

BIOFERTILIZANTE À BASE DE MICROALGAS TESTADO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* L. (ALFACE AMERICANA)

MICROALGAE-BASED BIOFERTILIZER TESTED ON THE GERMINATION OF *Lactuca sativa* L. (AMERICAN LETTUCE) SEEDS

¹Rafael Araújo Oliveira, ²Daniela Inácio Junqueira, ³Rafael Ferreira dos Santos*

¹Instituto Federal Goiano, ²Instituto Federal Goiano, ³Universidade de Brasília.
rafaah.chanel@gmail.com

RESUMO

Este estudo aborda a produção de um biofertilizante à base de microalgas e testado na germinação de sementes de alface americana (*Lactuca sativa* L.). Amostras de algas foram coletadas e, em seguida, transferidas e cultivadas em meio de cultivo WC em frascos de vidro de 5L, recebendo ventilação e luz natural, de modo a estimular a floração. Após o crescimento da massa inicial e o atingimento da floração máxima, o conteúdo foi homogeneizado para o processamento direto. Em seguida, foram utilizados recipientes Gerbox, nos quais foram colocados dois papéis mata-borrão por caixa, umedecidos com 0, 3, 6 e 9 mL do biofertilizante e 13, 10, 7 e 4 mL de água destilada, correspondendo a quatro tratamentos com cinco repetições. Os recipientes foram então posicionados em uma câmara DBO, com um fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de 25 °C. As leituras foram realizadas aos 4 e 7 dias após a instalação na câmara DBO. Não foram observadas significâncias estatísticas nos tratamentos com o biofertilizante à base de microalgas.

PALAVRAS-CHAVE: algas, fertilizante biológico, sustentabilidade.

ABSTRACT

This study addresses the production of a biofertilizer derived from microalgae, tested on the germination of iceberg lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.). Algae samples were collected, then transferred and cultivated in WC medium in 5L glass flasks, receiving ventilation and natural light to stimulate blooming. After initial mass growth and reaching peak bloom, the content was homogenized for direct processing. Gerbox containers were then used, with two blotting papers placed in each box, moistened with 0, 3, 6, and 9 mL of the biofertilizer and 13, 10, 7, and 4 mL of distilled water, corresponding to four treatments with five repetitions each. The containers were then placed in a BOD chamber, with a 12-hour photoperiod and a constant temperature of 25°C. Measurements were taken on the 4th and 7th days after installation in the BOD chamber. No statistically significant effects were observed in the treatments using the microalgae-based biofertilizer.

KEYWORDS: algae, biological fertilizer, sustainability.

INTRODUÇÃO

O crescimento constante da população mundial, aliado à adoção de dietas calóricas, exerce uma pressão significativa sobre os recursos do planeta¹. Com a produção de alimentos focada predominantemente na quantidade, em detrimento da qualidade, o principal desafio nos próximos anos será atender à crescente demanda alimentar sem intensificar a degradação ambiental^{2,3}.

O uso excessivo e desenfreado de agrotóxicos é considerado um dos principais fatores da degradação ambiental, tendo em vista que contaminam o solo, rios, lagos e o lençol freático. Ainda, dificultam a fixação de nitrogênio pelos microrganismos que habitam o solo, tornando-o mais empobrecido. Devido aos problemas associados ao uso e consumo de agrotóxicos, tem-se observado um crescente número de iniciativas voltadas à conscientização sobre os impactos dessas substâncias⁴. Produtores e pesquisadores enfrentam o desafio de encontrar soluções inovadoras que reduzam o uso de insumos químicos, minimizando os riscos ao meio ambiente e à saúde e que, ao mesmo tempo, possibilitem a obtenção de alimentos de melhor qualidade para a sociedade⁵.

Nesse contexto, a utilização de fertilizantes à base microbiana se apresenta como uma solução para mitigar as aplicações excessivas e inadequadas de fertilizantes químicos, uma vez que, nas últimas décadas, houve um aumento significativo de seu uso e também o reconhecimento dos danos que podem causar ao meio ambiente. Além disso, fertilizantes microbianos promovem uma interação mais eficaz entre as plantas e os microrganismos presentes na rizosfera, resultando em um intercâmbio mútuo benéfico⁶.

O uso de biofertilizantes oferece várias vantagens, contribuindo para a melhoria das condições físicas do solo, o que favorece a nutrição e o desenvolvimento das plantas. Isso resulta em colheitas mais produtivas, com desempenho comparável ao da adubação convencional. Além disso, promove a produção de alimentos seguros e com maior valor nutricional para os consumidores. Sob a perspectiva agrônômica, os biofertilizantes estimulam a produção de

substâncias promotoras de crescimento, como fitohormônios e metabólitos secundários, que aprimoram a germinação e aumentam a resistência das plantas ao ataque de insetos e doenças⁷.

Sob essa ótica, os fertilizantes à base de microalgas se destacam como uma alternativa sustentável, rentável e promissora em relação aos fertilizantes químicos. Além de potencializar a produtividade agrícola, promovem o equilíbrio do microbioma do solo, amenizando os impactos negativos e contribuindo para a preservação da biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas⁸. As algas são os organismos mais distintos do planeta, com aplicações promissoras na agricultura como biofertilizantes e agentes de condicionamento, contribuindo para a melhoria da fertilidade e para o aumento da produtividade das plantas^{9,10}.

Nos últimos anos, a produção de biofertilizantes derivados de microalgas tem ganhado significativa relevância, consolidando-se como foco de diversos estudos científicos e pesquisas aplicadas. O uso de microalgas destaca-se como uma opção promissora devido à sua multifuncionalidade, alta eficiência fotossintética e capacidade de fornecer nitrogênio em formas assimiláveis pelas plantas. Extratos de microalgas apresentam potencial para promover o crescimento das culturas, graças à presença de reguladores de crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas, além de elevadas concentrações de macro e micronutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal¹¹.

Estudos têm demonstrado a eficácia da microalga *Chlorella* sp. na produção de biofertilizantes^{12,13}. Especificamente, foi observado que as microalgas do gênero *Chlorella* produzem fitohormônios semelhantes às citocininas, como isopenteniladenina, zeatina e seus ribosídeos conjugados, que desempenham papéis importantes na divisão e diferenciação celular, no desenvolvimento do cloroplasto, na dominância apical e no retardo da senescência. Entre as espécies deste gênero, *Chlorella vulgaris* tem se destacado como uma das mais adequadas para a produção de biomassa, devido à sua resistência a contaminantes e à sua capacidade de produzir grandes quantidades de biomassa com menores exigências nutricionais¹⁴.

Chlorella vulgaris é uma microalga unicelular pertencente ao filo Chlorophyta, caracterizada por sua coloração verde e uma composição nutricional diversificada. Ela contém cerca de 45,23% de proteínas, 23,43% de carboidratos e 18,12% de lipídios, além de 10% de minerais e vitaminas e 5% de fibras. Entre seus principais compostos estão os fenólicos, clorofilas a e b, além de carotenoides^{15,16}. Os ácidos graxos mais presentes incluem o linolênico, linoleico e palmítico, somados a níveis elevados de glutamina¹⁷. A microalga também sintetiza brassinosteróides e hormônios como as giberelinas¹⁸, posicionando-se como uma promissora alternativa de bioestimulante e biofertilizante para a agricultura orgânica.

Nesse contexto, a estratégia de buscar melhorias de baixo custo, aliada ao uso de agentes biológicos, merece maior reconhecimento, especialmente considerando a escassez de estudos relacionados ao emprego de algas na agricultura. Assim, objetivou-se apresentar a produção de um biofertilizante formulado com a microalga *Chlorella vulgaris* e avaliar seu potencial na germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface americana).

MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta das algas para a produção do biofertilizante foi realizada em uma lagoa situada no Instituto Federal Goiano, na cidade de Ceres, Goiás, Brasil, que recebe dejetos do prédio de Suinocultura e funciona como parte do sistema de biodigestão. Assim, a coleta das amostras foi realizada em potes e frascos de vidro estéreis, que foram devidamente tampados e transportados para o Laboratório de Biologia Vegetal da instituição. No laboratório, os frascos foram abertos e posicionados próximo às janelas, com as tampas parcialmente abertas para permitir ventilação e exposição à luz, o que favoreceu a estimulação da floração. As cepas das microalgas foram cultivadas utilizando o meio de cultivo WC¹⁹, que promove o cultivo autotrófico das microalgas, empregando luz e carbono inorgânico como fontes de energia para a produção de energia química por meio da fotossíntese²⁰.

Após a identificação das cepas de *Chlorella vulgaris* por meio de microscopia óptica e a observação do crescimento da massa inicial e da floração máxima, a cultura foi preparada para o processamento do biofertilizante. O líquido contendo a cultura foi transferido para um recipiente menor, junto com a água do cultivo, e misturado para garantir homogeneidade.

Para a estimativa da contagem de células, foi utilizada uma amostra pura de 10 mL retirada diretamente do frasco de cultivo. A amostra foi então homogeneizada por 1 minuto utilizando o Vortex Mixer. Após a homogeneização, 10 µL da amostra foram aspirados com uma micropipeta e colocados sobre a câmara de Neubauer para a contagem direta das algas. A contagem seguiu uma metodologia da esquerda para a direita em um padrão de zig-zag. Foram contadas as células que caíram sobre as linhas da borda esquerda e superior, bem como dentro das quadrículas. As células localizadas nas linhas da borda direita e inferior das quadrículas não foram incluídas na contagem, conforme o protocolo descrito por Morandi e Almeida²¹.

Foi registrado um total médio de 81,8 células no grande quadrado central de ambos os lados da câmara. Estima-se que, em um volume de 4 mL (ou 0,004 µL), haja aproximadamente: $2,0 \times 10^7$ células mL⁻¹ ($81,8 \times 1.000$) / 0,004 = 20.450.000. Portanto, o total estimado é de 20.450.000 células.

Os testes de germinação foram conduzidos em caixas de acrílico transparente (Gerbox), com dimensões de 11x11x3,5 cm. Em cada caixa foram colocadas duas folhas de papel mata-borrão, que foram umedecidas com água destilada e diferentes doses do biofertilizante, correspondendo a 2,5 vezes o peso do papel seco.

A pesagem do papel mata-borrão é realizada para determinar o volume de água destilada e biofertilizante a ser utilizado. Primeiro, foram pesadas 10 folhas de papel, e o peso total foi dividido por 5 para obter o peso de duas folhas que vão por cada caixa Gerbox. Em seguida, esse peso foi multiplicado por 2,5 para calcular o volume correspondente de biofertilizante e água, resultando em um total de 13 mL por caixa²².

Foi realizada a seleção da cultivar *Lactuca sativa* L. (alface americana), da marca Feltrin Sementes, com uma taxa de germinação de 99%. As sementes foram distribuídas em papéis Germitest, tanto tratados quanto não tratados com o extrato de algas (biofertilizante). O extrato foi adicionado em diferentes concentrações: baixa, média e alta. Assim, os grupos 2, 3 e 4 receberam, respectivamente, 3, 6 e 9 mL do biofertilizante.

As aplicações de microalgas foram organizadas em quatro tratamentos distintos, cada um com cinco repetições. Os grupos 1, 2, 3 e 4 receberam, respectivamente, 0 mL, 3 mL, 6 mL e 9 mL de microalgas, além de 13 mL, 10 mL, 7 mL e 4 mL de água destilada. As amostras 2, 3 e 4, contendo, respectivamente, 3, 6 e 9 mL do biofertilizante foram analisadas com um pHmetro, revelando os seguintes valores de pH: 8,80 para o grupo 2, 8,88 para o grupo 3 e 8,97 para o grupo 4.

Posteriormente, as sementes foram distribuídas na parte superior dos papéis, com uma quantidade de 50 sementes por caixa (Figura 1A). Em seguida, as caixas foram cobertas com filme plástico transparente e colocadas no germinador tipo DBO (Figura 1B), que foi configurado para um fotoperíodo de 12 horas de luz e uma temperatura constante de 25 °C²².

A primeira leitura da germinação das sementes de alface deve ser feita 4 dias após a semeadura, e a segunda após 7 dias. Na primeira leitura, foram consideradas apenas as plantas normais, aquelas que demonstraram potencial para continuar seu desenvolvimento, ou seja, plantas com sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos²². No sétimo dia foi realizada a segunda leitura, na qual foram analisadas as plantas normais, as plântulas anormais e as sementes dormentes.

Para as análises estatísticas, comparamos a taxa de germinação utilizando o teste de Tukey, com um nível de significância de 5% e uma probabilidade de erro de 1%, empregando o programa R.

Figura 1. Procedimentos para teste de germinação. Em A, distribuição de sementes na caixa Gerbox; em B, disposição das caixas na câmara DBO.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

As porcentagens de germinação, conforme o Teste Padrão de Germinação (TPG), para as doses de 0 e 3 mL de microalgas foram de 63,60% e 63,20%, respectivamente. Em contraste, ao considerar as doses mais altas de microalgas, de 6 e 9 mL, observou-se uma diminuição nas porcentagens de germinação para 51,60% e 48,80%. Após a análise das taxas de germinação, não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 1) entre o controle e as amostras submetidas aos diferentes tratamentos.

Tabela 1. Tabela de significância para as análises realizadas entre o controle e as amostras submetidas aos diferentes tratamentos.

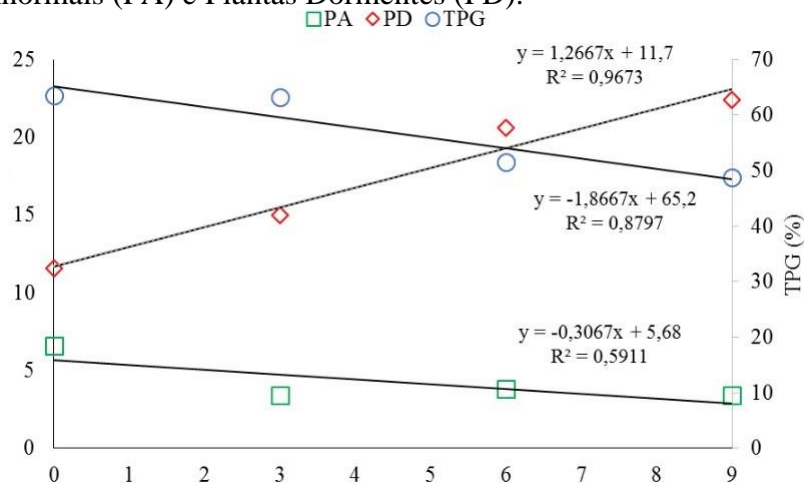
Fonte de Variação	TPG	PA	PD
Dose	0,056 ^{ns}	0,0038**	0,0082**
CV	17,25%	30,98%	27,17%

Legenda: ^{ns}= não significativo, *= Significativo. As médias foram comparadas pelo Teste deTukey a 1% de probabilidade de erro (<0,01). CV (Coeficiente de variação); PA (Plantas anormais); PD (Plantas dormentes).

A curva de regressão (Figura 2) apresenta um ajuste linear, descrito por uma equação de primeiro grau que relaciona três variáveis: TPG (Teste de Padrão de Germinação), PA (Plantas Anormais) e PD (Plantas Dormentes). Os pontos no

gráfico representam as médias de cada dose aplicada, e essas médias foram usadas para construir a curva de regressão. O gráfico indica que, com o aumento das doses (eixo X), a porcentagem de plantas germinadas diminui, enquanto o número de plantas dormentes aumenta. O gráfico exibe, respectivamente, no eixo esquerdo e direito, o número de plantas, referindo-se apenas a PA e PD, enquanto o TPG é apresentado em termos percentuais.

Figura 2. Curva de regressão com ajuste linear, descrito por uma equação de primeiro grau que relaciona três variáveis: Teste de Padrão de Germinação (TPG), Plantas Anormais (PA) e Plantas Dormentes (PD).



Na literatura, há evidências que destacam os benefícios das algas nos estágios iniciais do desenvolvimento da alface. Em um estudo conduzido por Faheed e Fattah¹², observou-se que sementes de alface expostas a solos enriquecidos com biofertilizantes derivados da alga *Chlorella vulgaris* apresentaram um aumento significativo na taxa de germinação. Esse efeito foi atribuído ao incremento nos níveis de carboidratos, proteínas solúveis e aminoácidos livres, em comparação com o grupo controle. Esses resultados sugerem um potencial promissor para o uso de algas como biofertilizantes no cultivo de alface.

Outro estudo realizado por Bumandalai e Tserennadmid²³ evidenciou o potencial das microalgas como biofertilizantes para aumentar o rendimento e a produtividade de culturas como tomate e pepino. Neste experimento, as sementes

foram primeiramente esterilizadas com hipoclorito de sódio a 30% e, após lavagem com água destilada, colocadas em placas de Petri contendo microalgas. As sementes foram avaliadas nos 3º, 6º, 9º e 12º dias, mantendo-se em um termostato a 18 ± 2 °C, com um ciclo de luz de 8 horas claras e 16 horas escuras, durante uma semana. Contudo, neste trabalho utilizaram métodos diferentes para aplicar as microalgas, sendo deixadas as sementes submersas.

Como resultado, a suspensão de *C. vulgaris* aumentou o crescimento das sementes em comparação ao controle (meio de cultura esterilizado) na germinação das sementes. Neste mesmo trabalho ainda é ressaltado que são necessárias mais pesquisas para entender a composição bioquímica das microalgas e o estágio fenológico das culturas que podem influenciar o momento e a quantidade de microalga aplicada como bioestimuladora de germinação.

No entanto, é crucial ressaltar que ainda há uma escassez de publicações sobre a utilização de microalgas como bioestimulantes na agricultura. A ausência de diretrizes claras sobre a melhor forma de aplicar esses extratos, seja em biomassa seca ou úmida, extrato integral ou compostos bioativos extraídos, evidencia a necessidade de mais pesquisas. Estudos agrônômicos, fisiológicos, químicos, bioquímicos e moleculares são essenciais para entender como as microalgas podem ser efetivamente empregadas para promover a germinação de sementes. Nesse sentido, Ronga *et al.*²⁴ enfatizam a necessidade de estabelecer protocolos precisos que auxiliem empresas e agricultores na produção e aplicação de microalgas.

Embora alguns estudos indiquem um aumento na massa seca da parte aérea e das raízes com o uso de bioestimulantes, os resultados podem variar conforme o tipo de planta, o tempo de aplicação e a metodologia utilizada. Em síntese, embora as microalgas apresentem um grande potencial na agricultura, ainda é uma área que demanda maior investimento em pesquisa e desenvolvimento. Com mais estudos e avanços tecnológicos, há a possibilidade de que as microalgas se tornem uma solução sustentável e eficaz para otimizar a produtividade agrícola.

CONCLUSÕES

As doses do biofertilizante à base de microalgas empregadas nesta pesquisa não demonstraram resultados significativos, não promovendo, portanto, melhorias na germinação da alface americana. Assim, embora o uso de biofertilizantes seja um campo de grande relevância, evidenciam-se lacunas substanciais na literatura. Há uma necessidade premente de investigações adicionais para explorar de forma mais aprofundada as potencialidades e otimizar as condições de aplicação desses produtos.

REFERÊNCIAS

1. Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 2002; 418(6898): 671-677. <https://doi.org/10.1038/nature01014>.
2. Godfrey HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*. 2010; 327(5967): 812-818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>.
3. Odegard IYR, Van Der Voet E. The future of food – Scenarios and the effect on natural resource use in agriculture in 2050. *Ecological Economics*. 2014; 97: 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2013.10.005>.
4. Margalith PZ. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1999; 51: 431-438. <https://doi.org/10.1007/s002530051413>.
5. Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O’Connell C, Ray DK, West PC, Balzer C, Bennett EM, Carpenter SR, Hill J, Monfreda C, Polasky S, Rockström J, Sheehan J, Siebert S, Tilman D, Zaks DPM. Solutions for a cultivated planet. *Nature*. 2011; 478(7369): 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>.
6. Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 2003; 255(2): 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>.

7. Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2004; 65: 635-648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.
8. García-Orellana Y, Soto G, Tafur V, Simbaña A, Tello E, Brito J. Efecto de un fertilizante orgánico microalgal en la germinación y crecimiento de plântulas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*. 2016; 34: 33-39.
9. Chapman RL. Algae: the world's most important "plants" – an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. 2013; 18: 5-12. <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9255-9>.
10. Ammar EE, Aioub AAA, Elesawy AE, Karkour AM, Mouhamed MS, Amer AA, EL-Shershaby NA. Algae as bio-fertilizers.; between current situation and future prospective. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022; 29(5): 3083-3096. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.03.020>.
11. Tarakhovskaya ER, Maslov YI, Shishova MF. Phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2007; 54: 163-170. <https://doi.org/10.1134/S1021443707020021>.
12. Faheed FA, Fattah ZA. Effect of *Chlorella vulgaris* as biofertiliser on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. *Journal of Agriculture and Social Sciences*. 2008; 4(4): 165-169.
13. Gharib FAEL, Osama K, Sattar AMAE, Ahmed EZ. Impact of *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina* and *Arthrospira platensis* as bio-stimulants on common bean plant growth, yield and antioxidant capacity. *Scientific Reports*. 2024; 14(1398). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50040-4>.
14. Yeh KL, Chang JC. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*. 2012; 105: 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103>.
15. Prabakaran G, Moovendhan M, Arumugam A, Matharasi A, Dineshkumar R, Sampathkumar P. Evaluation of chemical composition and in vitro antiinflammatory effect of marine microalgae *Chlorella vulgaris*. *Waste and Biomass Valorization*. 2018; 10: 3263-3270. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0370-2>.

16. Sudhakar MP, Kumar BR, Mathimani T, Arunkumar K. A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy prospective. *Journal of Cleaner Production*. 2019; 228: 1320-1333. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.287>.
17. Wild KJ, Trautmann A, Katzenmeyer M, Steingaß H, Posten C, Rodehutschord M. Chemical composition and nutritional characteristics for ruminants of the microalgae *Chlorella vulgaris* obtained using different cultivation conditions. *Algal Research*. 2019; 38. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101385>.
18. Stirk WA, Ördög V, Novák O, Rolčík J, Strnad M, Bálint P, Van Staden J. Auxin and cytokinin relationship in 24 microalgal strains. *Journal of Phycology*. 2013; 49(3): 459-467. <https://doi.org/10.1111/jpy.12061>.
19. Guillard RRL, Lorenzen CJ. Yellow-green algae with chlorophyllide c¹². *Journal of Phycology*. 1972; 8(1): 10-14. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x>.
20. Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology*. 2011; 102: 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.
21. Morandi MAB, Alemida EG. Calibra: Contagem de esporos e calibração de suspensão fúngica. 2007.
22. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para Análise de Sementes. 2009; 399 p.
23. Bumandalai O, Tserennadmid R. Effect of *Chlorella vulgaris* as a biofertilizer on germination of tomato and cucumber seeds. *International Journal of Aquatic Biology*. 2019; 7(2): 05-99. <https://doi.org/10.22034/ijab.v7i2.582>.
24. Ronga D, Biazzi E, Parati K, Carminati D, Tava A. Microalgal biostimulants and biofertilizers in crop productions. *Agronomy*. 2019; 9(4): 192-192. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>.