de biodiversidade (Fasusi *et al.*, 2021; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2016).

Assim, os biofertilizantes e os bioestimulantes surgem em alternativa a estes produtos mais prejudiciais para o ambiente. Estes são produtos ambientalmente seguros, que funcionam como alternativa mais económica e ecológica aos produtos sintéticos na estimulação do crescimento das plantas (Ronga *et al.*, 2019). Estes bioprodutos correspondem a uma alternativa bastante promissora num futuro próximo, uma vez que poderão garantir uma melhoria na exploração agrícola e ao mesmo tempo ajudar a preservar e promover a melhoria da qualidade dos solos.

O termo biofertilizante refere-se a uma substância que possui microrganismos vivos ou latentes que, quando aplicados às sementes, à superfície das plantas ou ao solo, colonizam a rizosfera ou o interior da planta e promovem o seu crescimento, através do aumento do

fornecimento, ou da disponibilidade, de nutrientes vegetais para a planta hospedeira (Ribeiro, 2022). Por outras palavras, os biofertilizantes são produtos que contêm microrganismos vivos ou compostos naturais derivados de organismos como bactérias, fungos e algas que melhoram as propriedades químicas e biológicas do solo, estimulam o crescimento das plantas e restauram a fertilidade do solo. Dado que as microalgas contêm altos teores de micronutrientes e macronutrientes essenciais para o crescimento das plantas, existe uma potencial aplicação como biofertilizantes. Vários estudos estabeleceram uma associação entre a maior absorção de nutrientes, maior acumulação de biomassa e maior produtividade das culturas com a incorporação de biofertilizantes de microalgas (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2016).

Os biofertilizantes podem existir em duas formas: líquida e sólida. As formulações líquidas consistem numa cultura de microrganismos juntamente com alguns compostos, como água, óleo e outras substâncias que auxiliam no aumento da capacidade de adesão e dispersão no produto formado. A principal vantagem é que podem ser facilmente processadas e o custo de produção não é alto. Por outro lado, a formulação sólida é baseada na sua desidratação para formar granulado ou pó, ou na sua mistura com um produto que facilite a sua aplicação. A aplicação do biofertilizante depende do tipo de bioformulação a ser aplicada. Existem vários métodos pelos quais os biofertilizantes podem ser aplicados: inoculação de sementes, imersão das raízes e aplicação ao solo, na forma desidratada ou em formulações líquidas (Fasusi *et al.*, 2021).

Na inoculação de sementes, os biofertilizantes são misturados com água para formar uma pasta. As sementes são misturadas com a pasta para se obter uma mistura uniforme de inoculante que cobre a semente. Depois, a mistura é seca antes da sementeira. Relativamente, ao método de aplicação de biofertilizante por imersão de raízes, é usado para culturas transplantadas. O biofertilizante é misturado com água e a raiz da planta é mergulhada na mistura por um tempo antes de ser transplantada. Por fim, na aplicação no solo, o biofertilizante é espalhado no solo em um determinado momento em que o agricultor está pronto para instalar a semente e também pode ser aplicado como pulverização foliar (Fasusi *et al.*, 2021).

Na legislação portuguesa, os biofertilizantes estão incluídos na lista das matérias fertilizantes não harmonizadas, contante no Decreto-Lei n.º 30/2022, de 11 de abril. No entanto, a recente legislação europeia sobre fertilizantes (Regulamento UE 2019/1009, de 5 de junho), não utiliza o termo biofertilizante. O legislador optou pela designação bioestimulante para plantas, uma designação com sentido mais lato e que inclui os biofertilizantes: “um produto que estimula os processos de nutrição das plantas, com o único objetivo de melhorar pelo menos uma das seguintes características das plantas ou da sua rizosfera: a) eficiência na

utilização de nutrientes; b) tolerância ao stress abiótico; c) características de qualidade; d) disponibilidade dos nutrientes no solo ou na rizosfera.” (Ribeiro, 2022).

Assim, na interpretação da legislação comunitária, os biofertilizantes são bioestimulantes, mas nem todos os estimulantes serão biofertilizantes.

Os bioestimulantes são definidos como substâncias que podem promover o crescimento das plantas, melhorar a fisiologia das plantas, incluindo o crescimento das raízes e plântulas, aumentar a absorção de nutrientes minerais e aumentar a tolerância das plantas a *stresses* bióticos e abióticos, o que pode aumentar o rendimento das culturas. Por serem derivados de fontes naturais, os bioestimulantes são biodegradáveis, não tóxicos, não poluentes e não perigosos para humanos e animais (Mazepa *et al.*, 2021). Além disso, os bioestimulantes agrícolas incluem diversas formulações de compostos, substâncias e outros produtos, como microrganismos, oligoelementos, enzimas, reguladores de crescimento de plantas (PGRs) e extratos de macroalgas que são aplicados em plantas ou solos para regular e melhorar os processos fisiológicos da cultura, tornando-os assim mais eficientes. Os bioestimulantes agrícolas atuam na fisiologia da planta através de diferentes caminhos para melhorar o vigor da cultura, rendimentos, qualidade e vida útil/conservação pós-colheita.

Os bioestimulantes naturais que ganharam destaque recentemente incluem aqueles produzidos a partir de microalgas, que podem fornecer aminoácidos, vitaminas, citocininas, auxinas e uma série de hidratos de carbono que atuam como substâncias estimulantes do crescimento. Esses compostos bioativos podem afetar o metabolismo celular em plantas tratadas, permitindo que as plantas desenvolvam tolerância a *stresses* ambientais, como variações de temperatura e stress hídrico, resultando em maior absorção de nutrientes do solo, melhor germinação de sementes e desenvolvimento radicular, propriedades antioxidantes aprimoradas, melhor qualidade das folhas e o desenvolvimento de resistência a patógenos. Esses compostos também podem atuar sinergicamente (Mazepa *et al.*, 2021; Chiaiese *et al.*, 2018).

As macroalgas bioestimulantes demonstraram influenciar a respiração, a fotossíntese, a síntese de ácidos nucleicos e a absorção de íons. Conseqüentemente, os produtos podem aumentar a disponibilidade de nutrientes, a capacidade de retenção de água, aumentar os antioxidantes, melhorar o metabolismo e aumentar a produção de clorofila nas plantas (Ferreira *et al.*, 2017). Estas podem produzir e excretar hormonas (por exemplo, auxinas e citocininas) que promovem o crescimento das plantas. As citocinas correlacionam-se positivamente com o peso da semente, comprimento da radícula, comprimento do caule e comprimento da raiz de plantas. Além disso, sabe-se que as hormonas vegetais sintéticas e naturais podem aumentar

rendimentos e produtividade das culturas (Hussain & Hasnain, 2011). Desta forma, o uso de bioestimulantes à base de microalgas, juntamente com protocolos de manuseamento de culturas, pode melhorar significativamente a absorção de nutrientes pelas plantas, levando a economia no custo de fertilizantes.

2.4. Casos de estudo de utilização de microalgas como fertilizantes orgânicos

Renuka *et al.* (2016) e Coppens *et al.* (2016) realizaram diferentes estudos onde usaram microalgas como fertilizantes orgânicos. Ambos os autores defendem que, a disponibilidade de macro e micronutrientes é um fator importante para alcançar maiores rendimentos nas culturas, aplicando a biomassa das microalgas com alguma antecedência, de modo que possa ocorrer a mineralização de parte da sua biomassa. Renuka *et al.* (2016) usaram no seu estudo o trigo, que é uma das principais fontes de proteínas para a dieta humana, enquanto Coppens *et al.* (2016) utilizaram tomate, de modo a avaliar o potencial das microalgas como fertilizantes orgânicos de libertação lenta.

Coppens *et al.* (2016) afirmam que a taxa de mineralização está dentro da gama de fertilizantes de libertação lenta comercialmente disponíveis que são aplicados na horticultura orgânica. Além disso, a libertação de azoto e fósforo da fonte orgânica de nutrientes é fortemente controlada pelo ambiente do solo. Desta forma, as discrepâncias nas taxas de mineralização podem ser explicadas pela diferença no solo, ou seja, o teor de humidade, a temperatura e o pH durante a incubação.

Tendo em conta o crescimento da cultura de tomate, Coppens *et al.* (2016) relatam que não houve diferenças significativas entre o crescimento da planta cultivada com fertilizantes orgânicos e microalgas. O sistema convencional de cultivo revelou um crescimento inicial mais rápido da planta, que é atribuído à facilidade de nutrientes inorgânicos disponíveis e à presença de nitrato como a fonte predominante de azoto. Na análise foliar demonstrou-se que o teor de azoto foi significativamente maior nas plantas tratadas com microalgas, revelando as boas propriedades deste tipo de fertilizante.

Relativamente à produção de frutos de tomate, Coppens *et al.* (2016) não tiveram uma diferença significativa no número de frutos entre os tratamentos. No entanto, um menor rendimento de tomate foi obtido para os tratamentos com algas. Além disso, uma maior

incidência de podridão foliar foi observada em ambos os tratamentos. O menor rendimento comercializável e o tamanho dos frutos obtidos para o tratamento com biofertilizantes, podem ser explicados por diferentes fenómenos. Os rendimentos baixos podem ser atribuídos à pressão osmótica, devido ao aumento da salinidade de fertilizantes, limitando o fluxo de água para o desenvolvimento do fruto.

Coppens *et al.* (2016) concluem que a biomassa de microalgas pode ser utilizada como fertilizante orgânico de libertação lenta para o cultivo de tomate. Os fertilizantes microalgais melhoram a qualidade dos frutos produzidos através do aumento do teor de açúcares e carotenoides dos frutos.

Por sua vez, Renuka *et al.* (2016), baseando-se no trigo afirmam que o uso de microalgas é uma abordagem benéfica em termos de viabilidade económica e sustentabilidade ambiental. Uma maior disponibilidade de nutrientes (N, P e K), foi obtida na fase intermédia da cultura em tratamentos inoculados com consórcio de microalgas, em comparação com tratamentos não inoculados e tratamento com dose completa de fertilizante.

A atividade microbiana na rizosfera determina a disponibilidade de nutrientes para a planta e é usada para avaliar o impacto das práticas agronómicas na vitalidade do solo. Renuka *et al.* (2016) registaram um aumento da atividade microbiana, suportada pelo aumento do carbono da biomassa microbiana do solo, nos tratamentos inoculados com microalgas/cianobactérias.

A disponibilidade de nutrientes do solo desempenhou um papel importante na produtividade das culturas. O incremento da atividade biológica e das características químicas do solo também levou a um aumento do rendimento das culturas e da qualidade dos grãos. No estudo de Renuka *et al.* (2016), foi observado um maior número de perfilhos e comprimento de raízes nos tratamentos com consórcio de microalgas na fase de meio de cultivo. Também foi relatado um aumento nos parâmetros de rendimento da cultura na fase de colheita, peso seco da planta, peso da espiga, número de espigas e peso do grão. Estas características estão relacionadas com o estado nutricional do solo e da planta.

Em suma, estes estudos demonstram que o uso de fertilizantes com base em microalgas, são alternativas económicas e sustentáveis face às soluções atualmente usadas, contribuindo para o aumento da produção agrícola e para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras que aumentem os rendimentos agrícolas, minimizando o consumo linear de recursos finitos.

3. Materiais e métodos

3.1. Caracterização do local da amostragem e da amostra de água

A água de drenagem agrícola foi amostrada numa exploração agrícola situada na freguesia de Ribeira de São João, no concelho de Rio Maior, distrito de Santarém, (39°17'13.6"N 8°53'37.6"W) (Portugal) (Figura 3.1). Este concelho é atravessado pela Ribeira do Juncal e pela Ribeira de Rio Maior.

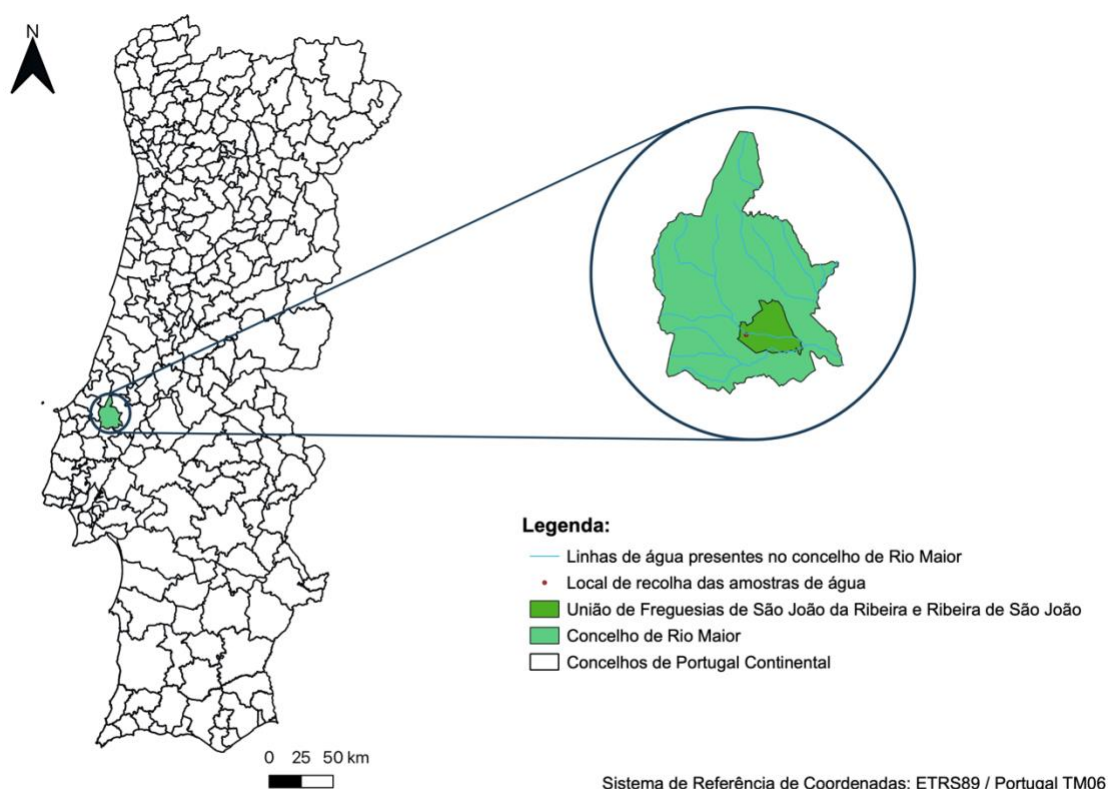


Figura 3.1 - Enquadramento geográfico do local de amostragem, São João da Ribeira (39°17'13.6"N 8°53'37.6"W), próximo do concelho de Rio Maior (Portugal).

A exploração agrícola em questão, dedica-se ao cultivo de milho, existindo uma lagoa de drenagem (Figura 3.2 - A), para onde drenam as águas de escoamento superficial e de infiltração, que são recolhidas através de um sistema de drenos subterrâneos (Figura 3.2 - B). A charca é rodeada por campos de milho, e recebe as águas de escorrência (com origem na precipitação e irrigação) das culturas dessa propriedade, e das propriedades vizinhas (predominantemente, milho), as quais dissolvem ou arrastam pesticidas e nutrientes. Os fertilizantes e pesticidas aplicados pelo agricultor no ano agrícola em análise

(2021) podem ser consultados no Anexo I. A água desta charca é utilizada para rega, até ter capacidade para tal. Quando isso deixa de ser possível, efetuam-se recargas para a charca, a partir de um rio próximo.

A amostra de água utilizada para o crescimento das microalgas foi recolhida nessa lagoa, a 9 de julho de 2021, tendo sido caracterizada físico-quimicamente nos Laboratórios do Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas do Instituto Superior de Agronomia (DCEB – ISA) (Quadro 4.1). Os pesticidas foram analisados num laboratório externo (Eurofins) (Quadro 3.1), tendo sido apenas detetados e quantificados herbicidas, apesar da cultura também ter recebido inseticidas (Anexo I). A temperatura máxima registada desde o início da instalação da cultura do milho até esse dia foi de 39,4°C, a mínima foi de 4,6°C e a precipitação acumulada de 200,2 mm.



A



B

Figura 3.2 - (A) Lagoa de drenagem onde foi recolhida a água de drenagem agrícola utilizada neste estudo (9/julho/2021), e (B) saída do sistema de drenos que recolhe a água de drenagem subterrânea.

Quadro 3.1 - Pesticidas quantificados na água de escoamento, utilizado para o crescimento de microalgas (todos os herbicidas) (média ± DP, n=3).

| Substância ativa | Concentração (µg/L) |
|--|----------------------------|
| 6-Chlor-3-phenylpyridazin-4-ol (Pyridafol) | 0,36±0,18 |
| Metolacloro | 0,86±0,43 |
| Nicossulfurão (*) | 0,25±0,13 |
| Terbutilazina | 0,081±0,041 |
| Terbutilazina, desetil- (**) | 0,14±0,07 |
| Glifosato (*) | 0,058±0,029 |
| AMPA (Ácido aminometilfosfónico) (***) | 0,47±0,24 |
| Tembotrione | 0,072±0,036 |

(*) Herbicidas não reportados pelo agricultor como aplicados no campo; (**) Metabólito de terbutilazina; (***) Metabólito de glifosato.

3.2. Seleção e crescimento das microalgas na água de drenagem agrícola

A empresa Allmicroalgae colaborou no projeto onde se insere este estudo, tendo selecionado as estirpes de microalgas com melhor produtividade na água de drenagem agrícola, e efetuado a produção das estirpes mais adaptadas, de modo a produzir a biomassa suficiente para ser utilizada nos ensaios de fertilização. Foram realizados ensaios com cinco estirpes de microalgas (três estirpes de água doce, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Nannochloropsis* sp., e duas estirpes de água salgada, *Tetraselmis chui* e *Phaeodactylum tricornutum*). As microalgas selecionadas, e que foram utilizadas nos ensaios de crescimento e bioensaios foram: *C. vulgaris* (CV) e *S. obliquus* (SO) porque, apesar de não terem apresentado produtividades significativamente diferentes das estirpes de água salgada (Alvarenga *et al.*, 2022), não necessitam de suplementação salina do meio, sendo mais económica a sua produção.

As microalgas selecionadas foram cultivadas utilizando a água de drenagem agrícola, nas instalações da Allmicroalage, em Pataias, em dois bioreatores de painel, com capacidade de 30 L cada), durante 15 dias (de 1 a 15 de outubro 2021), nas condições de luminosidade e temperatura de exterior. As produtividades atingidas foram de 2,2 g/L para a *S. obliquus* e de 1,15 g/L para *C. vulgaris* (Alvarenga *et al.*, 2022). No final do seu crescimento, as duas suspensões foram recolhidas e conservadas a -20°C, para uso posterior nos ensaios com plantas, como fertilizante orgânico ou bioestimulante), tendo-se separado uma subamostra para análise.

3.3 Avaliação do potencial fertilizante da suspensão de microalgas

O potencial fertilizante da suspensão de microalgas foi avaliado efetuando um ensaio de crescimento em vasos, utilizando alface (*Lactuca sativa*, variedade Nadine). O ensaio decorreu entre 17 de março e 14 de junho de 2022 (89 dias), na estufa do Horto de Química Agrícola Boaventura de Azevedo, localizada no Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa. A altitude é de 64 metros e as coordenadas geográficas são as seguintes: 38°42'28.679"N, 9°11'6.194"W. Durante o tempo em que decorreu o ensaio, a temperatura máxima, média e mínima, foram, respetivamente: 22,6°C; 17,9°C e de 13,2°C (Anexo II).

O solo utilizado no ensaio foi recolhido no concelho da Golegã, distrito de Santarém (39°25'16.1"N 8°27'00.9"W). É ligeiramente alcalino, não salino, de textura franco arenosa, com um teor muito baixo em matéria orgânica (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 - Caracterização do solo utilizado no ensaio de avaliação de microalgas como potencial fertilizante orgânico.

| Parâmetros | | Resultados | Observações |
|-----------------------|---|------------|--------------------------------------|
| | pH | 8,3 | Ligeiramente alcalino |
| | EC (μ S/cm) | 190,0 | Não apresenta salinidade |
| | P _{extraível} (mg P ₂ O ₅ /kg) | 194,0 | Classe de fertilidade - Alta |
| | K _{extraível} (mg K ₂ O/kg) | 89,0 | Classe de fertilidade - Média |
| | Matéria orgânica (g/kg) | 8,4 | Muito baixa |
| | Carbonatos (g CaCO ₃ /kg) | 26,7 | Nível baixo (sem necessidade de cal) |
| Granulometria (<2 mm) | Areia (g/kg) | 714,2 | |
| | Limo (g/kg) | 144,3 | Franco arenoso |
| | Argila (g/kg) | 141,4 | |

Utilizaram-se vasos de plástico com uma capacidade de 3,2 L, correspondente a 3,1 kg de solo seco ao ar e crivado com um crivo de 5 mm. Estabeleceram-se oito modalidades, com quatro réplicas por tratamento (Quadro 3.4): controlo sem fertilização (C), controlo de

fertilização mineral (M: 1 g N/vaso, como nitrato de amónio), suspensão de microalgas de *C. vulgaris* (CV) e de *S. obliquus* (SO), em quantidades destinadas a veicular diferentes quantidades de N por vaso através da biomassa de microalga aplicada (CV0.5 ou SO0.5: 0,5 g N; CV1.0 ou SO1.0: 1,0 g N; e CV2.5 ou SO2.5: 2,5 g N). Todos os vasos, exceto o controlo, receberam uma aplicação basal 0,5 g N/vaso, como nitrato de amónio. O controlo mineral (M) recebeu o restante N por via mineral (0,5 g N/vaso), enquanto as outras modalidades receberam a restante adubação de N por via orgânica (suspensão de microalgas: 0,5, 1,0 e 2,5 g N/vaso).

A suspensão de microalgas começou a ser adicionada ao solo do vaso respetivo 32 dias antes da transplantação da planta, para permitir já alguma mineralização da biomassa e a disponibilização de N na forma mineral, a partir do N orgânico (biomassa das microalgas). Porém, a suspensão não foi toda adicionada ao mesmo tempo, porque foi respeitado o facto de não poder ser ultrapassado 70% da capacidade de retenção de água do solo.

Quadro 3.3 - Descrição do ensaio de crescimento de alface utilizando a suspensão de microalgas (*C. vulgaris* (CV) e *S. obliquus* (SO)), para substituir o N mineral de cobertura aplicação (n = 4). C: controlo sem adubação; M: adubação mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: *C. vulgaris* aplicado em doses de 0,5, 1,0 e 2,5 g N/vaso; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: *S. obliquus* aplicado em doses de 0,5, 1,0 e 2,5 g N/vaso.

| | C | M | CV0.5 | CV1.0 | CV2.5 | SO0.5 | SO1.0 | SO2.5 |
|--|---|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Aplicação de N mineral em fundo (g N/vaso) | - | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Aplicação de N microalgas em fundo (g N/vaso) | - | - | 0,5 | 1,0 | 2,5 | 0,5 | 1,0 | 2,5 |
| Aplicação de N mineral em cobertura (g N/vaso) | - | 0,5 | - | - | - | - | - | - |
| Volume de suspensão de microalgas (mL)* | - | - | 250 | 500 | 1250 | 250 | 500 | 1250 |

*Nota: O volume de suspensão de microalgas foi adicionado tendo em conta a capacidade de retenção de água do solo e a quantidade de azoto a veicular para cada um dos vasos, e levou em consideração a concentração de N total nas suspensões de microalgas.

Sementes de alface foram semeadas em tabuleiros com substrato orgânico à base de turfa, tendo sido transplantadas ao fim de 32 dias, uma planta por cada vaso, após a reposição do peso inicial dos vasos com água desionizada. Com o intuito de diminuir possíveis diferenças, ao nível da temperatura e radiação solar recebida por cada plantas nas diferentes modalidades, (Anexo II), procedeu-se sempre à rotação diária dos vasos e à sua rega com água desionizada, sempre que necessário, até reposição do peso inicial (70% da capacidade de retenção de água). Ocasionalmente, quando as condições climáticas foram favoráveis, o carro onde estava montado o ensaio colocou-se fora da estufa, recolhendo-se sempre no final do dia para o seu interior.

A adubação de cobertura (0,5 g N/vaso com nitrato de amónio), foi aplicada 28 dias após a transplantação, apenas para a modalidade de controlo de fertilização mineral (M). Ao fim de três semanas da transplantação das plantas, avaliou-se semanalmente a absorvância ótica ao comprimento de onda duplo (620 e 940 nm), traduzindo a atividade fotossintética em relação à concentração de azoto da amostra. Utilizou-se um medidor de conteúdo de clorofila - modelo CL-01, Hansatech Instruments. Efetuaram-se três leituras por planta, na mesma folha, a mais recente e bem desenvolvida, tendo-se utilizado a média aritmética desses valores. Na Figura 3.3, pode ser observada a evolução das plantas no período em que foram efetuadas as leituras óticas do valor de clorofila (9 de maio a 14 de junho, 2022).

No decorrer do ensaio, observaram-se alguns problemas fitossanitários que foram tratados de acordo com as necessidades utilizando os produtos fitossanitários adequados, em doses iguais para todas as plantas (Anexo III).

Cinquenta e sete dias após a transplantação (\cong 2 meses), procedeu-se ao corte da parte aérea da planta, 0,5 – 1,0 cm acima da superfície do solo. Retiraram-se as folhas que estavam em contacto com o solo, pois apresentavam-se mais secas e deterioradas, a planta foi limpa, colocada em tabuleiros e pesada, de modo a registar o peso correspondente à biomassa fresca.

Para a determinação da biomassa seca, colocou-se numa estufa durante 48 h a uma temperatura de 60°C. A biomassa seca foi moída num moinho de facas e guardada seca, ao abrigo da luz, para análise posterior.



Figura 3.3 - Estado das plantas nos dias em que se procedeu à leitura da absorvância ótica.

O solo de cada vaso foi subdividido em duas amostras, uma foi seca ao ar e crivada por crivo de malha 2 mm, para análise físico-química, e uma sub-amostra foi conservada “à humidade de campo”, para determinação da atividade enzima desidrogenase.

A referência aos métodos utilizados na caracterização das amostras de água, suspensão de microalgas, material vegetal e solos encontra-se descrita no sub-capítulo 3.5.

3.4 Avaliação do potencial bioestimulante das microalgas *C. vulgaris* e *S. obliquus*

Foi avaliado se a aplicação da biomassa das microalgas se substitui ao efeito de determinados reguladores de crescimentos: auxina (ácido indol-3-butírico, IBA), citocinina (citocinina 6-benzilaminopurina, BAP), e giberelina (ácido giberélico, GA₃), utilizando sementes de alface (*L. sativa*, variedade Rainha de Maio), e controlos positivos com concentrações crescentes do próprio regulador de crescimento, utilizando procedimentos adaptados de Navarro-Lopez *et al.* (2020).

3.4.1 - Ensaios preliminares para seleção do meio de germinação

Determinou-se qual o meio de germinação mais favorável à germinação de sementes a utilizar nos ensaios de bioestimulação. Dessas sementes, resultaram as plântulas que foram usadas, +no ensaio de avaliação do potencial bioestimulante ao efeito-semelhante à auxina e ao da citocinina.

Comparou-se entre a germinação em placas de *Petri* (diâmetro de 90 mm) de sementes de alface com papel de filtro + água desionizada, e com meio de germinação. A composição e preparação do meio de germinação foram adaptadas de Navarro-Lopez *et al.* (2020) (Figura 3.4), contendo: 0,8 g/L de nitrato de cálcio [Ca(NO₃)₂]; 0,2 g/L de nitrato de potássio (KNO₃); 0,2 g/L de fosfato monopotássico (KH₂PO₄); 0,2 g/L de sulfato de magnésio hepta-hidratado (Mg₂SO₄.7H₂O) e 7 g/L de ágar-ágar. Concluiu-se que a germinação e o desenvolvimento das sementes apresentavam melhores resultados utilizando o meio de germinação (Figura 3.5).

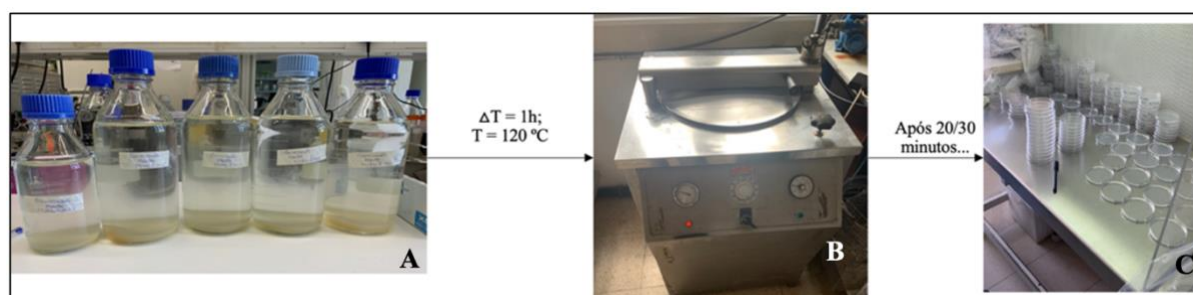


Figura 3.4 - Metodologia adotada para a preparação do meio de germinação. A - Colocação de nutrientes em frascos; B - Autoclavagem durante 1h a 120°C e C - Placas de *Petri* plaqueadas com o meio de germinação.

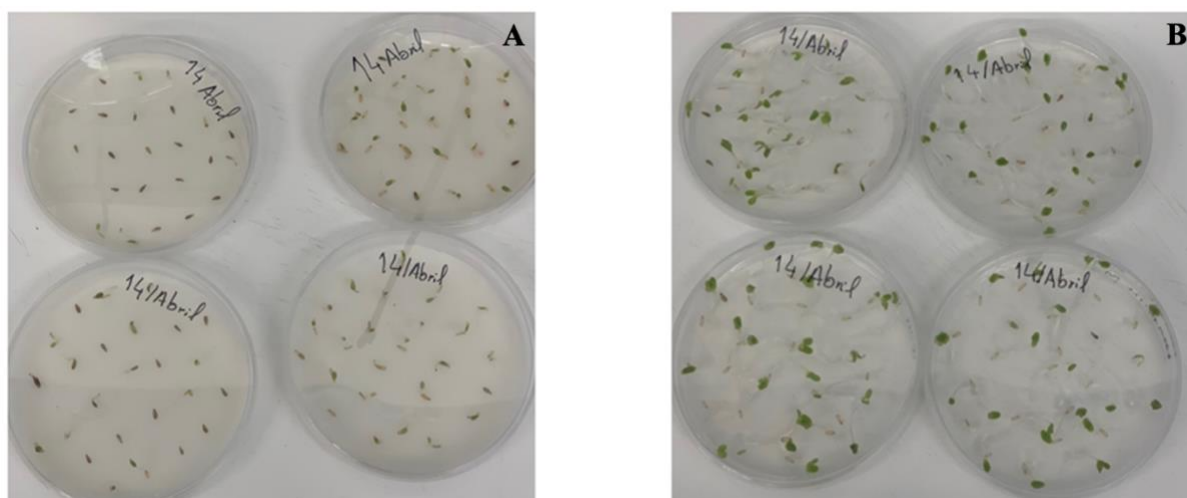


Figura 3.5 - Germinação das sementes de *L. sativa* em papel de filtro + água desionizada (A) e em meio de germinação (B), evidenciando a melhor resposta em meio de crescimento.

3.4.2 - Preparação das placas de *Petri* com as suspensões de microalgas para avaliação do seu potencial bioestimulante

Em cada bioensaio foram utilizadas placas de *Petri* com diferentes soluções: (i) controlo negativo, com água desionizada; (ii) controlo positivo, com o regulador de crescimento que se pretende avaliar (IBA ou BAP), em diferentes concentrações (0,3, 0,7 e 1,0 mg/L); e (iii) extratos das duas microalgas (*C. vulgaris* e *S. obliquus*) em diferentes concentrações (a quantidade de extrato equivalente a 0,5, 1,0 e 2,5 g de N/L, de modo a usar as mesmas concentrações que no ensaio em vaso) (Figura 3.6). O ensaio foi feito utilizando quatro réplicas por tratamento (n = 4), para cada um dos 10 tratamentos (40 placas de *Petri* no total, por ensaio).

As placas de *Petri* foram sempre manuseadas numa câmara de fluxo laminar (ambiente estéril), previamente identificadas, tendo sido utilizado um papel de filtro qualitativo (de 9 mm - marca filtraTECH), em cada placa. De seguida, foram colocadas 4 mL de cada uma das soluções na placa respetiva.

O controlo negativo foi preparado com água esterilizada, enquanto os controlos positivos foram preparados de acordo com o efeito a avaliar em cada ensaio, diluindo-se as soluções *stock* dos reguladores de crescimento com água desionizada até à concentração pretendida: 0,3, 0,7 e 1,0 mg/L.

As soluções de extratos de microalgas foram também obtidas pelo mesmo método de diluição, até se obter a concentração pretendida (0,5, 1,0 e 2,5 g N/L), sendo de seguida adicionadas à respetiva placa de *Petri*. Para a exposição do material vegetal ao extrato das microalgas foram exploradas diferentes abordagens, com utilização de: (i) suspensão original das microalgas, no meio de crescimento que foi usado para a sua produção; (ii) suspensão do extrato de microalgas em água desionizada - substituindo o meio original por água desionizada, após centrifugação; (iii) suspensão original das microalgas submetida a lise celular por aplicação de ultrassons; e (iv) suspensão do extrato de microalgas em água desionizada - substituindo o meio original por água desionizada, após centrifugação, seguida de lise celular por aplicação de ultrassons.

A separação do extrato de microalgas do meio de crescimento original foi feita numa centrífuga (Z 327 K, HERMLE Labortechnik), tendo-se centrifugado 40 mL da suspensão original a 12 000 rpm e $r = 0,6$ durante 5 minutos. Fez-se uma decantação da parte líquida, adicionou-se 40 mL de água desionizada ao extrato e homogeneizou-se a solução num agitador Vortex.

A lise celular às microalgas foi feita por aplicação de ultrassons. Este processo promove a rotura das células e, conseqüentemente, permite a libertação do material celular para o meio, permitindo um contacto mais efetivo das biomoléculas com potencial efeito bioestimulante com o material vegetal (Chew *et al.*, 2017). A rotura celular por ultrassons de alta frequência foi realizada a 120 mL de cada suspensão (a original e a ressuspensão das microalgas em água desionizada), durante 15 minutos, utilizando um equipamento UP200Ht Ultrasonic, Hielscher. O tipo de ponta utilizado no aparelho, foi S26d26, diâmetro de 26 mm, uma amplitude de 20 [µm] 100%, uma frequência fixa de 26 kHz e os ultrassons foram transmitidos por impulsos (100%). A potência fornecida pelo aparelho foi sempre de 70W, a densidade de potência acústica pode ser calculada por: $\frac{Volume}{Potencia} = \frac{120\text{ mL}}{70\text{ W}} = 1,7$. Antecipando eventuais alterações às suspensões, ambas foram colocadas numa tina com água e gelo, para evitar o aumento da temperatura (a temperatura máxima atingida foi de 36°C).

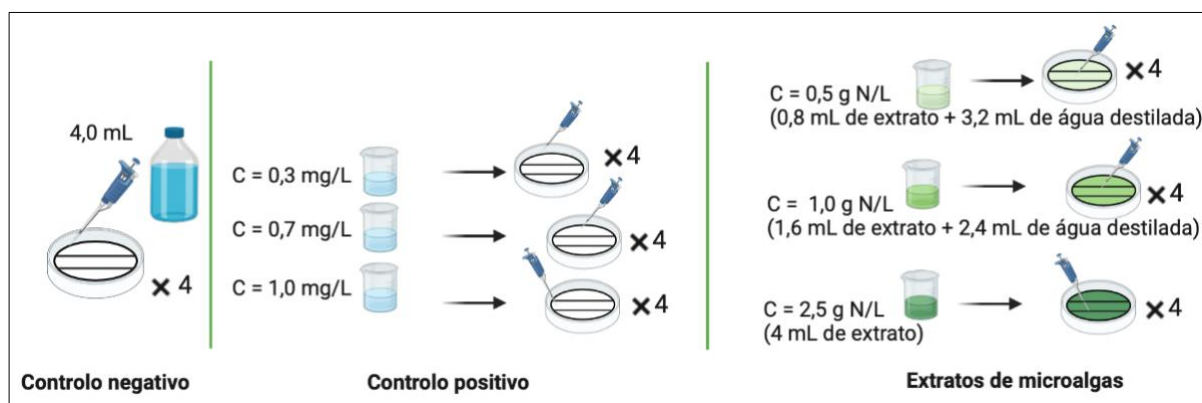


Figura 3.6 - Descrição da preparação das placas de *Petri*, com diferentes soluções: (i) controlo negativo, com água desionizada; (ii) controlo positivo, com o regulador de crescimento que se pretendia avaliar (IBA ou BAP); e (iii) extratos de microalgas (Martins *et al.*, 2022).

3.4.3 - Avaliação do efeito semelhante à auxina (IBA) e à citocinina (BAP) - Ensaio de germinação com *L. sativa*

Colocaram-se 35 sementes de alface em cada placa de *Petri* preparadas com o meio de germinação (MG) selecionado em 3.4.1. Decorridos 3 dias, as sementes germinadas foram retiradas e excisadas de modo a serem utilizadas na avaliação do efeito semelhante à auxina e do efeito semelhante à citocinina.

Para avaliar o efeito-semelhante à auxina (IBA), excisou-se o cotilédone com o hipocótilo, fazendo o corte com aproximadamente 2 mm de hipocótilo. E para avaliar o da

citocinina (BAP), realizou-se a excisão do cotilédone. O material vegetal foi disposto pelas linhas marcadas previamente no papel de filtro, deixando sempre a extremidade do mesmo sobre a linha. Selou-se as placas com para-filme e, ao longo de 7 dias, acompanhou-se o desenvolvimento das mesmas. Realizou-se este procedimento, para as quatro suspensões obtidas conforme descrito em 3.4.2, efetuando o ensaio em quadruplicado (Martins *et al.*, 2022).

Efetuiu-se o registo fotográfico da evolução do crescimento/desenvolvimento do material vegetal nos bioensaios, no início (t = 0 dias) e no final do ensaio (t = 7 dias), de modo a quantificar o acréscimo do cotilédone e a área da folha de alface.

Na Figura 3.7, está o procedimento utilizado para a avaliação do efeito-semelhante destes dois reguladores de crescimentos, auxina e citocinina.

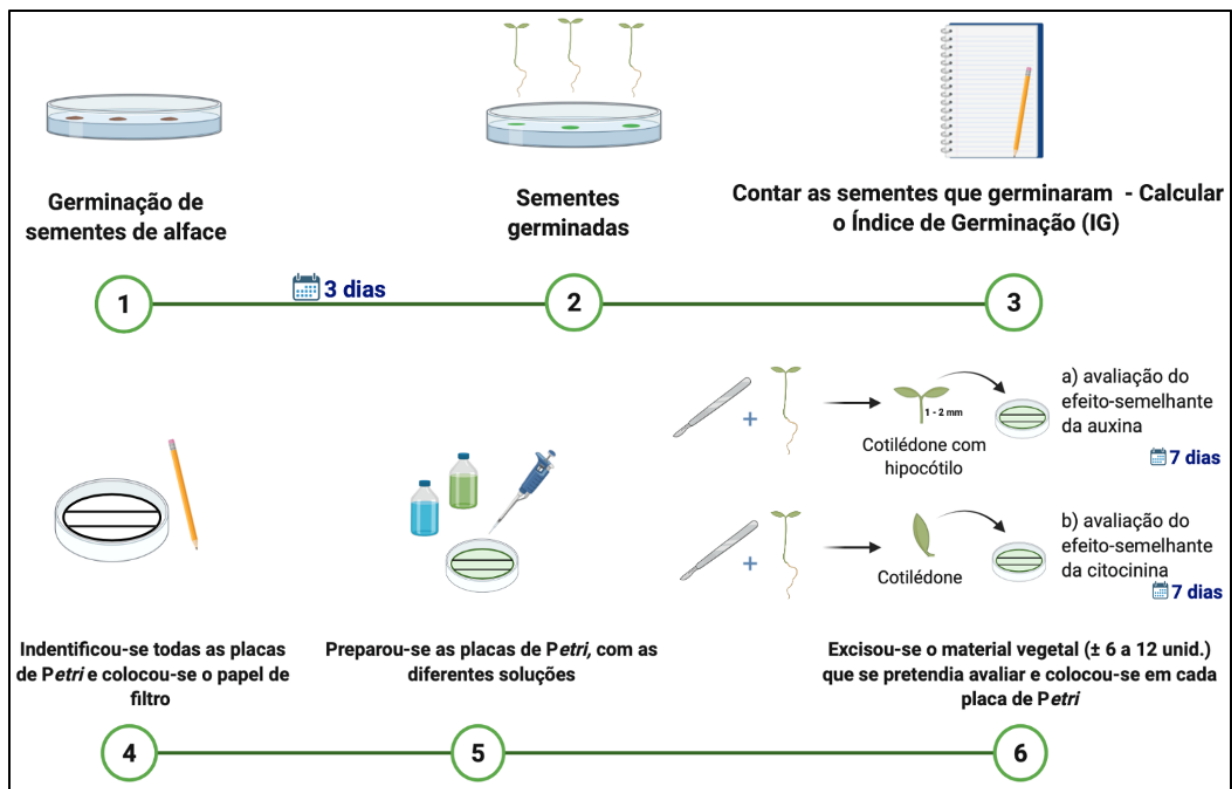


Figura 3.7 - Procedimento para a determinação do potencial bioestimulante da microalga *C. vulgaris* e *S. obliquus* (Martins *et al.*, 2022).

3.4.4 - Avaliação do efeito semelhante à giberelina (GA₃) - Ensaio de germinação com *L. sativa*

Para avaliar o efeito do ácido giberélico (GA₃) na germinação, utilizou-se como controlo positivo a substância comercial GA₃. Prepararam-se as soluções a adicionar às placas de *Petri*, conforme descrito em 3.4.2. Foram colocadas 25 sementes de alface em cada placa (controlo negativo, positivo e soluções de extratos das duas microalgas), durante 3 dias, repetindo este procedimento para as quatro suspensões diferentes, sempre em quadruplicado. No término de cada ensaio, foram contabilizadas as sementes que germinaram, e calculado o índice de germinação (IG), em percentagem, relativamente ao controlo.

$$\text{Índice de Germinação (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de sementes que germinaram}}{\text{Total de sementes}} \times 100$$

Na Figura 3.8 está representada uma perspetiva geral do início do bioensaio.

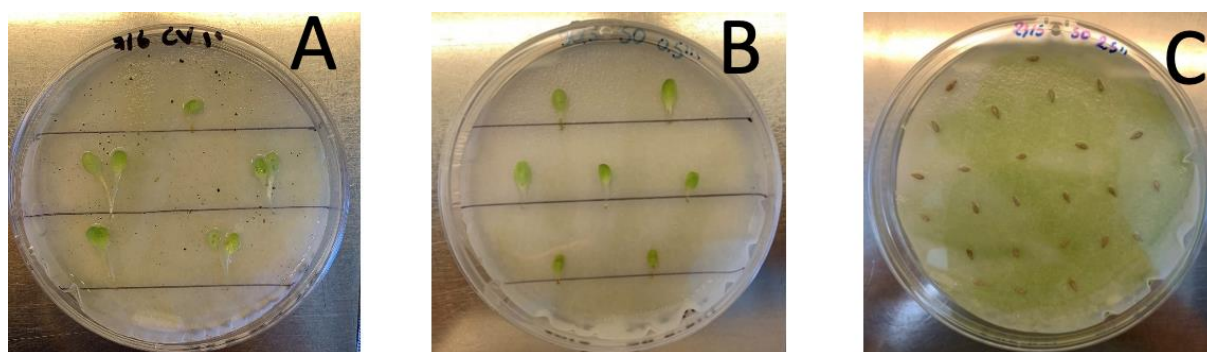


Figura 3.8 - Exemplificação das placas de *Petri* com material vegetal para avaliação de: (A) efeito semelhante à auxina; (B) efeito semelhante à citocinina; e (C) efeito semelhante à giberelina.

3.5 Determinações analíticas

3.5.1 Caracterização físico-química da água e das suspensões de microalgas

O pH das amostras foi medido diretamente, utilizando um potenciómetro (Orion™ 3-Star Benchtop), assim como a condutividade elétrica (CE), neste caso utilizando um condutivímetro (Orion Star™ A212).

Para a quantificação dos iões nitrato (NO_3^-) e amónio (NH_4^+), procedeu-se a uma medição, num auto analisador de fluxo segmentado (SKALAR, *SanPlus System*, Skalar Analytical B. V., Breda, Holanda).

A determinação do azoto amoniacal em amostras sólidas (*e.g.*, solo), consistiu numa destilação direta da amostra em meio alcalino (NaOH), sendo o NH_3 destilado, recolhido em ácido bórico (concentração de 4% e $V=50$ mL) na presença de indicador misto, e, após a recolha, realizou-se uma titulação com uma solução de HCl de concentração 0,05 N. Os nitratos foram determinados, também por destilação, adicionando-se 25 mL de sulfato ferroso (150 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /L) à amostra, efetuando-se a posterior titulação do mesmo modo que a amostra anterior.

Para a determinação da carência química de oxigénio (CQO - quantidade de MO que pode ser oxidada, relacionada com o carga de poluição da água), $\text{mg O}_2/\text{L}$, a matéria orgânica e inorgânica oxidável que se encontra presente na amostra, foi oxidada por dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) em excesso, num meio ácido, a quente, na presença de um catalisador metálico. O excesso de dicromato foi determinado por titulação numa solução de sulfato de ferro (II) e de amónio, tendo sido o seu consumo relacionado com o valor da CQO.

A determinação do teor total dos elementos, fósforo (P), enxofre (S), sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), boro (B), crómio (Cr), chumbo (Pb), níquel (Ni), e cádmio (Cd), foi feita diretamente nas amostras líquidas, quando não havia partículas em suspensão, por espectrofotometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O equipamento utilizado nesta determinação, foi da marca Unicam, modelo iCAP7000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Para as amostras de suspensão de microalgas, foi utilizado o mesmo método instrumental, mas foi utilizada a matéria seca das amostras, obtida por secagem a 105°C , após digestão com água régia, uma mistura de ácido nítrico e ácido clorídrico concentrados numa proporção de 3:1, de acordo com a Norma Europeia EN 13650 (CEN, 2001a).

3.5.2. Análises ao material vegetal

O azoto total foi analisado segundo o método de Dumas, utilizando uma metodologia adaptada da Norma Europeia EN 13654-2 (CEN, 2001b).

O teor dos restantes macro e micronutrientes (Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Cu, Zn, Mn e B) foi determinado após digestão da amostra de material vegetal moído com água régia, sendo a sua quantificação realizado por ICP-OES, num espectrofotómetro da marca Unicam, modelo iCAP7000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

3.5.3. Análise físico-químicas ao solo

O pH das amostras de solo foi lido num potenciómetro (Orion™ 3-Star Benchtop) e a CE num condutivímetro (Orion Star™ A212), na suspensão solo:água desionizada de 1:2,5.

O Carbono orgânico (C_{org}) foi determinado por diferença de valores do carbono total (C_{Tot}) e o inorgânico (C_{inorg}), seguindo a norma ISO 10694 (1995), num analisador elementar de carbono (Analytik Jena multi EA 4000). Admitindo que o teor de carbono do solo é de 58%, o teor de matéria orgânica (MO), em percentagem foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Matéria Orgânica} = 1,72 (\text{fator de Van Bemmelen}) \times C_{Total}$$

O boro extraível, foi determinado através de uma extração com cloreto de cálcio ($CaCl_2$), concentração de 0,01 N, numa proporção solo:solução extratante de 1:2. O B no extrato foi determinado por espectrofotometria de emissão ótica de plasma acoplado indutivamente - ICP-OES (iCAP 7000 Series ICP Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para a determinação de micronutrientes extraíveis, procedeu-se à extração da amostra de solo com o extratante de Lakanen (solução de acetato de amónio 0,5 M, ácido acético 0,5 M e EDTA 0,02 M), um rácio solo solução extratante de 1:10. Agitou-se mecanicamente (J.P. Selecta Rotabit) durante 30 minutos (Lakanen & Ervio, 1971). Após a agitação, centrifugou-se. No extrato obtido, quantificaram-se os microelementos extraíveis (Fe, Cu, Zn, Mn), por ICP-OES, no equipamento referido anteriormente.

Os macro elementos extraíveis P e K, foram quantificados seguindo o método de Egner-Rhiem (Póvoas & Barral, 1992). Utilizou-se uma proporção solo: solução extrativa de

Egner-Rihem de 20:1, e, durante 120 minutos submeteu-se a agitação mecânica. Depois, centrifugou-se, no extrato obtido quantificou-se o P e o K extraíveis por ICP-OES.

Os cátions não ácidos (Na, K, Ca, Mg) foram determinados de forma idêntica, o extratante utilizado foi o acetato amônio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2 - 1\text{N}$), com um rácio de 15:1, utilizando um tempo de agitação mecânica de 15 minutos. A capacidade de troca catiónica efetiva (CTC), foi calculada pelo somatório dos cátions não ácidos Na, K, Ca e Mg calculados anteriormente com a acidez de troca.

O azoto mineral sob as formas iónicas NH_4^+ e NO_3^- , quantificou-se num autoanalisador de fluxo segmentado de marca Skalar (modelo SAN^{plus} System, Skalar Analytical B.V., Breda, Holanda). Executou-se a extração, numa proporção 5:1 de cloreto de potássio - KCl 2N e solo. Agitou-se mecanicamente, durante 60 minutos e, decorrido esse tempo, centrifugou-se por 7 minutos.

Quantificou-se o azoto Kjeldahl, de acordo com o método de Kjeldahl (Horneck & Miller, 1998). Utilizou-se uma razão de 2:1 de ácido sulfúrico, juntamente com o catalisador selénio e cada amostra de solo. Digeriu-se a amostra a uma temperatura aproximadamente de 360°C durante 5/6 horas. Quando as amostra já se encontravam à temperatura ambiente, adicionou-se água desionizada, até perfazer um volume total de 50 mL. Homogeneizou-se com o agitador Vortex (RSLAB-6PRO, RSLab), e, a quantificação foi realizada num autoanalisador de fluxo segmentado SAN^{plus} System (Skalar Analytical B.V., Breda, Holanda), usando o método de Berthelot (Houba *et al.*, 1989).

3.5.4. Determinação da atividade enzimática da desidrogenase

A análise foi feita de acordo com o método descrito por Tabatabai (1994) nas amostras “à capacidade de campo”, crivadas por um crivo de 2 mm. As amostras foram incubadas durante 16 h, a 25°C , com 0,1% (p/v) com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) numa solução tampão Tris (0,1 M e pH 7,6) o que permite a redução de TTC para trifenilformazan (TPF). O TPF formado foi medido espectrofotometricamente a 546 nm. A atividade da desidrogenase foi expressa em $\mu\text{g TPF/g.h}$, com base no peso seco em estufa (105°C , 48 h). Todas as medidas analíticas foram realizadas em duplicado.

3.6. Análise dos resultados e tratamento estatístico

O tratamento estatístico e apresentação de resultados foi efetuado com recurso ao software Microsoft® Excel 2022 e R® (R: The R Project for Statistical Computing (r-project.org)). O tratamento de imagens referentes aos bioensaios - determinação do potencial bioestimulante de *C. vulgaris* e *S. obliquus*, foi efetuado com recurso ao programa GIMP®. O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi efetuado recorrendo ao programa R®.

O ensaio de fertilização em vasos teve um delineamento completamente causalizado com oito modalidades. O delineamento foi equilibrado, ou seja, foi utilizado um número igual de observações por modalidade, sendo de quatro neste caso ($N = 4$), equivalente ao número de repetições.

O ensaio de bioestimulação foi realizado com delineamento a um fator, com 10 níveis e com quatro repetições de cada nível. Porém, o delineamento não foi equilibrado, uma vez que se observaram diferentes números de cotilédones e cotilédones com hipocótilos nos diferentes bioensaios realizados aos diferentes extratos.

O tratamento dos resultados experimentais foi efetuado com recurso à ferramenta ANOVA (análise de variância), utilizando o programa R®. O efeito das modalidades nas variáveis experimentais estudadas, foi avaliado com um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Quando foram observadas diferenças significativas entre modalidades no teste ANOVA, procedeu-se à comparação de médias, através da realização do teste de Tukey HSD com o mesmo nível de significância.

Quando os pressupostos de análise de variância apresentavam algumas falhas, executou-se um teste não paramétrico, teste de Kruskal-Wallis, para fazer a comparação entre as modalidades.

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização da água de drenagem agrícola e das suspensões de *C. vulgaris* e *S. obliquus* obtidas por crescimento na água de drenagem agrícola

A água de drenagem agrícola utilizada para o crescimento das microalgas, após caracterização físico-quimicamente, revelou os seguintes valores descritos no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Caracterização da água de drenagem agrícola, utilizada no cultivo de microalgas, (média \pm DP, n=3).

| Parâmetro | Unidade | Resultado | Método analítico |
|------------------------------|------------------------------------|-------------------|---|
| pH | Escala Sorensen | 7,68 \pm 0,03 | Potenciômetro |
| CE | μ S cm | 1009,0 \pm 0,1 | Condutivímetro |
| Na | mg/L | 64,05 \pm 0,19 | Espetrometria de emissão ótica (OES) |
| K | mg/L | 8,41 \pm 0,19 | OES |
| Ca | mg/L | 107,24 \pm 0,77 | OES |
| Mg | mg/L | 17,22 \pm 0,07 | OES |
| P | mg/L | 0,07 \pm 0,00 | OES |
| S | mg/L | 11,99 \pm 1,24 | OES |
| Fe | mg/L | 0,02 \pm 0,00 | OES |
| Cu | mg/L | 0,010 \pm 0,001 | OES |
| Zn | mg/L | <0,01 | OES |
| Mn | mg/L | 0,008 \pm 0,001 | OES |
| B | mg/L | 0,032 \pm 0,001 | OES |
| Cl ⁻ | mg/L | 101,6 \pm 2,0 | Titulação (Método de Mohr) |
| CQO | mg O ₂ /L | 19,9 \pm 0,1 | Oxidação/Titulação |
| NO ₃ ⁻ | mg NO ₃ ⁻ /L | 55,56 \pm 0,59 | Analizador de fluxo contínuo, detecção UV |
| NH ₄ ⁺ | mg NH ₄ ⁺ /L | 2,36 \pm 0,03 | Analizador de fluxo contínuo, detecção UV |

As suspensões de *C. vulgaris* e *S. obliquus* foram utilizadas no ensaio de avaliação do potencial fertilizante, e num dos ensaios de bioestimulação, sem fazer a separação da biomassa das microalgas, o que pode ser feito por centrifugação. Esta opção é justificada pelo facto de se pretender exemplificar que, sem muitos custos para o agricultor, se pode fazer o tratamento e aproveitamento da água de drenagem agrícola, produzindo um produto de valor acrescentado – fertilizante orgânico ou bioestimulante. Ao fazer-se isso existe uma vantagem acrescida, podem ser aproveitados os nutrientes que possam ter sido suplementados à água de drenagem agrícola de modo a obter um meio de crescimento ótimo, e que, não tendo sido utilizados pelas microalgas no seu crescimento, ainda se encontram presentes na suspensão.

As suspensões foram analisadas relativamente aos parâmetros físico-químicos e pesticidas. Os resultados obtidos na caracterização físico-química das suspensões de microalgas (Quadro 4.2), indicam que o pH é ligeiramente alcalino, mas nunca ultrapassando pH 7,9. As suspensões apresentam valores elevados de condutividade elétrica, uma vez que no meio permanecem os nutrientes que não foram assimilados pelas microalgas. Essa salinidade pode ser benéfica, uma vez que alguns nutrientes podem ser utilizados pelas culturas, mas, também, pode ser responsável por um maior efeito inibitório no crescimento das plantas, tal como referido em Coppens *et al.* (2016), uma vez que algumas sementes ou plantas em crescimento são mais sensíveis à salinidade.

Em termos de teor de azoto, ambas as culturas, *C. vulgaris* e *S. obliquus*, apresentaram valores semelhantes (2 g N/L), destacando-se, ainda, o teor elevado em fósforo, superior no caso de *C. vulgaris*, e em potássio, superior no caso de *S. obliquus*.

Quadro 4.2 - Caracterização da água após o cultivo suspensão das culturas de microalgas (*C. vulgaris* e *S. obliquus*) (valores médios \pm DP, n=3).

| | <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Scenedesmus obliquus</i> |
|--|---------------------------|-----------------------------|
| pH | 7,30 \pm 0,01 | 7,84 \pm 0,02 |
| EC (μ S/cm) | 2603,0 \pm 2,5 | 2994 \pm 0,4 |
| Matéria Seca (g/L) | 3,92 \pm 0,01 | 3,17 \pm 0,02 |
| N _{total} (mg/L) | 2079 \pm 42 | 2005 \pm 24 |
| N _{total} (g/L) | 2,08 \pm 0,04 | 2,00 \pm 0,02 |
| P _{total} (mg/L) | 31,47 \pm 0,55 | 16,49 \pm 0,18 |
| P _{total} (mg P ₂ O ₅ /L) | 72,1 \pm 1,3 | 37,8 \pm 0,4 |
| K (mg/L) | 346,7 \pm 17,2 | 410,6 \pm 16,5 |
| K (mg K ₂ O/L) | 417,7 \pm 20,6 | 494,6 \pm 19,8 |
| Na (mg/L) | 248,9 \pm 10,0 | 301,7 \pm 9,8 |
| Ca (mg/L) | 96,7 \pm 5,3 | 24,3 \pm 0,6 |
| Mg (mg/L) | 18,0 \pm 1,3 | 11,0 \pm 0,5 |
| S (mg/L) | 69,0 \pm 5,0 | 72,3 \pm 1,7 |
| Fe (mg/L) | 4,58 \pm 0,37 | 1,96 \pm 0,85 |
| Cu (mg/L) | 0,062 \pm 0,004 | 0,032 \pm 0,005 |
| Zn (mg/L) | 0,130 \pm 0,032 | 0,067 \pm 0,031 |
| Mn (mg/L) | 0,357 \pm 0,009 | 0,102 \pm 0,017 |
| B (mg/L) | 0,089 \pm 0,017 | 0,144 \pm 0,005 |

Os herbicidas previamente quantificados na água de drenagem agrícola (Quadro 3.1) foram analisados nas suspensões de *C. vulgaris* e *S. obliquus*, tendo resultado como estando em concentrações abaixo do limite de quantificação. Este resultado está em concordância com os reportados por Hultberg *et al.* (2015), que observaram que o crescimento de *C. vulgaris* permitiu alcançar uma redução significativa de pesticidas existentes no meio. Por esse facto, podemos considerar que o crescimento das microalgas na água de drenagem agrícola constitui uma boa solução para o seu tratamento e para a redução da carga poluente emitida para o meio a partir das águas de drenagem agrícola.

4.2 Avaliação da suspensão de microalga como fertilizante orgânico

4.2.1 – Efeitos das suspensões de *C. vulgaris* e *S. obliquus* na planta

Crescimento

Na Figura 4.1, podemos observar o aspeto das alfaces que se desenvolveram com diferentes tipos de fertilização, 14 semanas após a transplantação, sendo evidente o efeito positivo da fertilização orgânica nas plantas de alface, relativamente ao controlo sem fertilização (C) e ao controlo de fertilização mineral (M).

A biomassa produzida pelas alfaces foi semelhante em todas as doses de aplicação (0,5, 1,0 e 2,5 g N) de ambas as microalgas (*C. vulgaris* e *S. obliquus*) pelo que, do ponto de vista da produção de biomassa, não seria necessário aumentar a dose. Para além disso, os resultados indicam que os 31 dias de aplicação prévia de suspensão, parecem ter sido suficientes para permitir uma mineralização das algas, capaz de disponibilizar nutrientes e responder às necessidades da cultura.

De facto, o que é aparente pela observação visual foi comprovado pelos resultados. A aplicação de fertilizante orgânico teve um efeito positivo e estatisticamente significativo na quantidade de biomassa produzida pelas alfaces, comparativamente com os controlos (C) e com o controlo mineral (M) (Figura 4.2 - A).



Figura 4.1 - Fim do ensaio com alface, *L. sativa* (var. Nadine), 14 semanas de crescimento após a transplantação.

Teores foliares de nutrientes

Relativamente à concentração de N no material vegetal, o controlo mineral (M) foi o que apresentou valores mais elevados, 36,4 g N/kg. A modalidade sem qualquer tipo de fertilização (C), foi a que apresentou as concentrações mais baixas, com 10,5 g N/kg.

A aplicação de fertilizante orgânico teve um efeito significativo no teor de N no material vegetal, com concentrações superiores ao controlo sem fertilização (C), e sem diferenças significativas entre as suspensões de *C. vulgaris* e *S. obliquus*, mesmo quando se aumentou a dose de microalga aplicada à planta. O baixo teor de N nas plantas da modalidade de controlo (C), foi um fator limitante ao crescimento da alface. No entanto, a elevada concentração de N, nas plantas no controlo mineral (M) (Figura 4.2 - B), não se traduziu numa maior quantidade de biomassa, antes pelo contrário, apesar das elevadas concentrações de N nas plantas com fertilização mineral, o seu crescimento foi menor do que por aplicação do fertilizante orgânico.

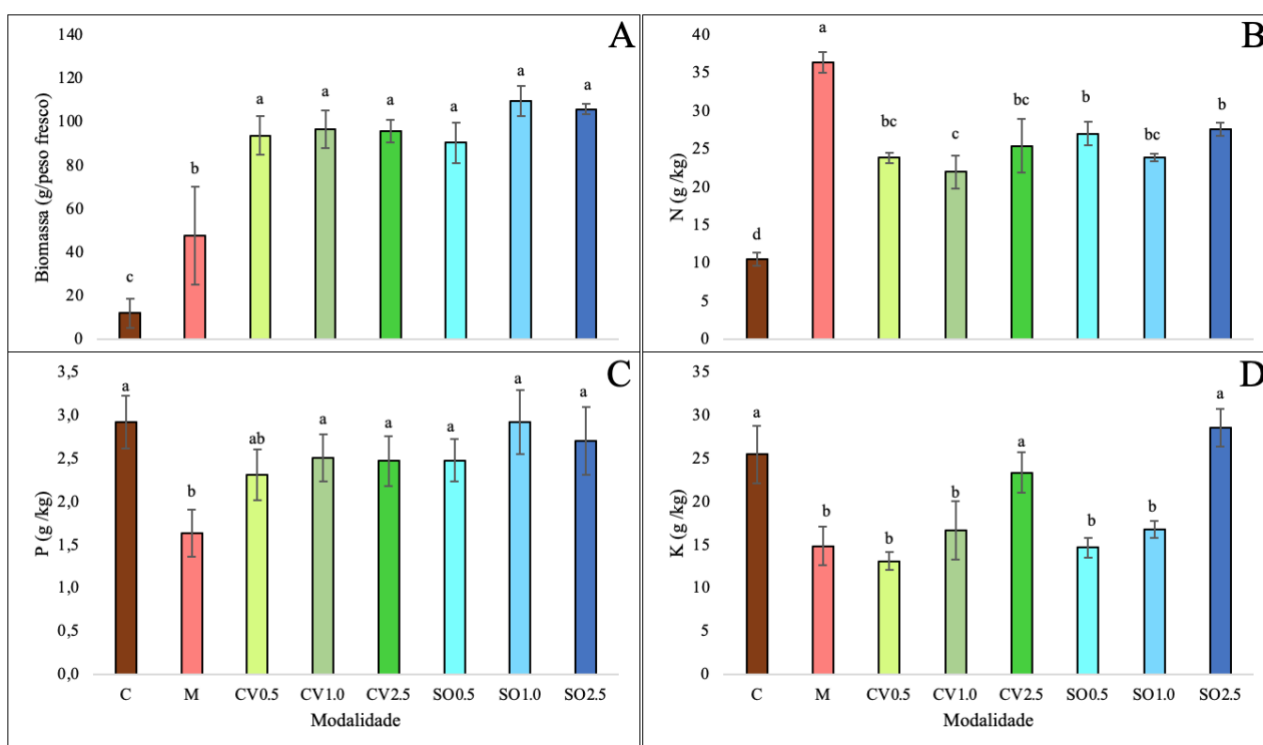


Figura 4.2 - Resultados aos parâmetros seguintes: (A) biomassa fresca da planta de alface (variedade Nadine); (B) N total; (C) teor total de P; e (D) teor total de K (média \pm desvio padrão, n= 4). As colunas marcadas com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.

No presente estudo, o teor de P nas plantas, não apresentou diferenças significativas entre as plantas da modalidade controlo (C) e as plantas das modalidades onde se aplicou o fertilizante orgânico. Assim, o teor de P extraível do solo, bem como o P fornecido pela aplicação de fertilizante orgânico sob a forma de microalgas, foram suficientes para suprimir as necessidades da cultura, sem a necessidade de aplicação de fertilizantes fosfatados minerais. Contudo, as alfaces cultivadas no controlo mineral (M), foram as que apresentaram menores concentrações de P (Figura 4.2 - C), o que poderá indicar que, nesta modalidade, o crescimento da alface pode ter sido limitado pelo facto da alface não ter tido uma quantidade suficiente P disponível.

Os macronutrientes secundários Ca e Mg apresentaram maiores concentrações nas plantas do controlo mineral (M), seguidas do controlo (C). As modalidades com suspensão de microalgas apresentaram os teores mais baixos, sem diferenças significativas entre si. Nestas menores concentrações de Ca e Mg nas modalidades onde se aplicou fertilização orgânica, esperar-se-ia que o facto de um maior crescimento, fosse devido a um fator de diluição para esses nutrientes. Contudo esse efeito de diluição, não aconteceu, pois no controlo mineral aplicou-se nitrato de amónio, não se aplicou nem cálcio nem magnésio, caso houvesse um efeito de diluição, estes nutrientes também deveriam ter baixado. Nas modalidades em que se usou o extrato de microalgas, o próprio já contém estes nutrientes. Provavelmente o que ocorreu, foi uma troca de iões no solo, em que uns foram mais absorvidos do que outros. As propriedades e características do solo, podem ter motivado também os resultados verificados no controlo sem nutrientes, tendo esta modalidade (C) o teor mais alto relativamente às modalidades com o extrato de algas.

No entanto, a concentração de S nas modalidades de microalgas CV2.5 e SO2.5, apresentou concentrações mais elevadas em relação aos controlos (C e M) e às doses de microalgas menores, o que pode indicar que a aplicação de microalgas promove uma maior assimilação desse nutriente, que aumenta para as doses maiores de microalgas (Quadro 4.3).

Quadro 4.3 - Quantificação de macronutrientes secundários (Ca, S e Mg) a na biomassa da alface (variedade Nadine) (média \pm desvio padrão, n= 4). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.

| Modalidade | Ca (g/kg) | Mg (g/kg) | S (g/kg) |
|------------|--|---|--|
| C | 18,9\pm1,5 b | 3.5\pm0,3 abc | 2,3 \pm 0,6 bc |
| M | 28,8\pm1,8 a | 4,1\pm0,1 a | 2,2 \pm 0,1 c |
| CV0.5 | 13,3 \pm 1,6 c | 3,4 \pm 0,4 bc | 2,2 \pm 0,0 c |
| CV1.0 | 11,1 \pm 1,3 c | 3,2 \pm 0,4 bc | 2,2 \pm 0,2 bc |
| CV2.5 | 12,8 \pm 1,8 c | 3,1 \pm 0,3 c | 2,8\pm0,2 ab |
| SO0.5 | 14,0 \pm 1,1 c | 3,8 \pm 0,2 ab | 2,3 \pm 0,1 bc |
| SO1.0 | 11,6 \pm 1,1 c | 3,4 \pm 0,2 bc | 2,4 \pm 0,1 bc |
| SO2.5 | 13,2 \pm 0,6 c | 3,1 \pm 0,3 bc | 3,0\pm0,4 a |

A aplicação de suspensão de *C. vulgaris* e *S. obliquus* em doses mais elevadas (2,5 g N/vaso), refletiu-se numa maior concentração dos elementos Fe e Na, nas planta de alface, com destaque para a aplicação da microalga *S. obliquus* (Quadro 4.4). Esse facto poderia ser esperado, pelo menos no que toca ao Fe, uma vez que esse elemento foi fornecido no meio de cultura das microalgas.

A concentração de micronutrientes B e Mn, não foi favorecida pela aplicação da suspensão de microalgas, sendo que as modalidades de controlo (C e M) originaram valores tendencialmente mais altos, que pode ter sido devido a um fator de concentração, uma vez que nessas modalidades os crescimentos foram significativamente menores.

Relativamente ao Zn e ao Cu, não se observaram diferenças significativas entre as diferentes modalidades, não tendo, assim, a suspensão tido qualquer influência sobre a concentração destes micronutrientes na planta de alface.

Quadro 4.4 - Quantificação de micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Na, Mn e B) na biomassa da alface (variedade Nadine) (média \pm desvio padrão, n= 4). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.

| Modalidade | Fe (mg/kg) | Na (g/kg) | B (mg/kg) | Mn (mg/kg) | Zn (mg/kg) | Cu (mg/kg) |
|------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| C | 93,8 \pm 19,3 b | 2,7 \pm 0,4 e | 30,6\pm0,4 a | 29,5 \pm 3,4 ab | 37,7 \pm 13,8 a | 24,0 \pm 15,9 a |
| M | 121,5 \pm 21,5 ab | 3,4 \pm 0,7 cde | 23,4 \pm 1,6 b | 36,7\pm5,4 a | 40,8 \pm 7,5 a | 18,7 \pm 10,5 a |
| CV0.5 | 113,5 \pm 14,8 ab | 3,2 \pm 0,3 de | 19,9 \pm 1,1 bc | 28,7 \pm 3,8 ab | 40,1 \pm 7,1 a | 15,4 \pm 6,6 a |
| CV1.0 | 126,3 \pm 35,9 ab | 4,8 \pm 0,8 bc | 20,5 \pm 3,5 bc | 27,7 \pm 3,0 b | 38,0 \pm 2,4 a | 18,8 \pm 12,4 a |
| CV2.5 | 128,1 \pm 20,0 ab | 6,8 \pm 1,1 a | 18,9 \pm 1,2 c | 26,4 \pm 2,0 b | 41,9 \pm 7,8 a | 12,5 \pm 1,1 a |
| SO0.5 | 128,4 \pm 31,1 ab | 4,6 \pm 0,6 bcd | 19,7 \pm 1,6 bc | 26,5 \pm 4,5 b | 37,3 \pm 3,9 a | 12,3 \pm 0,8 a |
| SO1.0 | 174,0\pm55,2 a | 5,1 \pm 0,2 bc | 18,4 \pm 0,9 c | 28,7 \pm 2,5 ab | 41,5 \pm 7,4 a | 12,7 \pm 1,2 a |
| SO2.5 | 107,5 \pm 0,8 ab | 8,3 \pm 0,7 a | 19,7 \pm 0,7 bc | 27,5 \pm 1,8 b | 43,2 \pm 10,6 a | 12,7 \pm 1,5 a |

Clorofila na planta

O valor medido de absorvância ótica nas folhas de alface, está relacionado com o nível de clorofila nos tecidos da planta, embora não nos forneça o valor real da sua concentração. As alfaces onde se aplicou uma adubação orgânica (CV0.5, CV1.0, CV2.5, SO0.5, SO1.0 e SO2.5), apresentaram níveis de clorofila semelhantes, e superiores aos valores registados no controlo (C), onde não se aplicou qualquer tipo de adubação (Figura 4.3). Estes valores estão de acordo com o descrito por Renuka *et al.* (2017), que também verificaram ser a modalidade de controlo (C) aquela que apresentou teores mais baixos de clorofila, quando comparada com as modalidades fertilizadas. Por outro lado, é interessante notar o facto de as alfaces fertilizadas com fertilizante mineral (M), terem sido aquelas onde o nível de clorofila medido instrumentalmente ter sido significativamente maior no final do ensaio, destacando-se das leituras de clorofila efetuadas nas modalidades fertilizadas organicamente a partir de 31 de maio. Estes resultados estão de acordo com os teores de N na alface (Figura 4.1 - B), um nutriente diretamente relacionado com os teores de clorofila na planta, os quais foram significativamente superiores no controlo mineral (M), relativamente às modalidades com

fertilização orgânica e, nestas, significativamente superiores ao controlo de solo sem fertilização (C).

Passados 44 dias, após a transplantação da planta, o nível de clorofila das alfaces com fertilização orgânica, que foi aumentando até aí, apresentou uma tendência decrescente. Este resultado pode ser devido ao facto de as plantas terem tido as suas necessidades supridas pela dose de fertilizante mineral que receberam em fundo (igual em todos os tratamentos, exceto em C), suficiente para as necessidades de N durante a primeira fase de crescimento. Possivelmente, as plantas onde se aplicou adubação orgânica estavam dependentes da mineralização da biomassa das microalgas para fornecer o restante N. Como as microalgas têm uma taxa de mineralização lenta, libertam o N lentamente e, de acordo com o enunciado em Ribeiro (2022), atuam como um fertilizante orgânico. Por esse motivo, a partir de certa altura, o aumento do nível de clorofila e de N na planta não conseguiram acompanhar os da modalidade de fertilização mineral. Os valores de clorofila estão de acordo com os valores obtidos para o teor de N no final do ensaio, com teor de N significativamente maior no controlo mineral (M) (Anexo IV).

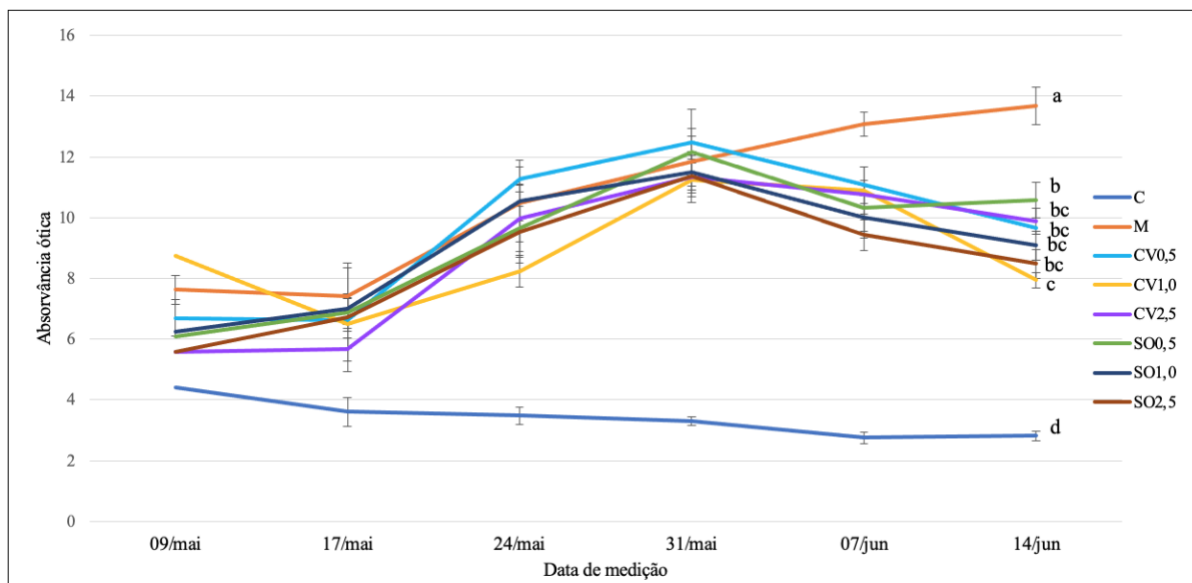


Figura 4.3 - Evolução da absorvância ótica nas folhas de alface nas cinco últimas semanas de crescimento (média \pm desvio padrão = 4). Os resultados medidos em 14 de junho marcados com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: controlo; M: controlo mineral; CV0,5, CV1,0 e CV2,5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0,5, SO1,0 e SO2,5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.

4.2.2 - Efeitos das suspensões de *C. vulgaris* e *S. obliquus* nos parâmetros físico-químicos do solo

Relativamente às propriedades físico-químicas do solo que se avaliaram, o pH referente à modalidade controlo mineral (M), diminuiu em relação às restantes (Figura 4.4 - A). O nitrato de amónio é um adubo acidificante, por isso a diminuição do pH. Todavia, o decréscimo do valor do pH para 7,89 não foi muito significativo e, em todas as modalidades, o solo permaneceu alcalino, com valores entre 7,89 e 8,40. O contrário foi observado na avaliação da condutividade elétrica (CE), na modalidade onde se aplicou o fertilizante mineral os valores de CE aumentaram de forma muito acentuada (para 640 $\mu\text{S}/\text{cm}$), comparativamente aos restantes que variaram entre 166 e 265 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Registou-se que a aplicação da dose mais elevada da biomassa de microalga SO, levou a um aumento significativo nos valores de CE, relativamente ao controlo (Figura 4.4 - B). Contudo, estes valores foram apenas 1,8 vezes maiores do que o controlo. Tal como demonstrado, o uso de um fertilizante orgânico, neste caso biomassa de microalgas CV e SO, em doses que suprimam as necessidades nutricionais das plantas, é uma alternativa eficaz aos fertilizantes minerais na prevenção do aumento da salinização secundária do solo.

No presente estudo, as matérias orgânicas (MO) dos solos das diferentes modalidades variaram entre 1,6 e 2,0%. A aplicação de suspensão de microalga *S. obliquus* resultou em teores mais elevados de MO, comparativamente com a *C. vulgaris*, e as modalidades de controlo (C e M) (Figura 4.4 - C). A mineralização lenta da biomassa e uma única aplicação, podem ser possíveis razões para não se observar um impacto maior neste parâmetro. No entanto, os valores obtidos para a biomassa de microalga *S. obliquus* revelaram-se promissores, pois parece haver uma tendência de aumento do teor de matéria orgânica no solo.

As suspensões de microalga *S. obliquus* (SO1.0 e SO2.5) disponibilizaram N ao solo (Figura 4.4 - D) em maiores concentrações, tal como o controlo mineral (M). Relativamente ao crescimento da alface (avaliado pela biomassa), a utilização da suspensão de microalga permitiu um maior crescimento. Comparativamente com o controlo mineral (M) e as modalidades SO1.0 e SO2.5, a biomassa apresenta resultados mais baixos em M, tendo a modalidade M teores de N disponíveis muito semelhantes às modalidades SO1.0 e SO2.5 (Quadro 3.3).

Quanto ao P extraível no solo, a aplicação de suspensão de microalgas, antes da transplantação, não influenciou os valores de P extraível no solo, tal como não influenciou as

concentrações no material vegetal, dado que não se observaram diferenças significativas entre modalidades (Figura 4.4 - E).

Ao contrário do observado para P extraível no solo, a concentração de K extraível no solo foi afetada pela dose de suspensão de microalgas (Figura 4.4 - F). Nas modalidades com menores concentrações de suspensão de microalgas (CV0.5, CV 1.0, SO0.5 e SO1.0), observou-se uma menor concentração de K extraível, quando comparada com as modalidades com dose mais alta de suspensão de algas (CV2.5 e SO2.5). Inicialmente, no solo tinha-se 89,0 mg K₂O/kg e nas modalidades com menores concentrações de suspensão de microalgas (CV0.5, CV 1.0, SO0.5 e SO1.0) obtiveram-se concentrações entre 54,5 e 56,8 mg K₂O/kg. Na modalidade C e nas modalidades de doses mais elevadas de ambas as microalgas (CV2.5 e SO2.5), observaram-se as concentrações de K mais elevadas, 66,1, 71,2 e 73,1 mg K₂O/kg, respetivamente. O teor de K extraível no solo, influenciou a concentração de K no material vegetal. A utilização de doses mais baixas de suspensão de microalgas, levou a concentrações de K também mais baixas na biomassa de alface. O K, tal como o P, é nutriente limitante ao crescimento da planta. A modalidade onde se aplicou a suspensão de microalga *S. obliquus*, com a concentração 2,5 g N/vaso, originou um teor de K extraível no solo superior. Logo, forneceu este nutriente em maior quantidade do que as restantes modalidades.

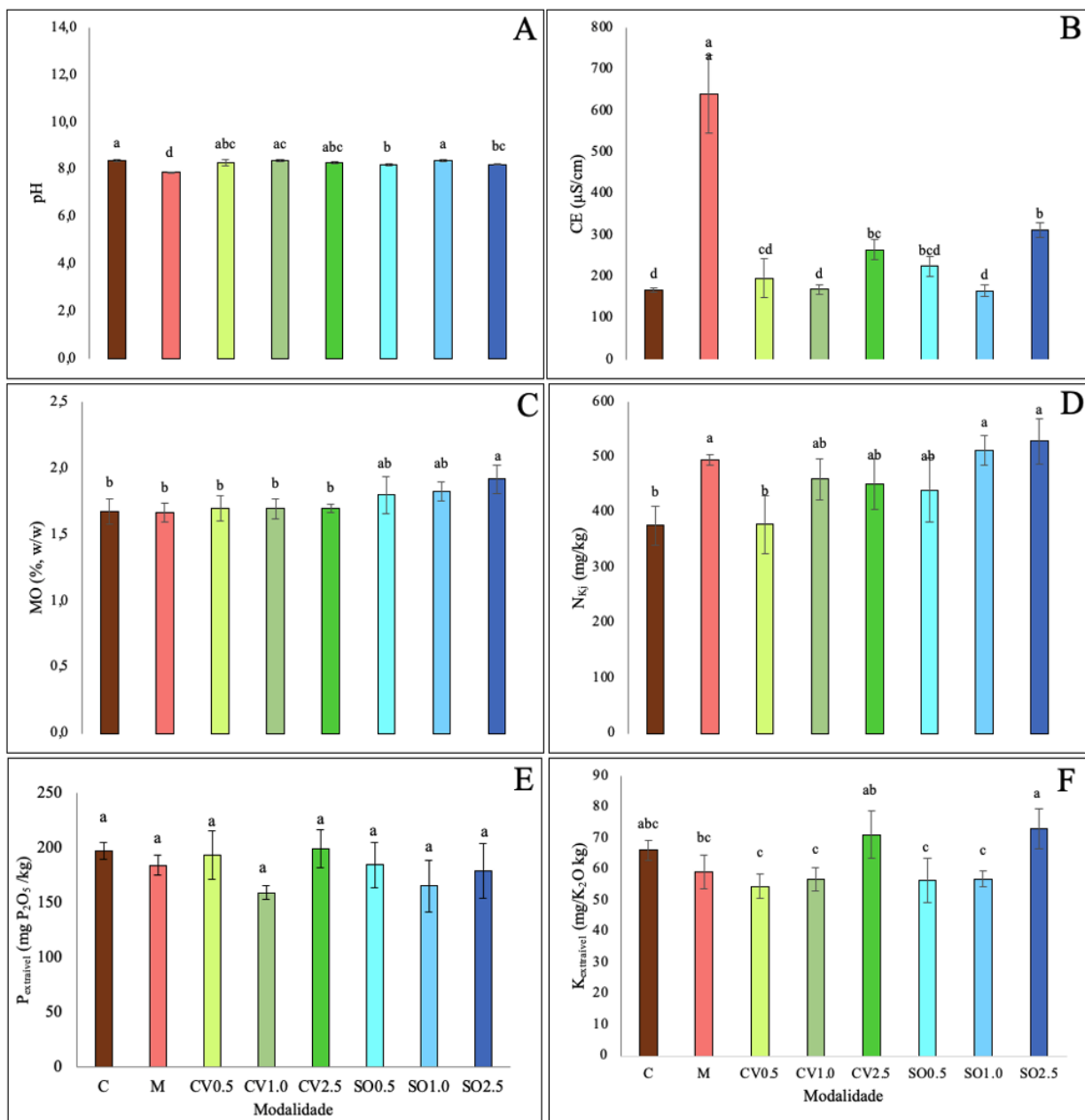


Figura 4.4 - Resultados obtidos às amostras de solo: (A) pH; (B) condutividade elétrica (CE); (C) matéria orgânica (MO); (D) N Kjeldahl; (E) P extraível; e (F) K extraível (média \pm desvio padrão, n= 4). As colunas marcadas com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: controlo; M: controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.

As concentrações no solo de microelementos extraíveis, como o Fe, Cu, Zn, B, e a capacidade de troca catiónica (CTC), não apresentaram diferenças significativas entre as modalidades. Apenas o Mn extraível apresentou concentrações inferiores nas modalidades CV2.5, SO0.5 e SO2.5, mas com um desvio padrão elevado (Quadro 4.5).

Quadro 4.5 - Concentração de micronutrientes extraíveis (Fe, Mn, Cu, Zn e B) no solo e da capacidade de troca catiónica (CTC) (média \pm desvio padrão, n= 4). C: controlo; M controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.

| Modalidade | Fe (mg/kg) | Cu (mg/kg) | Zn (mg/kg) | B (mg/kg) | CTC (cmol(+)/kg) | Mn (mg/kg) |
|------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--|
| C | 133,9 \pm 5,3 a | 2,78 \pm 0,09 a | 4,97 \pm 0,34 a | 0,29 \pm 0,01 a | 19,6 \pm 0,5 a | 72,68 \pm 7,77 a |
| M | 124,8 \pm 4,6 a | 2,67 \pm 0,05 a | 4,46 \pm 0,32 a | 0,25 \pm 0,01 ab | 19,3 \pm 1,1 a | 56,68 \pm 3,04 ab |
| CV0.5 | 129,9 \pm 2,9 a | 2,89 \pm 0,09 a | 5,02 \pm 0,12 a | 0,23 \pm 0,02 ab | 19,7 \pm 0,3 a | 57,22 \pm 1,74 ab |
| CV1.0 | 134,9 \pm 6,1 a | 2,88 \pm 0,17 a | 4,50 \pm 0,24 a | 0,21 \pm 0,05 a | 19,6 \pm 0,4 a | 61,54 \pm 1,56 ab |
| CV2.5 | 113,4 \pm 18,0 a | 2,58 \pm 0,17 a | 4,19 \pm 0,32 a | 0,21 \pm 0,02 a | 19,8 \pm 0,4 a | 51,48\pm12,97 b |
| SO0.5 | 118,5 \pm 17,3 a | 2,88 \pm 0,25 a | 4,64 \pm 0,82 a | 0,26 \pm 0,04 ab | 20,0 \pm 0,3 a | 50,26\pm9,97 b |
| SO1.0 | 133,4 \pm 7,7 a | 2,88 \pm 0,14 a | 4,31 \pm 0,21 a | 0,25 \pm 0,03 ab | 19,8 \pm 0,6 a | 60,48 \pm 3,97 ab |
| SO2.5 | 119,1 \pm 17,0 a | 2,80 \pm 0,20 a | 4,20 \pm 0,41 a | 0,27 \pm 0,02 ab | 20,2 \pm 1,0 a | 51,06\pm9,40 b |

4.2.3 - Efeitos das suspensões de *C. vulgaris* e *S. obliquus* nas propriedades bioquímicas do solo

A atividade da desidrogenase é um indicador da atividade microbiana no solo, uma vez que mede a atividade de enzimas que ocorrem em microrganismos vivos (Tabatabai, 1994).

Os resultados obtidos, para o valor médio da atividade da desidrogenase, são semelhantes aos obtidos por Renuka *et al.* (2017), em que a utilização de biomassa de microalgas exibiu um aumento na atividade da desidrogenase em relação à testemunha, e obteve também que maiores doses de biomassa de microalgas, permitiram uma maior atividade da desidrogenase. Nos vasos onde foi aplicada a suspensão de microalgas, foi evidente o aumento na atividade da desidrogenase com o aumento da dose de aplicação de *C. vulgaris* e *S. obliquus*, em relação aos tratamentos não inoculados (Figura 4.5). Porém, os resultados só foram significativamente superiores para a maior dose de aplicação de *S. obliquus* (2,5 mg

N/vaso). Este indicador evidenciou, de forma clara, a melhoria nas propriedades do solo, em comparação com o solo controle (C) e com o controle mineral (M). No controle mineral (M), a média da atividade de desidrogenase foi de 0,108 $\mu\text{g TPF/g.MS.h}$ e nas maiores doses (2,5 g N/vaso) de biomassa de *C. vulgaris* e *S. obliquus* os valores foram, 0,353 e 0,420 $\mu\text{g TPF/g.MS.h}$, respetivamente.

Por isso, é possível dizer que o uso deste fertilizante orgânico permitiu a melhoria de uma propriedade do solo que é um bom indicador da sua saúde – a atividade microbiana, avaliada de forma indireta através da medição da atividade da desidrogenase.

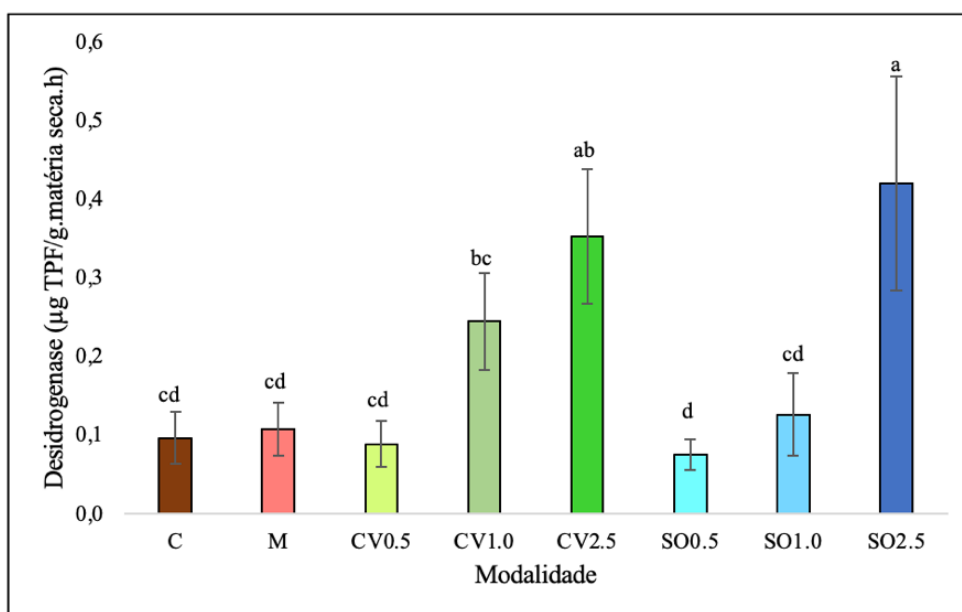


Figura 4.5 - Efeitos dos tratamentos na atividade da desidrogenase do solo (média \pm desvio padrão, n= 4). As colunas marcadas com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: controle; M: controle mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com suspensão de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com suspensão de *S. obliquus*.

4.3 Avaliação do potencial bioestimulante de *C. vulgaris* e *S. obliquus* utilizando sementes de alfaca

Foi avaliado o potencial bioestimulante de biomassa de *C. vulgaris* e *S. obliquus*, obtida por crescimento na água de drenagem agrícola, comparando a sua atividade semelhante com os seguintes reguladores de crescimentos (controle positivo): ácido giberélico (GA_3), efeito semelhante à giberelina, que estimula a germinação; ácido indol-3-acético (IBA), que produz um efeito semelhante à auxina, estimulando o enraizamento e indução do alongamento da raiz;

e citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) que produz um efeito semelhante à citocinina, estimulando a expansão da raiz do cotilédone.

O potencial bioestimulante da biomassa de *C. vulgaris* e *S. obliquus* foi avaliado sujeitando o material vegetal a diferentes formas de exposição às microalgas, conforme foi descrito em 3.4.2:

(A) Suspensão original de microalgas, no meio de crescimento que foi usado para a sua produção, com as características descritas em 4.1;

(B) Suspensão do extrato de microalgas em água desionizada, substituindo o meio original por água desionizada, após centrifugação;

(C) Suspensão original das microalgas submetida a lise celular por aplicação de ultrassons;

(D) Suspensão do extrato de microalgas em água desionizada após centrifugação, seguida de lise celular por aplicação de ultrassons à suspensão de microalgas.

Apesar de ter sido justificado o interesse da utilização da suspensão de microalgas sem nenhum tipo de processamento (estratégia A) – para que o agricultor tenha menores gastos nas operações de separação da biomassa das microalgas, e para que se utilize os nutrientes ainda existentes em suspensão – há duas situações que será interessante avaliar, em alternativa a esta estratégia: até que ponto é que a salinidade do meio de crescimento das microalgas poderá afetar o potencial bioestimulante, e, por isso, foi feita uma separação do extrato das microalgas e a sua ressuspensão em água desionizada (estratégia B); e avaliar até que ponto é que as substâncias e compostos que promovem a bioestimulação, são mais eficazes no seu papel se forem libertadas da células da microalga, promovendo a lise celular anterior à exposição do material vegetal à microalga (estratégias C e D), o que foi experimentado por aplicação de ultrassons à suspensão original da microalga (estratégia C), ou à sua ressuspensão em água desionizada (estratégias D).

4.3.1 – Avaliação do efeito semelhante à giberelina - germinação

Foi avaliado o efeito na germinação das sementes de alface expostas às diferentes suspensões de microalgas, em diferentes concentrações, e ao GA₃, como controlo positivo do efeito giberélico, também em diferentes concentrações (Figura 4.6). Neste caso, o efeito bioestimulante foi avaliado diretamente na germinação das sementes de alface. Foi calculado o Índice de Germinação (IG) em cada um dos tratamentos, sendo os valores obtidos apresentados no Quadro 4.5. Como se pode ver pelos resultados apresentados, não se

verificaram diferenças significativas entre a germinação no controlo de água desionizada (C) e as concentrações crescentes dos controlos positivos o que, de um modo geral evidencia que não houve um efeito estimulante da germinação das sementes de alface, mesmo quando foram expostas ao GA₃, mas também não ocorreu um efeito inibitório da germinação. Por outro lado, quando as sementes foram expostas a algumas das concentrações das suspensões de microalgas, observaram-se efeitos inibitórios, com valores de IG significativamente menores do que nos controlos.

Utilizando a suspensão original de microalgas Figura 4.6 - A, constata-se que as doses de CV2.5 e SO1.0, têm um efeito inibitório na germinação, contudo, sem diferenças significativas por comparação com os controlos positivos. Onde se observaram diferenças significativas foi para a dose mais alta de *S. obliquus*, SO2.5 onde o efeito inibitório é significativo (IG = 40%, Quadro 4.5). Esse mesmo padrão de variação também se observou no caso da germinação das sementes expostas à suspensão de microalga original depois de exposta aos ultrassons (Figura 4.6 - C), em que se verificaram diferenças significativas, e um efeito inibitório na germinação, para no tratamento SO2.5 (IG = 78%, Quadro 4.5). Para a suspensão do extrato de microalgas em água desionizada (Figura 4.6 - B), não se verificaram diferenças significativas entre tratamentos, e quando comparada com os controlos. Resultados semelhantes foram obtidos por Navarro-Lopez *et al.* (2020), tendo concluído que quando se utiliza a suspensão original, em contacto direto com a semente, esta suspensão não exerce um efeito significativo no índice de germinação de sementes.

Quando se submeteu a suspensão aos ultrassons (Figura 4.6 - C), alcançaram-se os melhores resultados entre as diferentes suspensões, para ambas as microalgas, sendo que em SO0.5 o IG foi de 95%. Contudo, para SO2.5, como já foi dito, o IG foi de 78%, evidenciando uma inibição significativa (Quadro 4.6). Contrariamente ao obtido por Navarro-Lopez *et al.* (2020), estes resultados não foram melhores que as modalidades de controlo.

A suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons (Figura 4.6 - D), foi o tratamento onde se observaram maiores inibições em alguns dos tratamentos com microalgas, com diferenças significativas relativamente aos controlos. Nestes casos, para além de aumentar a concentração de aminoácidos e poliaminas, possivelmente, foram libertados inibidores que prejudicaram a germinação das sementes em alguns dos casos (Tarakhovskaya *et al.*, 2007). A lise celular que se realizou, em termos de libertação de nutrientes é importante (para a fertilização), mas em termos hormonais (efeito bioestimulante), não é benéfica. Só na presença da suspensão de maiores concentrações de *C. vulgaris* e *S. obliquus*, é que se obtiveram IG's, mais elevados, o que pode indicar a presença de moléculas

com atividade biológica, como as giberelinas, relevantes no início da germinação de sementes e no alongamento do caule.

No entanto, o controlo não é igual em todos os bioensaios, o que sugere que erros experimentais possam ter ocorrido.

De facto, considerando os resultados obtidos, verifica-se que o efeito das giberelinas não se verificou nestas suspensões de microalgas, para estas sementes. As sementes de alface são sementes que não são recalcitrantes, isto é, que não são difíceis de germinar, acabando por germinar ao fim de 48h. Muito possivelmente, se se tivesse utilizado sementes recalcitrantes, o efeito do ácido giberélico, caso existisse, seria mais evidente, permitindo obter maiores IG's quando na presença dos controlos positivos e das suspensões de microalgas.

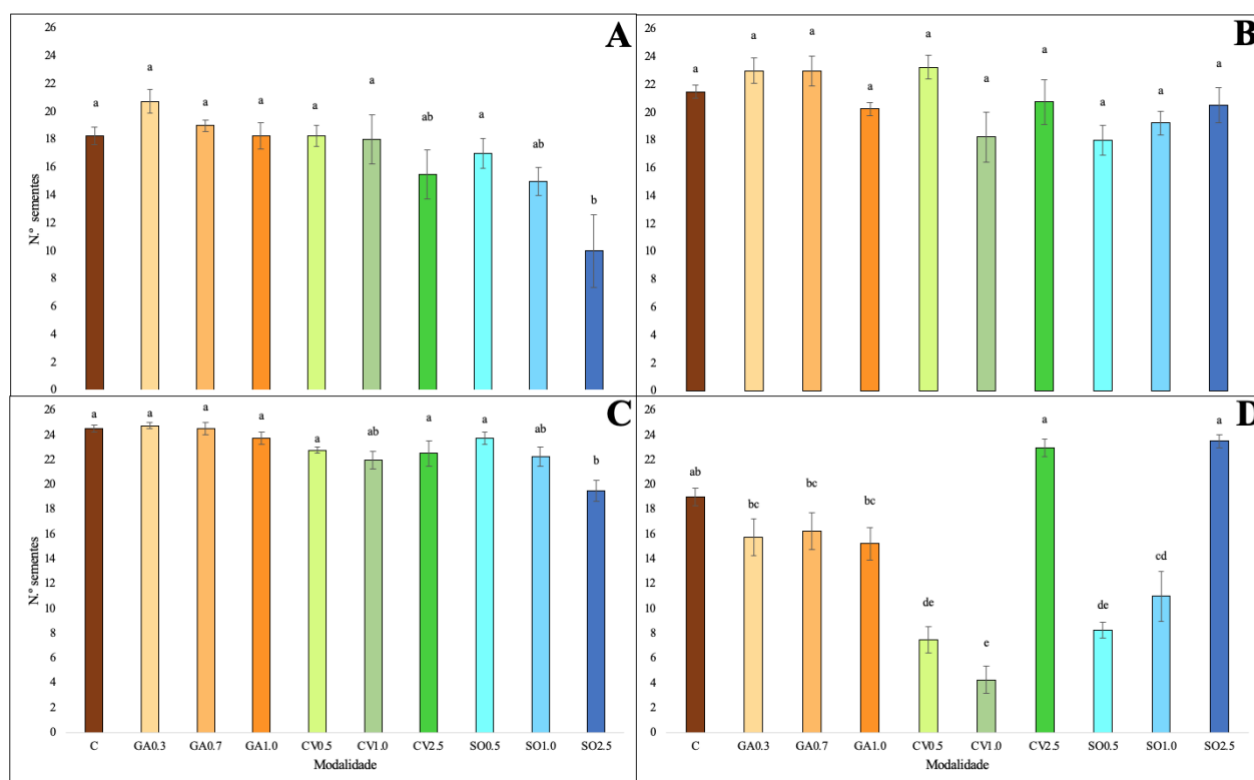


Figura 4.6 - Avaliação da germinação de sementes de *L. sativa* - efeito semelhante à giberelina (média \pm desvio padrão da média). Colunas marcadas com a mesma letra não apresentam resultados significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). A – suspensão de microalgas; B – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada; C – suspensão de microalgas submetida a ultrassons, e D – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons. C: controlo com água desionizada; GA0.3, GA0.7 e GA1.0: controlo positivo utilizando GA₃ em diferentes concentrações; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *S. obliquus*.

Quadro 4.6 - Índice de germinação (média, n= 4).

| Tipo de suspensão | Índice de Germinação (%) | | | | | | | | | |
|--|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|-----------|
| | C | GA | | | CV | | | SO | | |
| | | 0.3 | 0.7 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 2.5 | 0.5 | 1.0 | 2.5 |
| A – suspensão de microalgas | 73 | 83 | 76 | 73 | 73 | 72 | 62 | 68 | 60 | 40 |
| B – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada | 86 | 92 | 92 | 81 | 93 | 73 | 83 | 72 | 77 | 82 |
| C – suspensão de microalgas submetida a ultrassons | 98 | 99 | 98 | 95 | 91 | 88 | 90 | 95 | 89 | 78 |
| D – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons | 76 | 63 | 65 | 61 | 30 | 17 | 92 | 33 | 44 | 94 |

4.3.2 - Avaliação do efeito semelhante à auxina – formação de raízes

Os quatro gráficos presentes na Figura 4.7, apresentam os resultados obtidos no enraizamento e na indução do alongamento da raiz, um efeito que pode ser estimulado pela auxina. Ao utilizar-se a suspensão de microalgas, Figura 4.7 - A, observa-se que o IBA teve resultados ligeiramente superiores ao controlo nas três concentrações. Quando comparado com os controlos positivos e negativo, conclui-se que esta suspensão não apresentou um efeito bioestimulante como auxina, isto, pode ter sido provocado pela elevada condutividade elétrica da suspensão das microalgas (>2 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Na Figura 4.7 - B, relativo à suspensão do extrato de microalgas em água desionizada, o controlo negativo e a auxina de síntese (IBA) apresentaram melhores valores de crescimento, comparativamente com as microalgas; uma hipótese para explicar tal resultados será o facto de ao ressuspender se ter perdido elementos/compostos essenciais no crescimento das raízes. A utilização deste extrato não apresentou efeitos bioestimulantes evidentes, e, existem diferenças significativas entre as modalidades.

Outros estudos já realizados podem explicar o efeito inibitório em concentrações mais elevadas (CV2.5, SO1.0 e SO2.5). Niemann & Dörffling (1980) referiram que, alguns compostos bioativos, como o ácido abscísico (ABA), causam a supressão do crescimento da parte aérea, como ácido lunular e outros compostos não identificados, evitando o crescimento da planta nos bioensaiois.

Na Figura 4.7 - C, referente à suspensão de microalgas submetida a ultrassons, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes modalidades. Logo, neste estudo, para esta suspensão e para este tipo de semente, não se registou um efeito bioestimulante.

Na utilização de suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons, Figura 4.7 – D, a suspensão de microalga *C. vulgaris* em doses mais elevadas, manifestou mais o efeito da presença de auxinas, embora sem diferenças significativas. Com a utilização da suspensão de *S. obliquus*, quanto maior a concentração da suspensão (SO1.0 e SO2.5), o efeito da auxina (desenvolvimento radicular) obtido diminuiu embora, mais uma vez, sem diferenças significativas relativamente aos controlos positivos.

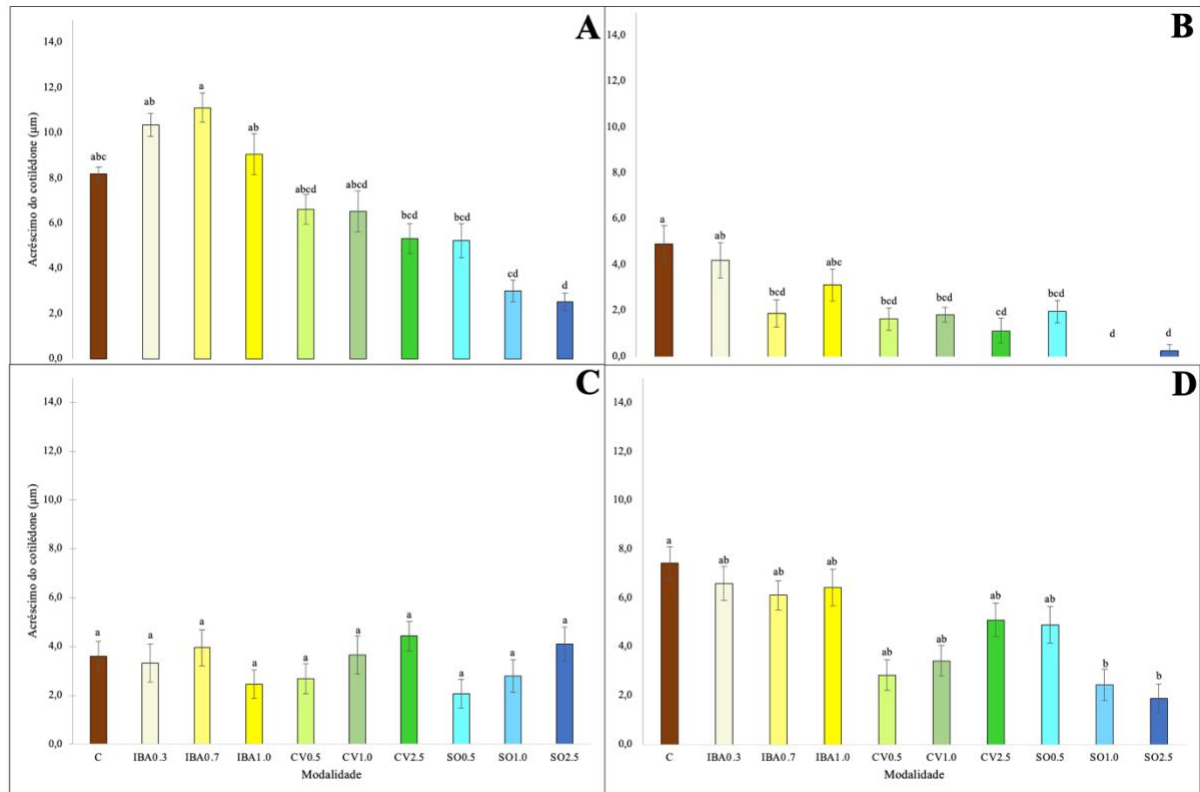


Figura 4.7 - Avaliação do enraizamento e indução do alongamento da raiz, após um período de 7 dias. (média \pm desvio padrão da média). Colunas marcadas com a mesma letra não apresentam resultados significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). A – suspensão de microalgas; B – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada; C – suspensão de microalgas submetida a ultrassons, e D – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons. C: controlo com água desionizada; IBA0.3, IBA0.7 e IBA1.0: controlo positivo utilizando IBA em diferentes concentrações; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *S. obliquus*.

4.3.3 - Avaliação do efeito semelhante à citocinina - expansão da raiz do cotilédone

Relativamente à avaliação de expansão da raiz do cotilédone de alface, os resultados obtidos para as 4 diferentes suspensões de microalgas encontram-se na Figura 4.8.

As suspensões originais de *C. vulgaris* e *S. obliquus*, Figura 4.8 - A, não revelaram a presença de atividade semelhante à citocinina, não tendo havido diferenças significativas entre tratamentos. Onde se verificou um maior crescimento foi no controlo positivo (BAP) de concentração 1,0 mg/L, cerca 0,10 mm², o que, mesmo assim, representa uma área de crescimento muito pequena. O mesmo se verificou para a suspensão do extrato de microalgas em água desionizada (Figura 4.8 - B), sem diferenças significativas entre tratamentos. Para, a suspensão de microalgas submetida a ultrassons (Figura 4.8 - C), o efeito foi visivelmente inibitório, havendo desidratação das plantas expostas à suspensão. Pelos resultados podemos concluir que, a aplicação de ultrassons às suspensões, com libertação do material celular (total ou parcial, não foi avaliado), não foi benéfica em termos de efeitos hormonais. Nesta suspensão, provavelmente aumentou-se a CE, o que provoca o aumento da tensão osmótica e as células retraíram-se, originado assim a plasmólise celular.

No extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons (Figura 4.8 - D), verifica-se uma diminuição da CE do meio, pela ressuspensão da biomassa em água desionizada. Essa diminuição da CE leva à obtenção de melhores resultados do que os obtidos só com a suspensão, ou com a suspensão do extrato em água desionizada.

Ao realizar a ressuspensão, a suspensão de *C. vulgaris* passou de 2 603 µS/cm para 113 µS/cm e a de *S. obliquus* de 2 994 µS/cm para 83 µS/cm. O acréscimo de tamanho registado na folha de alface, para esta suspensão (SO0.5 e SO1.0), foi superior às restantes suspensões, mas não superior aos controlos positivos e negativo. As condições no decorrer do ensaio foram sempre semelhantes, contudo as modalidades de controlo, não o são. Poderão ter ocorrido erros experimentais, difíceis de quantificar e controlar. Por exemplo, a dificuldade em controlar a temperatura no laboratório pode ter sido uma fonte de erro, uma vez que os primeiros ensaios foram realizados em maio de 2022, com um temperatura média de 19,9°C, e os últimos nos primeiros 12 dias de julho, com uma temperatura media de 32,9°C.

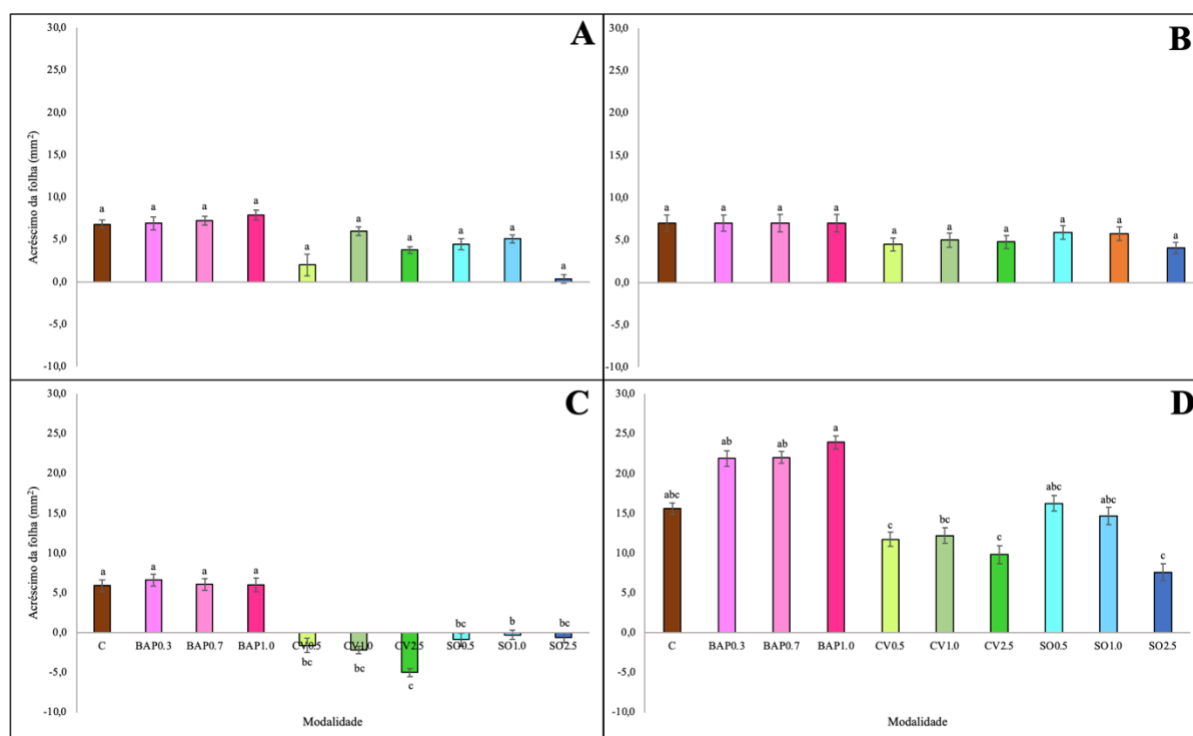


Figura 4.8 - Avaliação da atividade da BAP (expansão da raiz do cotilédone), após um período de 7 dias. (média \pm desvio padrão da média). Colunas marcadas com a mesma letra não apresentam resultados significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). A – suspensão de microalgas; B – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada; C – suspensão de microalgas submetida a ultrassons, e D – suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons. C: controlo com água desionizada; BAP0.3, BAP0.7 e BAP1.0: controlo positivo utilizando BAP em diferentes concentrações; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: bioensaios com diferentes concentrações de *S. obliquus*.

De um modo geral, a suspensão de microalgas poderá apresentar algum efeito bioestimulante, para as sementes de alface ou para outras. Contudo, neste estudo, não foi possível demonstrar esse efeito, ou ele foi pouco evidenciado. A escolha de outra semente, como pepino ou couve, poderia ter dado resultados mais evidentes do efeito bioestimulante, como o sugerido por Navarro-Lopez *et al.* (2020). Porém, a opção pelas sementes de alface foi feita de modo a utilizar sementes da mesma planta utilizada no ensaio do efeito fertilizante da biomassa da microalga, o que permitiria, eventualmente, relacionar os resultados obtidos.

Os resultados mais favoráveis para a atividade de giberelinas foram observados pela utilização da suspensão do extrato de microalgas em água desionizada. Para as auxinas, os

melhores resultados foram obtidos para a suspensão de microalgas original, enquanto para as citocininas os melhores resultados foram obtidos para a suspensão do extrato de microalgas em água desionizada submetida a ultrassons, onde a salinidade de meio é menor e o material celular se encontra disponível.

Porém, como já foi referido, o ideal seria a utilização da suspensão de microalgas tal e qual, isto porque assim não seria necessário qualquer processo que representasse gastos energéticos. O que do ponto de vista ambiental, e, para utilização pelo agricultor seria mais positivo, resultando em menores custos e maior rendibilidade do produto.

5. Conclusão

As microalgas são eficientes a recuperar nutrientes e água das águas de escorrência agrícola, neste caso de um campo de milho, conseguindo assim, promover um uso mais sustentável desses recursos na agricultura. Foi possível cultivar microalgas na água de escorrência agrícola do campo de milho, e inerente a isso, a quantidade de nutrientes presente foi diminuída, bem como a de pesticidas, tendo permitido a degradação dos herbicidas quantificados até concentrações não detetadas.

Com a aplicação do fertilizante orgânico de microalgas, 28 dias antes da transplantação das alfaces, foi possível substituir 50% da adubação mineral de N, com uma produção de biomassa significativamente maior, cerca de duas vezes. Com a liberação lenta de nutrientes, através da mineralização das microalgas (*C. vulgaris* e *S. obliquus*), foi possível evitar que a salinidade do solo aumentasse, sendo que na modalidade de controlo mineral (M) (onde se aplicou nitrato de amónio) a condutividade elétrica foi três vezes maior, comparativamente com as restantes.

Relativamente ao meio onde se cultivou as alfaces (solo), a qualidade do mesmo foi melhorada quando se aplicou a maior dose (2,5 g N/vaso) de ambas as microalgas. Pois, a atividade da enzima desidrogenase, foi significativamente maior do que a presente na modalidade de controlo e de controlo mineral (M). A utilização da suspensão de *S. obliquus*, com uma concentração de 2,5 g N/vaso, apresentou resultados interessantes do ponto de vista da disponibilização de P e K, e conseqüentemente, na presença desses nutrientes no material vegetal.

Em termos de efeito bioestimulante, o efeito giberélico não foi muito evidenciado, usando a suspensão de microalgas e a sementes de *L. sativa*, sugerindo-se que em ensaios posteriores se utilizem sementes diferentes, algumas já descritas na literatura. Em futuros estudos, a utilização de sementes recalcitrantes será uma boa alternativa. A suspensão que se traduziu em “melhores” resultados foi a suspensão do extrato de microalgas em água desionizada, possivelmente devido à sua menor salinidade, que pode ser prejudicial nas fases iniciais de desenvolvimento da planta.

Na avaliação da presença do efeito-semelhante da auxina, os resultados também não foram muito evidentes, sendo que em alguns casos, a suspensão até teve um efeito inibidor. A suspensão da microalga *C. vulgaris* foi a que obteve melhores resultados, nas doses de 0,5 e 1,0 g de N.

Em relação ao efeito-semelhante da citocinina, a maior expansão da raiz do cotilédone deu-se nas doses mais baixas (0,5 e 1,0 g N) da microalga *S. obliquus*, com a utilização da suspensão do extrato de microalga em água desionizada submetida a aplicação de ultrassons. Sendo estes resultados promissores em relação aos restantes.

A introdução de microalgas na agricultura sob a forma de fertilizante orgânico, biofertilizantes, bioestimulantes ou até mesmo biopesticidas, é uma abordagem promissora para reduzir ou mesmo substituir o uso de produtos químicos sintéticos. Mais estudos, e em escalas superiores, são essenciais para otimizar o processo, sem comprometer a produtividade e o rendimento das culturas, havendo ainda a capacidade de, no processo de produção de microalgas, se realizar o tratamento de águas residuais. Com mais investimento e desenvolvimento nesta área, será possível instalar em pontos estratégicos de descarga de águas residuais, lagoas onde se produzam microalgas, ou lagoas onde a carga poluente das águas é drasticamente diminuída antes de se efetuar uma descarga. Este processo tem a capacidade de atenuar alguns impactes, que o setor agrícola pode ter no ambiente.

6. Referências bibliográficas

- Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo Paredes, P.; Torres, E.; Herrero, C.; Microalgas: cultivo y aplicaciones. A Coruña: Universidade, Servizo de Publicacións; 1995; ISBN: 978-84-97497-69-5.
- Abdelaziz, A.E.M.; Leite, G.B.; Hallenbeck, P.C. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply. *Environmental Technology*. 34:1783-1805; 2013; doi: 10.1080/09593330.2013.827748.
- Agência Europeia do Ambiente - <https://www.eea.europa.eu/archived/archived-content-water-topic/water-pollution/diffuse-sources>, acessado a 27/07/2022.
- Ahluwalia, S. S.; Goyal, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource technology*, 98(12), 2243-2257; 2007; doi: 10.1016/j.biortech.2005.12.006.
- Ali, S.; Peter, A.P.; Chew, K.W.; Munawaroh, H.S.H.; Show, P.L. Resource recovery from industrial effluents through the cultivation of microalgae: A review. *Bioresource Technology*. 337; 2021; doi: 10.1016/j.biortech.2021.125461.
- Alvarenga, P.; Martins, M.; Silva, E.; Fragoso, R.; Ribeiro, H.; Mota, M.; Cardoso, H.; Silva, J.L. Microalgae production with runoff water from maize cultivation as a strategy to improve water and nutrients circularity in intensive agriculture. Poster apresentado na 1ª Edição das “Jornadas Científicas da Universidade de Lisboa”; Reitoria da Universidade de Lisboa. Lisboa; On-line Poster N. 54; 28 de junho de 2022; Disponível em: <https://www.ulisboa.pt/jornadas-cientificas2022>, acessado a 20/09/2022.
- Alvarez, A.L.; Weyers, S.L.; Goemann, H.M.; Peyton, B.M.; Gardner, R.D. Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*. 54:24; 2021; doi: 10.1016/j.algal.2021.102200.
- Anastopoulos, I.; Kyzas, G.Z. Progress in batch biosorption of heavy metals onto algae. *Journal of Molecular Liquids*. 209:77-86; 2015; doi: 10.1016/j.molliq.2015.05.023.
- Andrade, C.J.; Andrade, L.M. Microalgae for bioremediation of textile wastewater: An overview. *MOJ Food Process Technol*. 6(5):432-433; 2018; doi: 10.15406/mojfpt.2018.06.00200.
- Ansari, F.A.; Ravindran, B.; Gupta, S.K.; Nasr, M.; Rawat, I.; Bux, F. Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. *Journal of Environmental Management*. 240:293-302; 2019; doi: 10.1016/j.jenvman.2019.03.123.

- Aron, N.S.M.; Khoo, K.S.; Chew, K.W.; Show, P.L.; Chen, W.H.; Nguyen, T.H.P. Sustainability of the four generations of biofuels - A review. *International Journal of Energy Research*. 44:9266-9282; 2020; doi: 10.1002/er.5557.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.C., 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl. Energy*. 88 (10), 34253431.
- Bleakley, S.; Hayes, M. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods*. 6; 2017; doi: 10.3390/foods6050033.
- Cai, T.; Park, S.Y.; Li, Y.B. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 19:360-369; 2013; doi: 10.1016/j.rser.2012.11.030.
- Cameira, M.D.; Mota, M. Nitrogen Related Diffuse Pollution from Horticulture Production- Mitigation Practices and Assessment Strategies. *Horticulturae*. 3; 2017; doi: 10.3390/horticulturae3010025.
- CE (2001) - Decisão no 2455/2001/CE do Parlamento Europeu e do Conselho; estabelece a lista de substâncias prioritárias da Diretiva 2000/60/CE; 20 de Novembro de 2001.
- CEN (2001) - EN 13650 – Soil Improvers and growing media – Extraction of aqua regia soluble elements. European Committee for Standardization, Brussels; 2001a
- CEN (2001) - EN 13654 - Soil improvers and growing media - Determination of Nitrogen - Dumas method. European Committee for Standardization, Brussels; 2001b
- Cheng, C.; Tang, T.; Shi, Q.W.; Zhou, Z.D.; Fan, J.H. The potential and challenge of microalgae as promising future food sources. *Trends in Food Science & Technology*. 126:99-112; 2022; doi: 10.1016/j.tifs.2022.06.016.
- Chew, K.W.; Yap, J.Y.; Show, P.L.; Suan, N.H.; Juan, J.C.; Ling, T.C.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*. 229:53-62; 2017; doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.006.
- Chiaiese, P.; Corrado, G.; Colla, G.; Kyriacou, M.C.; Roupael, Y. Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. *Frontiers in Plant Science*. 9; 2018; doi: 10.3389/fpls.2018.01782.
- Chinnasamy, S.; Ramakrishnan, B.; Bhatnagar, A.; Das, K.C. Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. *International Journal of Molecular Sciences*. 10:518-532; 2009; doi: 10.3390/ijms10020518.

- Chong, J.W.R.; Khoo, K.S.; Yew, G.Y.; Leong, W.H.; Lim, J.W.; Lam, M.K.; Ho, Y.C.; Ng, H.S.; Munawaroh, H.S.H.; Show, P.L. Advances in production of bioplastics by microalgae using food waste hydrolysate and wastewater: A review. *Bioresource Technology*. 342; 2021; doi: 10.1016/j.biortech.2021.125947.
- Cicek, N.; A review of membrane bioreactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater. *Can. Biosyst.Eng.* 45, 13; 2003.
- Coppens, J.; Grunert, O.; Van den Hende, S.; Vanhoutte, I.; Boon, N.; Haesaert, G.; De Gelder, L. The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels. *Journal of Applied Phycology*. 28:2367-2377; 2016; doi: 10.1007/s10811-015-0775-2.
- Debajyoti, K.; Duttaa, D.; Samantab, P.; Deyc, S.; Sherpa, K.; Kumar, S.; Brajesh, D. Valorization of wastewater: A paradigm shift towards circular bioeconomy and sustainability. *Science of The Total Environment*.; 2022; doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157709.
- Decreto-Lei n.º 235/97, de 3 de setembro; Diário da República n.º 203/1997, Série I-A de 1997-09-03; Ministério do Ambiente.
- Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto; Diário da República n.º 176/1998, Série I-A de 1998-08-01, páginas 3676 – 3722; Ministério do Ambiente.
- Decreto-Lei n.º 30/2022, de 11 de abril; Diário da República n.º 71/2022, Série I de 2022-04-11, páginas 2 – 22; Presidência do Conselho de Ministros.
- Decreto-Lei n.º 348/98, de 9 de novembro; Diário da República n.º 259/1998, Série I-A de 1998-11-09; Ministério do Ambiente.
- Decreto-Lei n.º 68/99, de 11 de março; Diário da República n.º 59/1999, Série I-A de 1999-03-11; Ministério do Ambiente.
- Diretiva 91/676/CEE, de 12 de dezembro; Relativa à proteção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola.
- Drobek, M.; Frac, M.; Cybulska, J. Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress-A Review. *Agronomy-Basel*. 9; 2019; doi: 10.3390/agronomy9060335.
- Encarnacao, T.; Palito, C.; Pais, A.; Valente, A.J.M.; Burrows, H.D. Removal of Pharmaceuticals from Water by Free and Imobilised Microalgae. *Molecules*. 25; 2020; doi: 10.3390/molecules25163639.
- EPA (Environmental Protection Agency); Protecting Water Quality from Agricultural Runoff. (2005) EPA 841-F-05-001.

- European Commission; The Water Framework Directive and the Floods Directive: Actions towards the 'good status' of EU water and to reduce flood risks; 2015, disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A52015DC0120> , acessado a 12/10/2021.
- FAO; OECD. Water and agriculture. An issues note produces for the G20 Presidency of the Kingdom of Saudi Arabia. Rome; 2021
- Fasusi, O.A.; Cruz, C.; Babalola, O.O. Agricultural Sustainability: Microbial Biofertilizers in Rhizosphere Management. Agriculture-Basel. 11; 2021; doi: 10.3390/agriculture11020163.
- Fernández-Arevalo, T.; Lizarralde, I.; Fdz-Polanco, F.; Perez-Elvira, S.I.; Garrido, J.M.; Puig, S.; Poch, M.; Grau, P.; Ayesa, E. Quantitative assessment of energy and resource recovery in wastewater treatment plants based on plant-wide simulations. Water Research. 118:272-288; 2017; doi: 10.1016/j.jclepro.2017.07.232.
- Ferreira, A.; Ribeiro, B.; Marques, P.; Ferreira, A.F.; Dias, A.P.; Pinheiro, H.M.; Reis, A.; Gouveia, L. *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. Journal of Cleaner Production. 165:1316-1327; 2017; doi: 10.1016/j.jclepro.2017.07.232.
- Franchino, M.; Tigini, V.; Varese, G.C.; Sartor, R.M.; Bona, F. Microalgae treatment removes nutrients and reduces ecotoxicity of diluted piggy digestate. Science of the Total Environment. 569:40-45; 2016; doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.100.
- Garcia-Gonzalez, J.; Sommerfeld, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. Journal of Applied Phycology. 28:1051-1061; 2016; doi: 10.1007/s10811-015-0625-2.
- Geremia, E.; Ripa, M.; Catone, C.M.; Ulgiati, S. A Review about Microalgae Wastewater Treatment for Bioremediation and Biomass Production-A New Challenge for Europe. Environments. 8; 2021; doi: 10.3390/environments8120136.
- Gilliam, J.W. Riparian wetlands and water-quality. Journal of Environmental Quality. 23:896-900; 1994; doi: 10.2134/jeq1994.00472425002300050007x.
- Gouveia, L.; Janelas, J.; Torpecelo, A.; Oliveira, A.C. Microalga *Nannochloropsis* sp. biomass for biodiesel production: conventional (cell disruption) and in situ transesterification. Journal of Marine Biology & Oceanography. v. 5, p. 1-7, 2016; doi: 10.4172/2324-8661.1000152
- Guidetti, G.; Di Cerbo, A.; Giovazzino, A.; Rubino, V.; *et al.* In Vitro Effects of Some Botanicals with Anti-Inflammatory and Antitoxic Activity. Journal of Immunology Research. 2016; 2016; doi: 10.1155/2016/5457010

- Gupta, S.K.; Ansari, F.A.; Shriwastav, A.; Sahoo, N.K.; Rawat, I.; Bux, F. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. *Journal of Cleaner Production*. 115:255-264; 2016; doi: 10.1016/j.jclepro.2015.12.040.
- Hallmann, A.; Rampelotto, P. *Grand Challenges in Algae Biotechnology*. 2019; Springer; ISBN : 978-3-030-25232-8; doi: 10.1007/978-3-030-25233-5.
- Healy, M.G.; O' Flynn, C.J. The performance of constructed wetlands treating primary, secondary and dairy soiled water in Ireland (a review). *J. Environ. Manag.* 2011; doi:10.1016/j.jenvman.2011.05.021.
- Horneck, D. A.; Miller, R. O. Determination of total nitrogen in plant tissue. In *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. Y. P. Kalra (ed.); pp. 75-83; CRC Press LLC; Boca Raton, Florida; 1998.
- Houba, V.J.; van der Lee, J.J.; Novozamsky, I. *Soil Analysis Procedures – Other Procedures*. Parte 5B. Ed. Wageningen Agricultural University. Holanda.; 1995.
- Houba, V.J.; van der Lee, J.J.; Novozamsky, I.; Waling, I. *Soil and Plant Analysis, Part 5, Soil Analysis Procedures*. Wageningen Agricultural University, The Netherlands; 1989.
- Hultberg, M.; Bodin, H.; Ardal, E.; Asp, H. Effect of microalgal treatments on pesticides in water. *Environ Technol.* 37(7):893-8; 2016; doi: 10.1080/09593330.2015.1089944.
- Hussain, A.; Hasnain, S. Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 38:85-92; 2011; doi: 10.1007/s10295-010-0833-3.
- Instituto Nacional de Estatística - Estatísticas do Ambiente: 2019. Lisboa: INE, 2020. ISSN 0872-5276. ISBN 978-989-25-0549-7
- ISO 10694. *Soil Quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)*; 1995.
- Jayaraj, R.; Megha, P.; Sreedev, P. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol.* 9(3-4):90-100; 2016; doi:10.1515/intox-2016-0012.
- Kapoore, R.V.; Wood, E.E.; Llewellyn, C.A. Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*. 49:27; 2021; doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107754.
- Karray, R.; Elloumi, W.; Ben Ali, R.; Loukil, S.; Chamkha, M.; Karray, F.; Sayadi, S. A novel bioprocess combining anaerobic co-digestion followed by ultra-filtration and microalgae

- culture for optimal olive mill wastewater treatment. *Journal of Environmental Management*. 303; 2022; doi: 10.1016/j.jenvman.2021.114188.
- Kellogg, R.L.; Lander, C.H.; Moffitt, D.C.; Gollehon, N.; Manure nutrients relative to the capacity of cropland and pastureland to assimilate nutrients: spatial and temporal trends for the United States. *Proceedings of the Water Environment Federation, Water Environment Federation, Anaheim*. 18–157; 2000. Doi: 10.2175/193864700784994812
 - Lakanen, E.; Ervio, R. Comparison of Eight Extractants for the Determination of Plant Available Micronutrients in Soils. *Acta Agraria Fennica*, 123, 223–232;1971.
 - Li, K.; Liu, Q.; Fang, F.; Luo, R.H.; Lu, Q.; Zhou, W.G.; Huo, S.H.; Cheng, P.F.; Liu, J.Z.; Addy, M.; Chen, P.; Chen, D.J.; Ruan, R. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*. 291:16; 2019; doi: 10.1016/j.biortech.2019.121934.
 - Liess, M.; Liebmann, L.; Vormeier, P.; Weisner, O.; Altenburger, R.; Borchardt, D.; *et al.* Pesticides are the dominant stressors for vulnerable insects in lowland streams. *Water Research*. 201; 2021; doi: 10.1016/j.watres.2021.117262.
 - Lukyanov, V.A.; Gorbunova, S.Y.; Gribovskaya, I.V. Comparative evaluation of biochemical composition of microalgae biomass *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Theoretical and Applied Ecology*:216-221; 2021; doi: 10.25750/1995-4301-2021-1-216-221.
 - Maillard, E. S.; Payraudeau, E.; Faivre, C.; Gregoire S.G.; Imfeld, G. Removal of pesticide mixtures in a stormwater wetland collecting runoff from a vineyard catchment. *Sci Total Environ*. 409(11):2317-2324; 2011; doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.057.
 - Marella, T.K.; Saxena, A.; Tiwari, A.; Datta, A.; Dixit, S. Treating agricultural non-point source pollutants using periphyton biofilms and biomass volarization. *Journal of Environmental Management*. 301:10; 2022; doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113869.
 - Martins, M.; Mota, M.; Ribeiro, R.; Cardoso, H.; Silva, J.L.; Alvarenga, P. Avaliação do potencial fertilizante/bioestimulante de biomassa de microalgas (*Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*) obtidas no tratamento de água de drenagem agrícola. Poster apresentado na 1ª Edição das “Jornadas Científicas da Universidade de Lisboa”; Reitoria da Universidade de Lisboa. Lisboa; On-line Poster N. 54; 28 de junho de 2022; Disponível em: <https://www.ulisboa.pt/jornadas-cientificas2022>, acessado a 20/09/2022.
 - Mazepa, E.; Malburg, B.V.; Mogor, G.; de Oliveira, A.C.; Amatussi, J.O.; Correa, D.O.; Lemos, J.S.; Ducatti, D.R.B.; Duarte, M.E.R.; Mogor, A.F.; Nosedá, M.D. Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*. 59; 2021; doi: 10.1016/j.algal.2021.102434.

- Moeder, M.; Carranza-Diaz, O.; Lopez-Angulo, G.; Vega-Avina, R.; *et al.* Potential of vegetated ditches to manage organic pollutants derived from agricultural runoff and domestic sewage: A case study in Sinaloa (Mexico). *Science of the Total Environment*. 598:1106-1115; 2017; doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.149.
- Moore, M.T.; Kroger, R.; Locke, M.A.; Cullum, R.F.; Steinriede, R.W.; Testa, S.; Lizotte, R.E.; Bryant, C.T.; Cooper, C.M. Nutrient mitigation capacity in Mississippi Delta, USA drainage ditches. *Environmental Pollution*. 158:175-184; 2010; doi: 10.1016/j.envpol.2009.07.024. \
- Moreno-Garcia, L.; Adjalle, K.; Barnabe, S.; Raghavan, G.S.V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 76:493-506; 2017; doi: 10.1016/j.rser.2017.03.024.
- Navarro-Lopez, E.; Ruiz-Nieto, A.; Ferreira, A.; Acien, F.G.; Gouveia, L. Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. *Molecules*. 25; 2020; doi: 10.3390/molecules25030664.
- Nie, C.L.; Pei, H.Y.; Jiang, L.Q.; Cheng, J.; Han, F. Growth of large-cell and easily-sedimentation microalgae *Golenkinia* SDEC-16 for biofuel production and campus sewage treatment. *Renewable Energy*. 122:517-525; 2018; doi: 10.1016/j.renene.2018.02.005.
- Niemann, D.I.; Dorffling, K. Growth-inhibitors and growth-promoters in enteromorpha-compressa (chlorophyta). *Journal of Phycology*. 16:383-389; 1980.
- Novotny, V. Diffuse pollution from Agriculture in the World. Proceedings from the International Workshop: 'Where do fertilizers go?'.; Ispra, Italy.2005.
- O'Brien, J.M.; Lessard, J.L.; Plew, D.; Graham, S.E.; McIntosh, A.R. Aquatic Macrophytes Alter Metabolism and Nutrient Cycling in Lowland Streams. *Ecosystems*. 17:405-417; 2014; doi: 10.1007/s10021-013-9730-8.
- Organização Europeia de Bioplásticos - <https://www.european-bioplastics.org/market/>, acessado a 16/08/2022, acessado a 27/07/2022.
- Pappalardo, S.E.; Otto, S.; Gasparini, V.; Zanin, G.; Borin, M. Mitigation of herbicide runoff as an ecosystem service from a constructed surface flow wetland. *Hydrobiologia*. 774:193-202; 2016; doi: 10.1007/s10750-015-2375-1.
- Pimentel, D. Amounts of pesticides reaching target pests - environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural & Environmental Ethics*. 8:17-29; 1995; doi: 10.1007/bf02286399.
- Póvoas, I.; Barral, M. F. Métodos de análise de solos. *Comunicações do Instituto de Investigação Científica Tropical, Série de Ciências Agrárias*; N.º 10. Lisboa, Portugal; 1992.

- Rai, P. K. Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and its Phytoremediation using Wetland Plants: An ecosustainable approach. *International Journal of Phytoremediation*. 10:2, 133-160; 2008; Doi: 10.1080/15226510801913918.
- Renuka, N.; Guldhe, A.; Prasanna, R.; Singh, P.; Bux, F. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnology Advances*. 36:1255-1273; 2018; doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.004.
- Renuka, N.; Prasanna, R.; Sood, A.; Ahluwalia, A.S.; Bansal, R.; Babu, S.; Singh, R.; Shivay, Y.S.; Nain, L. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. *Environmental Science and Pollution Research*. 23:6608-6620; 2016; doi: 10.1007/s11356-015-5884-6.
- Renuka, N.; Prasanna, R.; Sood, A.; Bansal, R.; Bidyarani, N.; Singh, R.; Shivay, Y.S.; Nain, L.; Ahluwalia, A.S. Wastewater grown microalgal biomass as inoculants for improving micronutrient availability in wheat. *Rhizosphere*. 3:150-159; 2017; doi: 10.1016/j.rhisph.2017.04.005.
- Ribeiro, H. Biofertilizantes o que são e que benefícios têm para a agricultura?; *Revista da Associação Portuguesa de Horticultura*; 2022.
- Richmond, A.; *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science.; 2004; ISBN: 978-0-470-67389-8. doi:10.1002/9780470995280.
- Ronga, D.; Biazzi, E.; Parati, K.; Carminati, D.; Carminati, E.; Tava, A. Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy-Basel*. 9; 2019; doi: 10.3390/agronomy9040192.
- Sabzevari, S.; Hofman, J. A worldwide review of currently used pesticides' monitoring in agricultural soils. *Science of the Total Environment*. 812; 2022; doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152344.
- Salomons, W.; Stol, B. Soil pollution and its mitigation: Impact of land use changes on soil storage of pollutants, in *Nonpoint Pollution and Urban Stormwater Management*; technomic Publishing Co., Lancaster, PA; 1995.
- Solovchenko, A.; Verschoor, A.M.; Jablonowski, N.D.; Nedbal, L. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnology Advances*. 34:550-564; 2016; doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.01.002.
- Stehle, S.; Elsaesser, D.; Gregoire, C.; Imfeld, G.; Niehaus, E.; Passeport, E.; Payraudeau, S.; Schafer, R.; Tournebize, J.; Schulz, R. Pesticide risk mitigation by vegetated treatment systems: a meta-analysis. *Journal of Environmental Quality* 40: 1068–1080. 2011; Doi: 10.2134/jeq2010.0510.

- Tabatabai, MA. Soil enzymes. Mickelson SH, Bigham JM, editors; *Methods of Soil Analysis, Part 2.; Microbiological and Biochemical Properties*; Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America; p. 775–833; 1994.
- Tang, C.C.; Tian, Y.; He, Z.W.; Zuo, W.; Zhang, J. Performance and mechanism of a novel algal-bacterial symbiosis system based on sequencing batch suspended biofilm reactor treating domestic wastewater. *Bioresource Technology*. 265:422-431; 2018; doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.033.
- Tarakhovskaya, E.R.; Maslov, Y.I.; Shishova, M.F. Phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54:163-170; 2007; doi: 10.1134/s1021443707020021.
- Uhlenbrook, S., Connor, R., Koncagul, E., and Ortigara, A., Closing the water cycle - the key role of water and wastewater management in a circular economy. 19th EGU General Assembly; 2017.
- Van den Hende, S.; Vervaeren, H.; Desmet, S.; Boon, N. Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New Biotechnology*. 29:23-31; 2011; doi: 10.1016/j.nbt.2011.04.009.
- Vymazal, J.; Brezinova, T.D. Removal of nutrients, organics and suspended solids in vegetated agricultural drainage ditch. *Ecological Engineering*. 118:97-103; 2018; doi: 10.1016/j.ecoleng.2018.04.013.
- Wang, M.; Zhang, D.Q.; Dong, J.W.; Tan, S.K. Application of constructed wetlands for treating agricultural runoff and agro-industrial wastewater: a review. *Hydrobiologia*. 805:1-31; 2018; doi: 10.1007/s10750-017-3315-z.
- Wong, J.F.; Hong, H.J.; Foo, S.C.; Yap, M.K.K.; Tan, J.W. A review on current and future advancements for commercialized microalgae species. *Food Science and Human Wellness*. 11:1156-1170; 2022; doi: 10.1016/j.fshw.2022.04.007.
- Xu, Z.M.; Wang, Z.; Gao, Q.; Wang, L.L.; Chen, L.L.; Li, Q.G.; Jiang, J.J.; Ye, H.J.; Wang, D.S.; Yang, P. Influence of irrigation with microalgae-treated biogas slurry on agronomic trait, nutritional quality, oxidation resistance, and nitrate and heavy metal residues in Chinese cabbage. *Journal of Environmental Management*. 244:453-461; 2019; doi: 10.1016/j.jenvman.2019.04.058.
- Zainith, S.; Saxena, G.; Kishor, R.; Bharagava, R.N.; Application of microalgae in industrial effluent treatment, contaminants removal, and biodiesel production: opportunities, challenges, and future prospects. *Bioremediation for Environmental Sustainability*. Elsevier, pp. 481–517; 2021; doi:10.1016/B978-0-12-820524-2.00020-1.

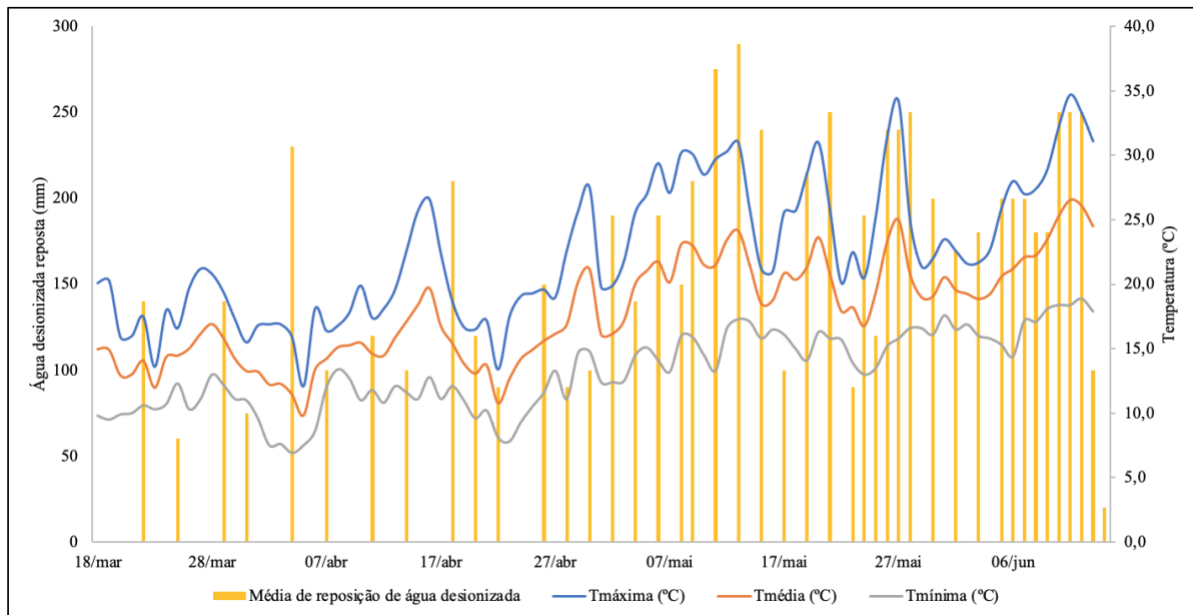
- Zhang, S.Y.; de Boer, A.H.; van Duijn, B. Auxin effects on ion transport in *Chara corallina*. *Journal of Plant Physiology*. 193:37-44; 2016; doi: 10.1016/j.jplph.2016.02.009.
- Zhuang, D.L.; He, N.; Khoo, K.S.; Ng, E.P.; Chew, K.W.; Ling, T.C. Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. *Chemosphere*. 291; 2022; doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132932.
- Zuazo, V.H.D.; Pleguezuelo, C.R.R.; Flanagan, D.C.; *et al.* Agricultural runoff: new research and trends. Hudspeth, C.A., Reeve, T.E. (Eds.). *Agricultural runoff, coastal engineering and flooding*, Environmental science, engineering and technology series; Nova Science Publishers, New York; 2009.

Anexos

Anexo I - Plano de fertilização

| Produto aplicado | | Dose | Tipo de produto/composição |
|------------------|---------------------------------|-----------|---|
| Fertilizantes | Basal | 300 kg/ha | PK fertilizante químico binário (0N-12P-30K) |
| | | 200 kg/ha | NP fertilizante químico binário (15N-35P-0K) |
| | Adubo de cobertura | 850 kg/ha | Fertilizante N-químico líquido, 32% (p/v) |
| Herbicidas | Lumax® (Syngenta) | 4 L/ha | Emulsão líquida com: 37,5 g/L (ou 3,39% (p/p) de mesotriona 312,5 g/L (ou 28,2% (p/p) de S-metolaclo-ro 187,5 g/L (ou 16,9% (p/p) de terbutilazina |
| | Laudis® (Bayer) | 2 L/ha | Dispersão de óleo, com: 22 g/L de isoxadifen-etil 44 g/L de tembotrione |
| | Onix® (Belchim Crop Protection) | 1,5L/ha | 600 g/L de piridato |
| Inseticidas | Karate® (Syngenta) | 1,5L/ha | 100 g/L ou 9,5% (p/p) lambda-cialotrina |

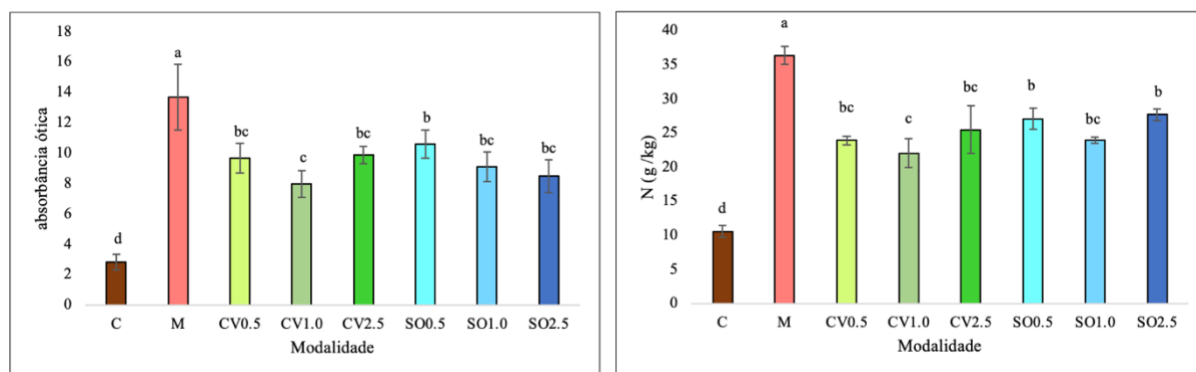
Anexo II – Variações da temperatura e quantidade de água reposta durante o ensaio de crescimento de *Lactuca sativa* (Nadine)



Anexo III - Produtos fitofarmacêuticos aplicados no decorrer do ensaio

| Aplicação (dias após transplantação) | Tipo de Produto | Concentração | Composição |
|---|---------------------------|---------------------|--|
| 24 e 52 | Inseticida – Decis | 0,3 mL/L | 25 g/L ou 2,8% (p/p) de deltametrina |
| 43 e 52 | Inseticida – Pirimor G | 0,75 g/L | 50% (p/p) de pirimicarbe |
| 46 | Fungicida - Ortiva | 1 mL /L | 250 g/L ou 23,1 % (p/p) de azoxistrobina |
| 52 | Fungicida - Sonar | 1,5 g/L | 50% (p/p) de fenhexamida |

Anexo IV - Resultados aos parâmetros das plantas, absorvância ótica e N (g/kg)



Resultados aos parâmetros das plantas, absorvância ótica e N (g/kg) (média \pm desvio padrão, $n = 4$). As colunas marcadas com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$). C: solo de controlo; M: solo de controlo mineral; CV0.5, CV1.0 e CV2.5: vasos fertilizados com biomassa de *C. vulgaris*; SO0.5, SO1.0 e SO2.5: vasos fertilizados com biomassa de *S. obliquus*.