



ADEMIR GOELZER

**APLICAÇÃO DE MICROALGA *Desmodesmus abundans* COMO
BIOFERTILIZANTE FOLIAR EM *Glycine max***

**LAVRAS – MG
2023**

ADEMIR GOELZER

**APLICAÇÃO DE MICROALGA *Desmodesmus abundans* COMO
BIOFERTILIZANTE FOLIAR EM *Glycine max***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Goelzer, Ademir Goelzer.
Aplicação de microalga *Desmodesmus abundans* como
biofertilizante foliar em *Glycine max* / Ademir Goelzer. - 2023.

Orientador(a): Whasley Ferreira Duarte.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.
Bibliografia.

1. Biofertilizante. 2. Soja. 3. Baixo Custo. I. Duarte, Whasley
Ferreira. II. Título.

ADEMIR GOELZER

**APLICAÇÃO DE MICROALGA *Desmodesmus abundans* COMO
BIOFERTILIZANTE FOLIAR EM *Glycine max***

**APPLICATION OF MICROALGAE *Desmodesmus abundans* AS A FOLIAR
BIOFERTILIZER IN *Glycine max***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

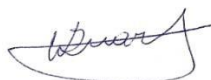
APROVADA em 23 de fevereiro de 2023

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira - Embrapa Agroenergia

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso – UFLA

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA

Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani – UFGD



Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

Ao meu pai Nilson Goelzer e mãe Maria Cristina Duarte Goelzer

À minha esposa, Graciela Beatris Lopes

Ao meu irmão, Ademar Goelzer

À minha irmã, Jéssica Goelzer

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde e força para superar todas as dificuldades ao longo deste caminho.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realizar o doutorado em Biotecnologia Vegetal.

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte, pelos ensinamentos, oportunidades, orientação, confiança e respeito.

A toda minha família, ao meu Pai Nilson Goelzer e minha Mãe Maria Cristina, meus irmãos Ademar e Jéssica, por todo incentivo, suporte, apoio e amor.

À esposa e guerreira Graciela Beatris Lopes, por todo amor, carinho, paciência e companheirismo durante muitos anos.

Ao meu amigo de longa data Orivaldo B. da Silva pela ajuda e parceria nesta jornada.

A Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso, pelos ensinamentos, oportunidades, conselhos e ter contribuído com sugestões na qualificação e ter aceitado o convite para ser integrante da banca da defesa.

A Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani, Prof. Dr. Felix Gonçalves de Siqueira e Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias por terem aceitado o convite de ser integrante da banca examinadora.

A Dra. Tharyn Reichel e Dr. Dágon Ribeiro por terem aceitado o convite de ser membro suplente.

Ao Prof. Dr. Mario Lucio e seus orientados pelo fornecimento de materiais e disponibilizar seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva pelo suporte e apoio estrutural de casa de vegetação.

Aos integrantes do grupo de pesquisa, pela ajuda nos experimentos e materiais repassados; em especial a Rafaela e Suzana.

Aos professores, equipe dos técnicos do programa em Biotecnologia Vegetal, pelo auxílio e atenção.

Aos meus amigos de longa data que acompanharam mesmo que distantes este caminho árduo.

Agradeço a todos aqueles que aqui não foram nomeados, mas que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e foram importantes ao meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço à FAPEMIG e CNPq pelo financiamento dos projetos que contribuíram nas aquisições de equipamentos e materiais na construção deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo que garantiu o sustento financeiro necessário para realização deste trabalho.

Muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Não é preciso entrar para a história para fazer um mundo melhor.”

(MAHATMA GANDHI)

RESUMO GERAL

Desmodesmus abundans L2B Bold tem atraído interesse de pesquisadores e indústrias, devido a sua biomassa ser rica em lipídeos, açúcares, proteínas, aminoácidos e minerais, bem como possuem moléculas como os fitohormônios, apresentando grande potencial de aplicação biotecnológica. Portanto, há sempre o esforço para buscar meios de cultivos de baixo custo e acessíveis, sendo um caminho o fertilizante comercial. Além disso, os compostos contidos na biomassa de *D. abundans* L2B Bold podem ser utilizados como biofertilizante aumentando produção de culturas vegetais, como a soja. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar fertilizante comerciais como meio alternativo e mais acessíveis para produção da biomassa de *D. abundans* L2B Bold e investigar o potencial de sua biomassa aplicadas via foliar como biofertilizante em plantas de soja. O experimento foi dividido em duas etapas, sendo na primeira testado um meio padrão, BG-11 e o outro fertilizante comercial (FC). Foi determinada a população, perfil metabólico e pigmentos fotossintéticos da microalga. Ao final, a biomassa foi coletada e seca para estimar o custo de produção de 1 kg de biomassa seca cultivada nos dois meios de cultivo. Os teores dos pigmentos fotossintéticos foram menores em cultivo no FC, em relação ao BG-11. Já, a população e a biomassa seca de *D. abundans* L2B Bold foram similares nos dois meios de cultivo. Os metabólitos intracelulares identificados induziram diferenças nas respostas celulares da microalga nos dois meios de cultivo. O uso de fertilizante comercial reduziu em 31,8% o custo de 1 kg de biomassa seca, em comparação a meio padrão, BG-11. Para a segunda etapa, foram testadas concentrações de biomassa (10, 20 e 30% v/v) de *D. abundans* L2B bold com população 10^7 células mL⁻¹ cultivada em meio FC e um grupo controle (apenas água), aplicadas em plantas de soja. Foram realizadas três pulverizações, aos 30, 50 e 70 dias após a semeadura (DAS). A avaliação da altura e diâmetro do caule das plantas foi realizada após a primeira aplicação da biomassa microalgal e, posteriormente a cada 15 dias até os 100 DAS. Após 80 DAS foram coletadas plantas para determinar as massas secas de folhas, caules e raízes das plantas, também foram quantificados os nutrientes foliares. Foram feitas coletas de material vegetal, após 48h de cada aplicação (32, 52 e 72 DAS) para quantificar os teores os pigmentos fotossintéticos foliares. Ao final, as plantas foram colhidas para quantificar a produção de grãos e teores de minerais dos mesmos. A aplicação de 20% (v/v) da biomassa de *D. abundans* L2B bold influenciou positivamente no diâmetro do caule, nas massas frescas e secas de folhas e seca de caule, aumentou o número de legumes e grãos, bem como, a massa de grãos por planta de soja. Também a aplicação da biomassa microalgal incrementou o conteúdo de nitrogênio e proteínas totais nos grãos de soja. Assim, esses achados demonstram que fertilizante comercial reduz o custo de obtenção da biomassa de *D. abundans* L2B Bold e potencializam sua aplicação como biofertilizante aumentando a produção dos grãos de soja.

Palavras-chave: Microalgas. Metabolômica. Econômico. Soja. Bioinsumos. Biotecnologia vegetal.

ABSTRACT

Desmodesmus abundans L2B Bold have attracted interest from researchers and industries, due to its biomass being rich in lipids, sugars, proteins, amino acids and minerals, as well as having molecules such as phytohormones, presenting great potential for biotechnological application. Therefore, there is always an effort to search for low-cost and accessible culture medium, one of the ways being commercial fertilizer. In addition, the compounds contained in *D. abundans* L2B Bold biomass can be used as a biofertilizer, increasing crop production, such as soybeans. Thus, the objective of this study was to evaluate commercial fertilizer as an alternative and more accessible for the production of *D. abundans* L2B Bold biomass and to investigate the potential of its biomass applied via foliar as a biofertilizer in soybean crop. The experiment was divided into two steps, the first being a standard BG-11 media and the other commercial fertilizer (CF) were tested. The population, metabolic profile and photosynthetic pigments of the microalgae were determined. At final, the biomass was collected and dried to estimate the cost of producing 1 kg of dry biomass from the two-culture media. The contents of photosynthetic pigments were lower in cultivation in CF, in relation to BG-11. The population and dry biomass of *D. abundans* L2B Bold were similar in both culture media. The identified intracellular metabolites induced differences in the cellular responses of the microalgae in the two-culture media. The use of commercial fertilizer reduced by 31.8% the cost of 1 kg of dry biomass, compared to standard BG-11 media. After, the second step, were tested, biomass concentrations (10, 20 and 30% v/v) of *D. abundans* L2B Bold with population 10^7 cells mL⁻¹ grown in CF media and a control group (only water), foliar applied in soybean crop. Three sprayings were carried out, at 30, 50 and 70 days after sowing (DAS). The evaluation of plant height and stem diameter was performed after the first application of microalgal biomass, then every 15 days until 100 days after sowing (DAS). After 80 DAS, plants were collected to determine the leaf, stem and root dry masses of soybean plants, leaf nutrients were also quantified. Plant materials were collected after 48 hours of each application (32, 52 and 72 DAS) to quantify the photosynthetic pigment content leaves. At final, the plants were harvested to quantify grain yield and their minerals content. The application of 20% (v/v) of *D. abundans* L2B bold biomass positively influenced the stem diameter, in the leaf fresh and dry mass and stem dry, increased the number of legumes and grains, as well as, mass of grains per soybean plant. The application of microalgal biomass also increased the nitrogen and total protein content in soybean grains. Thus, these findings demonstrate that commercial fertilizer reduce the cost of obtaining *D. abundans* L2B Bold biomass and potentiate its application as a biofertilizer increasing the soybean yield.

Keywords: Economic. Microalgae. Metabolomics. Soybean. Bioinputs. Plant biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Células da microalga <i>Desmodesmus abundans</i> (A) e <i>D. subspicatus</i> (B).	24
Figura 2. Conjunto das áreas das ciências ômicas e correlação com biologia sistêmica.	32
Quadro 1. Quadrados médios de contagem celular da microalga <i>D. abundans</i> L2B Bold ao longo do ciclo nos diferentes meios de cultivo.....	83
Quadro 2. Quadrados médios da análise de variância dos teores de pigmentos da biomassa e biomassa seca da microalga <i>D. abundans</i> L2B Bold.	83
Quadro 3. Quadro de análise de variância dos quadrados médios de altura das plantas e diâmetro do caule de plantas de soja em função das concentrações da biomassa de <i>D. abundans</i> L2B Bold e épocas de avaliações.	83
Quadro 4. Quadrados médios dos conteúdos dos pigmentos fotossintéticos das folhas de soja em função da aplicação via foliar de 20% da biomassa <i>D. abundans</i> L2B Bold e controle. ...	84
Quadro 5. Quadrados médios das massas frescas e secas de folhas e caules e massas secas das raízes da planta da soja em função da aplicação via foliar de diferentes concentrações da biomassa de <i>D. abundans</i> L2B Bold.	84
Quadro 6. Quadrados médios dos macros e micronutrientes foliares de soja em função da aplicação foliar de 20% da biomassa de <i>D. abundans</i> L2B Bold e controle.....	85
Quadro 7. Quadrados médios dos macros e micronutrientes dos grãos de soja em função da aplicação foliar de <i>D. abundans</i> L2B Bold e controle.	86
Quadro 8. Quadrados médios do número de legumes e grãos por planta de soja, bem como, peso dos grãos soja função da aplicação via foliar de concentrações crescentes da biomassa de <i>D. abundans</i> L2B Bold.....	86
Quadro 9. Quadrado médio do peso de 100 grãos de soja em função da aplicação foliar de <i>D. abundans</i> L2B Bold.....	87

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

mL. Mililitros	L2B Bold. Nomenclatura do Isolado
L. Litro	BG-11. <i>Blue.green medium</i> 11
kg. Quilogramas	FC. Fertilizante comercial
%. Porcentagem	v/v. Volume por volume
mm. Milímetros	BBM. <i>Bold basal medium</i>
mg. Miligramas	NPK. Nitrogênio, Fósforo e Potássio
g. Gramas	BGNIM. <i>Blue green nitrogen mix</i>
N. Nitrogênio	rDNA 18s. RNA ribossômico 18S
P. Fósforo	ITS2. Espaçador Transcrito Interno 2
K. Potássio	sp. Abreviatura de espécie
Ca. Cálcio	spp. Abreviatura de espécies
Mg. Magnésio	a.C. Antes de Cristo
Al. Alumínio	V. Vegetativa
Na. Sódio	R. Reprodutiva
Fe. Ferro	VE. Emergência dos cotilédones
Cu. Cobre	VC. Cotilédones completamente abertos e expandidos
Mn. Manganês	ATP. Trifosfato de adenosina
Zn. Zinco	DAS. Dias após semeadura
Mo. Molibdênio	ANOVA. Análise de variância
Se. Selênio	FBN. Fixadores biológicos de nitrogênio
S. Enxofre	Nidera NS 7901 RR. Cultivar de soja da NIDERA com tecnologia de resistência ao glifosato
B. Boro	CG-MS. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
H+Al. Acidez potencial	NIST. Biblioteca da National Institute of Standards and Technology
SB. Soma de Bases	SisGen. Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
CTC (t). Capacidade de Troca Catiônica Efetiva	DIC. Delineamento inteiramente casualizado

CTC (T). Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

MCW. Solução metanol/clorofórmio/H₂O

M. Índice de Saturação de Alumínio

MSTFA. N.metil.N. (trimetilsilil) trifluoroacetamida

V (%). Índice de Saturação de Bases

TCA. Ciclo do ácido cítrico

P-Rem. Fósforo Remanescente

TAG. Triacilglicerol

Co₂. Dióxido de Carbono ou Gás Carbônico

NADH. Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

O₂. Oxigênio

µm. Micrometro

XI. “Onze” Correspondente ao Número Romano

XV. “Quinze” Correspondente ao Número Romano

XVIII. “Dezoito” Correspondente ao Número Romano

XX. “Vinte” Correspondente ao Número Romano

ha¹. Hectare

K₂O. Óxido de Potássio

P₂O₅. Superfosfato Simples

pH. Potencial Hidrogeniônico

NaNO₃. Nitrato de Sódio

K₂HPO₄. Fosfato de Potássio Dibásico Anidro

MgSO₄.7H₂O. Sulfato de Magnésio

CaCl₂.H₂O. Cloreto de Cálcio

Na₂CO₃. Carbonato de Sódio

Na₂EDTA. Ácido Etilenodiaminotetraacético

H₃BO₃. Ácido Bórico

MnCl₂.4H₂O. Cloreto de Manganês II

ZnSO₄.7H₂O. Sulfato de Zinco

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Molibdato de Sódio

Dihidratado

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Sulfato de Cobre

Pentahidratado

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Nitrato de Cobalto

II

°C. Graus Celsius

Atm. Atmosfera

nm. Nanômetros

±. Mais ou Menos

g. Gravidade

µg. Micrograma

ml. Microlitros

min. Minutos

rpm. Rotação por Minuto

log. Escala Logarítmica

R\$. Moeda Real

C. Carbono

NH_4 . Amônio

NH_3 . Amônia

GS. Glutamina Sintetase

GOGAT. Glutamato Sintase

cm. Centímetros

n°. Números

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS	13
SUMÁRIO.....	16
PRIMEIRA PARTE	17
1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 MICROALGAS	19
1.1.1 Aplicações das microalgas	20
1.1.2 <i>Desmodesmus abundans</i>	23
2.2 BIOFERTILIZANTE E BIOESTIMULANTE	25
2.3 SOJA [<i>Glycine max</i> (L.) MERRILL]	27
2.4 METABOLÔMICA.....	31
REFERÊNCIAS	35
SEGUNDA PARTE	48
ARTIGO.....	48
Evaluation of commercial fertilizer as an alternative medium for <i>Desmodesmus abundans</i> (Kirchner) E. Hegewald cultivation and the use of microalgal biomass via foliar application in soybean <i>Glycine max</i> (L.) Merr.....	48
ANEXOS	83

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes que variam de uni a pluricelulares, de procarióticas a eucarióticas, podendo ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres, em virtude da forma de obtenção energética, podendo apresentar metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. Estudos conduzidos nos últimos anos demonstram que as biomassas das microalgas eucarióticas possuem diversas composições bioquímicas, capazes de oferecer produtos, como lipídeos (biocombustível), carboidratos, proteínas e aminoácidos, além do potencial biotecnológico de poderem ser utilizadas em serviços como tratamento de resíduos e biofertilizantes, sendo empregadas como *commodities* e *biorrefinarias* em diversos setores da indústria (DENER et al., 2006; KHAN et al., 2018).

Neste cenário, visando a produção da biomassa microalgal ou moléculas produzidas pelas mesmas de interesse em larga escala, tem-se intensificado o interesse de pesquisadores e indústrias por meios de cultivos mais econômicos. A utilização de fontes comerciais de nutrientes mais acessíveis, como os fertilizantes inorgânicos que possuem composições conhecidas, regularizadas e estabilizadas apresentam potencial de reduzir o custo operacional da produção da biomassa. A utilização de fertilizantes inorgânicos em pequenas quantidades já se mostrou promissor no cultivo de microalgas como a *Pseudokirchneriella subcapitata* (CARVALHO et al., 2012) e *Chlorella sorokiniana* (RIBEIRO et al., 2020). Contudo, as espécies de microalgas possuem sua necessidade nutricional específica para o crescimento e da produção da biomassa, sendo necessários estudos de cultivos utilizando tais formulações.

Os componentes e a composição da biomassa podem variar de acordo com a nutrição fornecida no cultivo. Desta maneira, para contribuir na otimização da produção da biomassa microalgal estão sendo adotadas novas abordagens, como, por exemplo a metabolômica (NAGAPPAN et al., 2020). Trata-se do estudo dos metabólitos, que permitem assim, a melhor compreensão e entendimento dos mecanismos que regulam a biossíntese de moléculas de interesse e a produção da biomassa da microalga cultivada em diferentes formulações. O entendimento dos processos biológicos contribui na otimização da produção da biomassa e, consequentemente na redução dos custos.

Devido aos compostos bioativos servirem como fontes de bioinsumos, as microalgas podem desempenhar importante papel na bioeconomia da agricultura moderna, aumentando a produção de alimentos de maneira à favorecer o ambiente. Neste contexto, as microalgas

eucarióticas do gênero *Desmodesmus* que são reportadas em ambientes aquáticos brasileiros, podem ser fontes de bioinsumos. Isso porque compostos em sua biomassa ou excretados, como fitohormônios, aminoácidos, ácidos orgânicos, exopolissacarídeos, bem como macro e micronutrientes (P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn, Zn, Mo e Se), sua aplicação como bioinsumo pode aumentar o rendimento de culturas agrícolas (BETTANI et al., 2019; MAZEPA et al., 2021).

A aplicação de bioinsumos na agricultura brasileira está absolutamente ligada a cultura da soja, principalmente ao uso de bactérias para a fixação biológica de nitrogênio, bem como o controle biológico de lagartas. Isso porque refere-se à espécie mais cultivada no Brasil e cada vez mais, são empregados esforços para aumentar a produtividade e reduzir as emissões de carbono, caminhando para uma bioeconomia mais sustentável (MEYER et al., 2022). Desta maneira, a soja se torna alvo de constantes pesquisas para avaliar o potencial de produtos ou serviços de origem biológica, como as microalgas.

Sendo assim, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

Avaliar o cultivo da *D. abundans* L2B Bold em dois meios de cultivos, um padrão BG-11 e outro utilizando fertilizante comercial (FC) visando obtenção da biomassa a baixo custo;

Analisar alterações do perfil metabólito da *D. abundans* L2B Bold durante o cultivo nos dois meios utilizados;

Avaliar o potencial da biomassa de *D. abundans* L2B Bold obtida do cultivo utilizando FC como biofertilizante no crescimento e produção da cultura da soja.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MICROALGAS

Algae em latim significa o plural de alga, que foi nomeado por Linnaeus (1735), para designar certas plantas que não possuíam raiz, caule e folhas (BICUDO; MENEZES, 2010). Elas estão presentes em praticamente toda parte, desde ambientes aquáticos (salgado ou doce) até terrestres e não tem origem monofilética, conforme a teoria da endossimbiose dos cloroplastos e das mitocôndrias (DERNER et al., 2006). As algas constituem um grupo polifilético e são definidas como organismos fotossintetizantes, que variam de unicelulares a multicelulares, cujos órgãos de reprodução não são envolvidos por camada de células estéreis (DERNER et al., 2006; BICUDO; MENEZES, 2010).

Devido à grande variabilidade, as algas se dividem em dois grupos. As macroalgas são as algas macroscópicas e multicelulares, sendo a maioria marinhas, podendo atingir 50 metros de comprimentos (HUGHES et al., 2012), apresentam estruturas com elevado grau de complexidade. As microalgas, foco deste estudo apresentam dimensões menores, onde podemos encontrar microalgas com apenas 0,001 mm de diâmetro, sendo estas visualizadas apenas com auxílio de lupa e microscópio, bem como, apresentam estruturas mais simples (BICUDO; MENEZES, 2010).

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes uni e pluricelulares de sistemas de água doce e marinha, e oferecem um potencial industrial extremamente interessante (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). Além disso, colonizam com sucesso também nichos terrestres, onde podem ser encontradas em densidades populacionais que variam entre 3 e 100 milhões de células por grama de solo superficial (KUTÍLEK; NIELSEN, 2015). Estas podem ser procarióticas, por exemplo, as cianobactérias (cloroxibactérias), das quais, são os únicos procariontes capazes de produzir oxigênio (SINGH; BAUDDH; BUX, 2015) e eucarióticas, as quais compreendem as diatomáceas (Bacillariophyta), responsáveis pela maior parte do oxigênio que respiramos, algas verdes (Chlorophyta), vermelhas (Rhodophyta), marrom (Phaeophyta), Euglenophyta, Pyrrophyta, Chrysophyta (PIGNOLET et al., 2013).

As cianobactérias, junto com as bactérias são uns dos seres mais antigos, cujas primeiras evidências de vida ocorreram no período pré-cambriano, há aproximadamente 2,7 bilhões de anos (BICUDO; MENEZES, 2010). Sua morfologia, bioquímica e fisiologia permitiram que esse grupo se adaptasse a habitats distintos (PALINSKA et al., 2006). A diversidade deste grupo

foi estudada junto com as microalgas eucarióticas, tradicionalmente, porque ambas ocorrem em habitats aquáticos e compartilham da propriedade oxigênica (PALINSKA et al., 2006).

As microalgas eucarióticas, possuem estruturas mais complexas e são reconhecidas com base nos pigmentos fotossintéticos, que representam as combinações de moléculas de clorofila (WIN et al., 2018). As clorófitas ou algas verdes, possuem as clorofilas *a* e *b*; as rodófitas ou algas vermelhas, clorofila *a*, enquanto as cromófitas ou algas castanho-amareladas, clorofilas *a* e *c* (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Utilizam água, CO₂ e nutrientes para ganho de biomassa (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos) (RAJA et al., 2008), sendo responsáveis por mais da metade da atividade fotossintética do planeta (SIMÕES et al., 2016).

As microalgas podem apresentar três diferentes formas de obtenção de energia, tais como, autotrófico, heterotrófico, mixotrófico (PEREZ-GARCIA et al., 2011; MARCHELLO et al., 2018). Microalgas autotróficas, utilizam luz e o CO₂ como fonte inorgânica de carbono para produção de energia química por meio de reações de fotossíntese (ANGELO; ANDRADE; FILHO, 2014) resultando em carboidratos [(CH₂O)_n] e oxigênio (O₂) (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). O cultivo destes organismos pode ser realizado em fotobiorreatores (sistemas fechados) ou lagoas fotossintéticas (sistemas abertos), em ambos, deve haver boa iluminação, pois necessitam de condições de cultivos adequadas ao processo de fotossíntese (PEREIRA et al., 2012).

Já as microalgas heterotróficas, utilizam compostos orgânicos externo, através da decomposição da matéria orgânica ou adição de fonte de carbono, como açúcares (ANGELO; ANDRADE; FILHO, 2014), os quais podem ser utilizados também como fontes de energia, apresentando alta taxa de crescimento e produtividade. Por sua vez, as microalgas mixotróficas representam a combinação dos dois sistemas, podendo a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos ocorrer concomitantemente, o que permite aumentar a sua produtividade (ANGELO; ANDRADE; FILHO, 2014). Algumas microalgas são capazes de combinar os dois metabolismos (autotrófico e heterotrófico), melhorando sua performance, como a *Chlorella vulgaris* (MIAO et al., 2016), *Chlamydomonas* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Desmodesmus spinosus*, *Haematococcus pluvialis*, *Monoraphidium* sp., *Scenedesmus quadricauda* e *Tetraselmis gracilis* (CANDIDO; LOMBARDI, 2020).

1.1.1 Aplicações das microalgas

Estimativas recentes, mostram que existem cerca de 800 mil espécies, porém, apenas 40 a 50 mil espécies de microalgas foram identificadas (ZUCCARO et al., 2020). O Brasil

possui cerca de 3,5 mil espécies catalogadas (EMBRAPA, 2016). Em função dessa diversidade, as microalgas apresentam grande variedade de composições bioquímicas, tornando-as fontes de quantidade ilimitada de produtos, tais como, pigmentos, antioxidantes, betacaroteno, polissacarídeos, triglicerídeos, ácidos graxos, vitaminas e biomassa que podem ser usadas como *commodities* e *biorrefinarias* em diversos setores da indústria (DERNER et al., 2006; EMBRAPA, 2016; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; KHAN; SHIN; KIM, 2018).

Devido aos seus recursos biológicos, as microalgas são utilizadas para tratamento de efluentes (DE CAMPOS et al., 2018; FERNÁNDEZ-LINARES et al., 2017; LIU et al., 2020), na indústria alimentícia (SOLETO et al., 2005; GATEAU et al., 2017), farmacêuticas (RANIA; HALA, 2008; BASHEER et al., 2020), enriquecimento de rações de animais e em especial peixes (SPOLAORE et al., 2006; YADAV et al., 2020). Entretanto, atualmente, a principal aplicação é a produção de biocombustível, pois as fontes de combustíveis não renováveis tendem a se esgotar (MAGRO et al., 2016). Conhecido como biocombustíveis de terceira geração, são obtidos através da biomassa das microalgas (VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011) os quais, tem demonstrado serem excelente fonte de matéria prima, em virtude da capacidade de armazenar grandes quantidades de lipídios e carboidratos (CHISTI, 2007; HO et al., 2013; CHOO et al., 2020).

As microalgas também possuem potencial como fertilizantes biológicos e condicionadores do solo, devido a seus compostos bioativos e sua biomassa como fonte energética (FAHEED; FATTAH, 2008; GARCIA-GONZALEZ; SOMMERFELD, 2016; CHATTERJEE et al., 2017; CHIAIESE et al., 2018; BRAUN; COLLA, 2022). No solo, atuam como biofertilizante, podendo formar biofilme, contribuindo na redução da perda de umidade, fornecendo fonte de carbono (exopolissacarídeo), além de favorecerem o crescimento de microrganismos benéficos, aumentando a atividade enzimática e microbiológica do solo (PRASANNA et al., 2014; CASTRO et al., 2016), melhorando o rendimento das culturas. A biomassa de microalgas contém macro e micronutrientes, especialmente nitrogênio, fósforo e potássio, sendo considerada como um fertilizante orgânico de liberação lenta (COPPENS et al., 2016; BETTANI et al., 2019; RONGA et al., 2019). Estudos recentes sugerem que a mineralização da biomassa pode ocorrer em um período de 20-30 dias, disponibilizando os nutrientes para a planta (COPPENS et al., 2016; GARCIA-GONZALES; SOMMERFELD, 2016).

Na planta, atuam como bioestimulante (CHATTERJEE et al., 2017; RONGA et al., 2019), pois as microalgas possuem em seu meio intracelular, substâncias como os fitohormônios

das classes auxina, citocinina, giberelina (STIRK et al., 2013; LU; XU, 2015; MAZEPA et al., 2021), aminoácidos e ácidos graxos (GHOSH et al., 2022; BRAUN; COLLA, 2022), que estimulam o metabolismo de aminoácidos, melhorando aspectos da fisiologia vegetal, aumentando o crescimento e rendimento das culturas (CORDEIRO et al., 2022), bem como, melhorando a tolerância a estresses bióticos e abióticos (BARONE et al., 2018). A aplicação foliar de extratos de *Chlorella vulgaris*, melhorou o crescimento e o número total e massa dos legumes de *Vigna mungo* (L.) aumentando também a composição centesimal (umidade, proteínas e lipídeos brutos, fibras e teor de cinzas) dos grãos (DINESHKUMAR et al., 2020).

Apesar de ter demonstrado potencial para aplicação industrial, a produção de biomassa microalgal, tem sido um desafio (BRAUN; COLLA, 2022), devido à necessidade de condições ambientais específicas para cada espécie cultivada, incluindo faixas de temperatura, intensidade de luz, condições de mistura, trocas gasosas e principalmente a composição de nutrientes (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Isso porque, o meio de cultivo é o segundo componente mais caro deste processo (VONSHAK, 1997), podendo representar 40 a 60% do custo (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008). Assim, estão sendo desenvolvidas diversas formulações de meio de cultivo, a fim de maximizar a produção da biomassa e moléculas de interesse de microalgas, uma vez que, cada organismo possui uma necessidade específica de nutrientes (FÁBREGAS et al., 2000; COLUSSE et al., 2019).

Meios de cultivo com o *bold basal medium* (BBM) (NICHOLS; BOLD, 1965), *acidified bold medium* (ABM) (NICHOLS; BOLD, 1965), *blue-green algae medium* (BG-11) (STANIER et al., 1971; ILAVARASI et al., 2011) e *Chu medium* (BOLD; WYNNE, 1978), são exemplos dos mais utilizados para microalgas. Tais formulações utilizam composições com grau analítico, no qual, elevam o custo operacional de qualquer aplicação das microalgas. O estudo de Colusse et al. (2019) sobre efeito de meios de cultivo em escala laboratorial, com a microalga *Haematococcus pluvialis*, constataram que para a produção de 1 kg de biomassa seca, no meio CHU e BG-11, o custo aproximado é de R\$ 70,00 e 130,00, respectivamente.

Portanto, há o esforço para a busca de meios alternativos de cultivo mais baratos visando a produção em larga escala. Efluentes, como águas residuais, tem tido sucesso no cultivo das microalgas (LIU et al., 2020), porém, a composição variada dos nutrientes, bem como, contaminação por metais pesados, podem acarretar numa baixa produção de biomassa (CHRISTENSON; SIMS, 2011). Diante disso, o desenvolvimento de meios utilizando fontes comerciais de nutrientes com maior acessibilidade, como os fertilizantes inorgânicos podem ser uma alternativa visando diminuir o custo de produção da biomassa, tornando-a mais acessível.

Um exemplo desse tipo de abordagem é o estudo relatado por Carvalho et al. (2012), o qual resultou na otimização do crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* com fertilizante NPK nas concentrações 20, 0,5 e 20% (v/v).

Ribeiro et al. (2020), desenvolveram meio de cultivo para a microalga *Chlorella sorokiniana* à base de fertilizantes, denominado *Blue Green Nitrogen Mix* (BGNIM), composto por 510 mg L⁻¹ de ureia, 35 mg L⁻¹ de fosfato monoamônico, 75 mg L⁻¹ de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 40 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio e 100 mg L⁻¹ de mix de micronutrientes. Os autores constataram que a produção da biomassa foi semelhante a encontrada no meio de grau analítico BG-11, reduzindo o custo de produção em 95%. Contudo, as espécies de microalgas possuem sua necessidade nutricional relativa para crescimento e otimização da produção de biomassa (FÁBREGAS et al., 2000), portanto, são necessários estudos visando potencializar o cultivo de microalgas como a *Desmodesmus abundans* L2B Bold utilizando um meio com fertilizantes inorgânicos, visando reduzir a obtenção da biomassa.

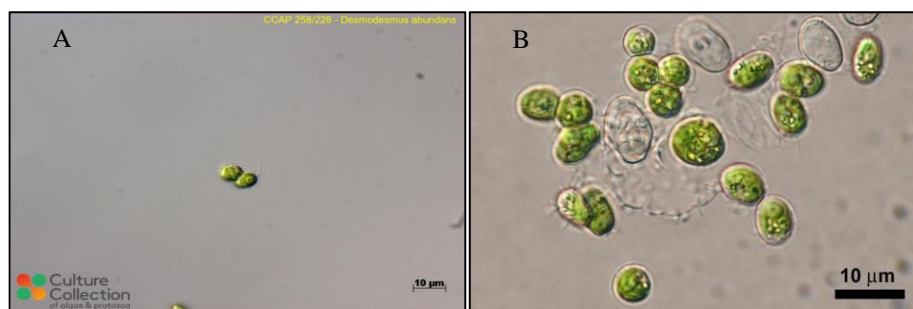
1.1.2 *Desmodesmus abundans*

Desmodesmus (Chodat) An, Friedl e Hegewald é gênero comum de águas continentais, solo e crostas microbióticas (HILTON; TRAINOR, 1963; LEWIS; FLECHTNER, 2004; HENTSCHKE; TORGAN, 2010). Este gênero pertence ao domínio Eukaryota, reino Plantae, filo Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordem Sphaeropleales, família *Scenedesmaceae*, subfamília *Desmodesmoideae* (HEGEWALD, 2000; AN; FRIEDL; HEGEWALD, 1999). Atualmente, existem 68 nomes de espécies no banco de dados, além de 47 nomes infra-específicos (ZHENG et al., 2014; GUIRY; GUIRY, 2020). Inicialmente, elas costumavam ser o subgênero com mais espécies do *Scenedesmus*, porém, após estudo molecular do rDNA 18s e ITS2, recebeu o status de gênero (KESSLER et al., 1997; AN; FRIEDL; HEGEWALD, 1999; JOHNSON; FAWLEY; FAWLEY, 2007).

Essas microalgas são encontradas nas mais variadas formas, dentre elas, elipsoidal a ovoides, extremas lineares a côncavas, muitas vezes, com extremidade arredondadas a cônicas, podendo também variar quanto ao número de células e cenóbios, unicelular ou com cenóbio de 4, 8, 16 e até 32 células (JOHNSON; FAWLEY; FAWLEY, 2007), que se encontram de forma alinhada ou alternada, apresentando cloroplasto único, parietal e com um pirenoide, características morfológicas de tamanha diversidade, que dificultam a classificação sistemática das mesmas (TRAINOR, 1998). Suas medidas celulares podem variar de 7 a 19 µm de comprimento e de 2 a 6 µm de largura (MORESCO; BUENO, 2007). O gênero *Desmodesmus*

se difere do gênero *Scenedesmus*, por apresentarem espinhos, tanto nas células extremas como nas intermediárias (HEGEWALD, 2005), mas podem ser encontradas microalgas sem espinhos, como a *Desmodesmus abundans* (Figura 1A) e *D. subspicatus* (FIGURA 1B).

Figura 1. Células da microalga *D. abundans* (A) e *D. subspicatus* (B).



Fonte: Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCAO, 2020). Disponível em <<https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-258-228>> e <<http://ccala.butbn.cas.cz/en/Desmodesmus-subspicatus-r-chodat-e-hegewald-et-a-schmidt-0>>. Acesso em 24 Mar 2020.

A família *Scenedesmaceae* é comumente relatada no Brasil, nos mais diversos ambientes aquáticos (MENEZES et al., 2014), geralmente em ambientes ricos de nutrientes (DOMINGUES; TORGAN, 2012). O gênero *Desmodesmus* apresenta metabolismo autotrófico, porém, as espécies deste gênero são facilmente cultivadas em sistemas mixotróficos. Por crescerem facilmente em cultivos, inclusive em meio à base de fertilizantes químicos (ABDULSAMAD et al., 2019), essas microalgas são alvos de muitos estudos, principalmente em relação a produção de biocombustíveis, pelo elevado conteúdo de lipídios (JI et al., 2015). Também são utilizadas para formulação de rações de animais como peixes e porcos (EKMAY et al., 2014), bem como, crescem em águas residuais, contribuindo na remoção de substâncias tóxicas, provenientes destes resíduos, sendo assim, aplicadas como biorremediadores de efluentes (JI et al., 2014; 2015).

A microalga do nosso estudo trata-se da espécie *Desmodesmus abundans* (Kirchner) E. Hegewald, encontrada em vários continentes e, já foi identificada no Brasil, nos estados do Rio de Janeiro (BICUDO; MENEZES, 2010), Paraná (DUNCK et al., 2018) e Minas Gerais (BONETT et al., 2020). A cepa em estudo foi isolada e identificada por Bonett et al. (2020) de lagoas do município de Ijaci, situado no estado de Minas Gerais, Brasil. A espécie é autotrófica, mas apresentou maior produção de biomassa, lipídeos, pigmentos e carboidratos no cultivo mixotrófico, utilizando soro de leite como substrato, apresentando grande potencial de estudo e aplicação biotecnológica.

Estudos recentes conduzidos por Bettani et al. (2019) utilizando outra espécie do gênero *Desmodesmus*, no caso, *D. subspicatus*, demonstraram que a microalga pode ser fonte complementar de nitrogênio e micronutrientes como o cobre, ferro e zinco quando aplicada como biofertilizantes em solos, bem como, promovem maior liberação da matéria solúvel e taxa de biodegradação, contribuindo para a fertilidade do solo. Suspensões celulares de *D. subspicatus* aplicadas via foliar em mudas de tomateiro, promoveram crescimento da área foliar e do sistema radicular, apresentando atividade bioestimulante, mediada pela Zeatina, um fitohormônio da classe das citocininas identificada na biomassa da microalga (MAZEPA et al., 2021). Demonstrando grande potencial para aplicação no solo como biofertilizante e na planta, como bioestimulante.

2.2 BIOFERTILIZANTE E BIOESTIMULANTE

A população humana aumenta de forma exponencial com um crescimento de mais de 80 milhões por ano, segundo a Organização das Nações Unidas, atingindo atualmente aproximadamente 8 bilhões de pessoas no mundo (ONU, 2022), existe uma constante preocupação para conseguir alimentar esta população, sendo a agricultura moderna por meio do desenvolvendo de técnicas e produtos que aumentem a produção de culturas sem estender o espaço territorial a forma mais adequada para atender tal demanda (MOCKSHELL; VILLARINO; ELIZA, 2018).

Entre as práticas agrícolas mais empregadas, temos a utilização de fertilizantes químicos (MELO, 1975), sendo mais aplicados os fertilizantes sintéticos nitrogenados, porém, essa aplicação fornece eficiência global em torno de 50%, pois boa parte deste nitrogênio é perdido ou imobilizado na biomassa microbiana para o ambiente (MOTA et al., 2015), além de aumentar o nitrato em águas subterrâneas e superficiais (SAVCI, 2012; IFTIKHAR et al., 2019). Juntamente com o nitrogênio, o fósforo e o potássio, fazem parte da base de fertilizantes agrícolas, e o emprego dos mesmos está diretamente relacionado ao aumento da produção (YIN et al., 2018).

Neste cenário, surge a preocupação de melhorar sistemas de cultivos, empregando novas técnicas, pois há necessidade de elevar a produção de alimentos em 35% até 2030, para atingir a demanda global (ALEXANDRATOS; BRUINSMA et al., 2012). No entanto, o aumento da produção deve levar em consideração o equilíbrio entre a população e o ambiente, promovendo sistemas mais integrados com a bioeconomia, impulsionando a utilização de bioinsumos para o desenvolvimento mais sustentável da agricultura moderna (EMBRAPA, 2018).

Um dos caminhos para tal efeito é o estudo com biofertilizante e/ou bioestimulantes, dos quais, são definidos como os compostos orgânicos que contém microrganismos vivos ou inativos (bactérias, actinomicetos, fungos e algas) que promovem a liberação e/ou fixação de nutrientes essenciais, como nitrogênio, fósforo, potássio e outros nutrientes minerais (REDDY; SARAVANAN, 2013; WIN et al., 2018), além da secreção de substâncias promotoras de crescimento para melhorar o crescimento e rendimento da cultura (DINESHKUMAR et al., 2018, 2019).

No Brasil, o termo do biofertilizante é contemplado na instrução Normativa N° 46 de 06 de Outubro de 2011 (Produção vegetal e animal) “produto que contém componentes ativos ou agentes biológicos, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção e que seja isento de substâncias proibidas pela regulamentação de orgânicos” (BRASIL, 2011).

A utilização de microrganismos como alternativa para o uso tradicional de fertilizantes químicos já vem sendo empregada, principalmente em microrganismos do solo, como a bactéria *Rhizobium* spp. que infecta as raízes das plantas leguminosas (exemplo, soja e feijão), formando nódulos que fixam nitrogênio (HUNGRIA et al., 1994; FATIMA; ZIA; CHAUDHARY, 2007). Devido ao sucesso obtido com a introdução desses microrganismos no solo ou substâncias provenientes de seu metabolismo, tem-se intensificado o estudo com outros microrganismos, destacando-se no momento as microalgas, as quais surgem como opção para tal efeito (CHIAIESE et al., 2018; BRAUN; COLLA, 2022).

Compostos como aminoácidos, ácidos graxos e, principalmente os fitohormônios, das classes auxinas, citocininas e giberelinas das microalgas (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; STIRK et al., 2013; LU; XU et al., 2015; MAZEPA et al., 2021; GHOSH et al., 2022), apresentam grande potencial de bioestimulante, ao serem aplicados via foliar nas culturas vegetais (AMER et al., 2019; GUO et al., 2020). Diferentes estudos comprovaram seus benefícios no aumento do crescimento da planta, rendimento, fisiologia, clorofila, fotossíntese, permanência da citomembrana e biocontrole de patógenos de plantas (LI et al., 2014; ABDEL-HAFEZ; ABO-ELYOUSR; ABDEL-RAHIM, 2015; GRZESIK; ROMANOWSKA-DUDA; KALAJU, 2017; CORDEIRO et al., 2022; GOSH et al., 2022). A pulverização foliar de extratos de microalgas tem apresentado também, aumento da eficiência do uso de água e no funcionamento estomático em plantas (LI et al., 2014).

Os nutrientes disponíveis nos extratos de microalgas são prontamente absorvidos pela folha através de seus estômatos e cutícula, apresentando melhor eficácia se aplicados em horas

mais amenas do dia (baixa radiação) e com boa umidade, quando os estômatos estão completamente abertos (BATTACHARYYA et al., 2015; MEYER et al., 2022). As respostas das plantas aos nutrientes fornecidos via pulverização foliar são normalmente mais rápidas do que quando aplicadas como suplemento do solo. Por meio da aplicação foliar, as microalgas podem fornecer nutrientes e metabólitos para a planta e levar a um maior crescimento da planta (RENUKA et al., 2016; 2018; SARY; EL-NWEHY; MOKHTAR, 2020; BRAUN; COLLA, 2022).

A aplicação foliar da biomassa de *Asterarcys quadricellulare* aumentou o rendimento da batata (*Solanum tuberosum*) e desencadeou alterações bioquímicas que melhoram a atividade da clorofila, aminoácidos, açúcar e nitrato redutase, devido principalmente à assimilação de nitrogênio das plantas pela ação da microalga (CORDEIRO et al., 2022). A pulverização de extratos de *Chlorella vulgaris* sobre *Vigna mungo* (L.) aumentou o número de nódulos radiculares e atributos de rendimentos da cultura, bem como, incrementou a composição centesimal dos grãos (DINESHKUMAR et al., 2020). Ademais, na microalga *D. subspicatus* foi identificada a citocinina Zeatina e, quando as suspensões celulares foram aplicadas sobre mudas de tomateiro estimularam o crescimento do sistema radicular, através da divisão das células e expansão da área foliar das mudas, promovendo maior rendimento (MAZEPA et al., 2021).

Desta maneira, a utilização de biofertilizantes e/ou bioestimulantes à base de microalgas verdes podem ser uma alternativa para o aumento da produção de alimentos, reduzindo a dependência de moléculas químicas de custo elevado, bem como, contribuindo para a bioeconomia mundial, através do uso de fontes mais sustentáveis, se adaptando as políticas de agrícolas atuais.

2.3 SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL]

A soja é uma planta pertencente a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), sub-família Faboidae, Gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (L.) Merrill. A soja teve sua origem na costa leste da Ásia, em torno do Rio Yangtse, na China, surgindo do cruzamento natural entre duas plantas rasteiras de espécies selvagens, que vieram a ser domesticadas e, conseqüentemente melhoradas por cientistas na China por volta do século XI a.C (HYMOWITZ, 1970). O grão era considerado sagrado junto com arroz, trigo e cevada, aos quais os povos realizavam cerimônias e rituais na hora de colher, como forma de agradecimento (BONATO; BONATO, 1987). A China e o Japão cultivavam a

soja, sendo inclusive, a origem do seu nome, pois a palavra “soja” vem da tradução japonesa “shoyu”.

A espécie foi introduzida nos jardins botânicos da Europa no final do século XV, como forma de curiosidade e começaram os estudos com brotos de soja no século XVIII (HARLAN, 1975). Apenas no século XX, foi que a soja começou a despertar interesse de indústrias mundiais, devido ao teor de óleo e proteína dos grãos, com cultivo principalmente nos Estados Unidos. Aliás o marco da consolidação da cadeia produtiva da soja em esfera mundial se deve a criação da *American Soybean Association* (ASA) em torno de 1921. No Brasil, apesar de relatos de cultivos na Bahia em meados de 1882 (D’UTRA, 1882), foi introduzida em 1901, quando começaram os cultivos na Estação Agropecuária de Campinas. Após a intensificação da migração japonesa, o grão veio a ser difundido e, teve grande expansão nos anos de 1970 (VERNETTI, 1977; DALL’AGNOL, 2016).

Trata-se de uma espécie herbácea, ereta, com caule hispido, raiz principal e muitas adventícias. As folhas são trifoliadas, exceto o primeiro par e suas flores de fecundação autógama são de cor branca, roxa ou intermediária, típica da família das Leguminosas (BORÉM, 1999). O fruto da soja é a vagem ou legume, que se forma após 20 a 25 dias do florescimento, e são levemente arqueadas, sendo que o número de legumes e grãos (até 5 grãos) variam de acordo com cada cultivar, podendo apresentar cores diferentes à medida que amadurecem, evoluem da cor verde para tonalidades da cor amarela, marrom ou preta. Os grãos podem ser esféricos, ovulado ou achatado, a cor do hilo varia de marrom, cinza ou preta (VERNETTI; GASTAL, 1979). Possuem crescimento determinado (racemo), indeterminado (sem racemo terminal) ou semideterminado (intermediário).

A planta possui grande variabilidade genética, por estar sob sucessivo melhoramento, de maneira geral, as principais cultivares possuem estatura de 60 a 200 cm de altura e o ciclo pode variar de 70 a 200 dias. O ciclo é dividido em duas fases, vegetativa (V) e reprodutiva (R), proposto por Fehr e Caviness (1977). Os dois primeiros estágios são o VE que é para designar a emergência dos cotilédones e VC representa cotilédones completamente aberto e expandidos. Após o VC, as subdivisões dos estádios vegetativos são numeradas sequencialmente (V1, V2, V3, ... Vn, onde Vn é o último nó, no topo da planta, com folha completamente desenvolvida). Os estágios reprodutivos (R), abrangem quatro fases, florescimento (R1 e R2), desenvolvimento do legume (R3 e R4) e dos grãos (R5 e R6), ao final, maturação dos grãos (R7 e R8) (FEHR; CAVINESS, 1977; NEUMAIR et al., 2000).

A soja é principal oleaginosa produzida e cultivada no mundo devido ao seu grão ser rico em proteínas (40%), óleo (29%), fibras (19%) e carboidratos solúveis (9%), minerais, como cálcio, fósforo, ferro e potássio (4%) e restante de água (13%) (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014; MEDIC et al., 2014). Sendo assim, a soja tornou-se excelente fonte na alimentação humana e animal, além de usos industriais e produção de biocombustíveis. Devido a ser referência da fonte de alimentação, especialmente a proteína e o óleo vegetal, a soja vem batendo recordes de áreas cultivadas e produção, tornando o mercado para a cultura muito sólido (PAGANO; MIRANSARI, 2016).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de soja do mundo, seguido dos Estados Unidos e Argentina. A produção da oleaginosa no Brasil em 2021 gerou 137,32 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2022), com estimativas de 140,50 milhões de toneladas colhidas da semente no ano de 2022 (CONAB, 2022; SOYSTATATS, 2022; USDA, 2022). Em Minas Gerais, a cultura continua em crescimento de área cultivada, atingindo cerca de 1931,6 mil hectares (CONAB, 2022). Além disso, o país virou referência de exportação dos grãos, para países mais desenvolvidos que utilizam a soja para produção da proteína animal, bem como para consumo humano.

Para o cultivo de soja, as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo são importantes. Para as propriedades físicas, o tipo de estrutura do solo, seu manejo e cultivo influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas de soja (SFREDO, 2008). O manejo adequado proporciona melhor otimização dos processos químicos e microbiológicos do solo, por meio, principalmente da matéria orgânica. Portanto, sistemas como o plantio direto, tem tido sucesso no cultivo de soja, pois quando bem implementado, contribui para maior estoque de carbono e produtividade, diminuindo a vulnerabilidade às condições climáticas, melhorando as qualidades do solo (PEREIRA et al., 2011).

No que se refere as propriedades químicas, para obter fertilização adequada, deve-se, primeiramente, realizar a análise do solo e, posteriormente aplicadas as doses necessárias para alcançar as exigências nutricionais da soja (BORKET et al., 1994; MALAVOLTA, 2006). O nitrogênio é o macronutriente exigido em maior quantidade, devido a diversas reações que desencadeiam no metabolismo da planta, bem como pelo fato dos grãos da soja possuírem 40% de proteínas (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014), sendo o N o componente essencial. Estima-se que a soja requer cerca de 80 kg de N para cada tonelada de produção (CRISPINO et al., 2001). As fontes podem ser decorrentes da decomposição da matéria orgânica no solo, fertilizantes nitrogenados ou através da fixação biológica, por bactérias que estabelecem

simbiose com a soja formando nódulos que fixam nitrogênio atmosférico diretamente nas raízes (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

O segundo nutriente requerido em quantidade é o potássio, o qual tem função no crescimento e metabolismo como ativação enzimática, síntese proteica, fotossíntese, entre outros (TAIZ et al., 2017). A fertilização varia de 80 a 150 kg de K_2O ha^{-1} (60% de K), dependendo do tipo do solo (BROCH; RANNO, 2012; PRIMIERI; SANTOS, 2017). Já o fósforo, para completar a fertilização da base dos solos agrícolas, na soja uma função é a formulação do ATP, que é a fonte de energia utilizada no aparato fotossintético (TAIZ et al., 2017), sendo recomendada doses de 60 até 400 kg ha^{-1} de P_2O_5 (18% de P) (PRIMIERI; SANTOS, 2017).

Outros macronutrientes como o enxofre e a correção por calagem que visam diminuir a acidez do solo (aumento de pH), adição de cálcio e magnésio também são importantes para a exigência nutricional do cultivo da soja (REZENDE et al., 2009). Embora micronutrientes são requeridos em pequenas quantidades, as respostas no aumento da produção dos grãos são consideráveis. A recomendação depende da análise do solo, mas são utilizados o zinco, boro, cobre, manganês, molibdênio e cobalto (SOUSA; LOBATO, 1996). Contudo, apesar das sucessivas expansões de territórios agrícolas e elevados aumentos de produção, trata-se de uma cultura com grande exigência nutricional (PRIMIERI; SANTOS, 2017), alcançada através da fertilização, porém, tais fontes não são renováveis, o que com o passar dos anos estão se tornando menos acessíveis. Além disso, o número de moléculas químicas normalmente empregadas na agricultura vem sendo reduzidas periodicamente.

Neste contexto, surgem várias alternativas para minimizar o uso de fertilizantes agrícolas e suprir a demanda por produtos mais sustentáveis, como os bioinsumos, contribuindo para a bioeconomia no cenário nacional e mundial, adequando-se as novas políticas vigentes da agricultura (EMBRAPA, 2018). Atualmente, o Brasil é líder mundial no uso de bioinsumos na cultura da soja (MEYER et al., 2022), sendo alvos de pesquisas e aplicações, das quais se dividem em grupos de prospecção de microrganismos, de macrorganismos, de metabólitos, de extratos vegetais, algas e formulações. Alguns bioinsumos já estão bem difundidos na cultura, como o uso de fixadores biológicos de nitrogênio (FBN), os quais são bactérias que colonizam as raízes e fixam o N atmosférico em uma relação mutualística (HUNGRIA et al., 1994). Ademais, o controle biológico da lagarta da soja, mediado por *Bacillus thuringiensis* (STEWART et al., 1996), bem como o controle do mofo-branco pelo *Trichoderma harzianum* (SRIVASTAVA et al., 1996).

Desta maneira, surgem novas alternativas de produção de soja, sendo um dos caminhos os biofertilizantes e bioestimulantes à base de extratos de algas marinhas e microalgas verdes, que podem ser aplicadas diretamente no solo ou via foliar. Extratos de algas marinhas aplicados via foliar são capazes de aumentar o número de legumes e rendimentos dos grãos da soja (ANISIMOV; CHAIKINA, 2014; KOCIRA et al., 2018). Entretanto não foram encontrados relatos da aplicação via foliar da biomassa de microalgas verdes nas plantas de soja, sendo um grande potencial de futuras pesquisas, visando novas alternativas de bioinsumos na cultura. Isso porque, são microrganismos que podem ser cultivados em terras não agricultáveis (VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011), utilizar resíduos como fontes de nutrientes (JI et al., 2015), bem como capturam eficientemente emissões de carbono (GOSH et al., 2022), produzindo moléculas bioativas (STIRK et al., 2013; LU; XU, 2015) com ação em vegetais.

No nosso estudo para avaliar a ação da biomassa microalgal de *Desmodesmus abundans* L2B Bold como fonte de bioinsumos em soja (*G. max*), foi utilizada a cultivar Nidera NS 7901 RR. A cultivar apresenta características de crescimento indeterminado sendo que o ciclo de cultivo varia de 118 a 128 dias, com alta performance produtiva e massa de grãos elevada, tolerância a chuva de colheita, adaptabilidade e rusticidade em ambientes, que permitem ser cultivadas no Tocantins, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás. Proveniente de cultivar transgênica com tecnologia RR, isto é, resistência ao glifosato, bem como, resistência ao cancro da haste, *fitóftora* raça 1 e *cercospora* (NIDERA, 2022).

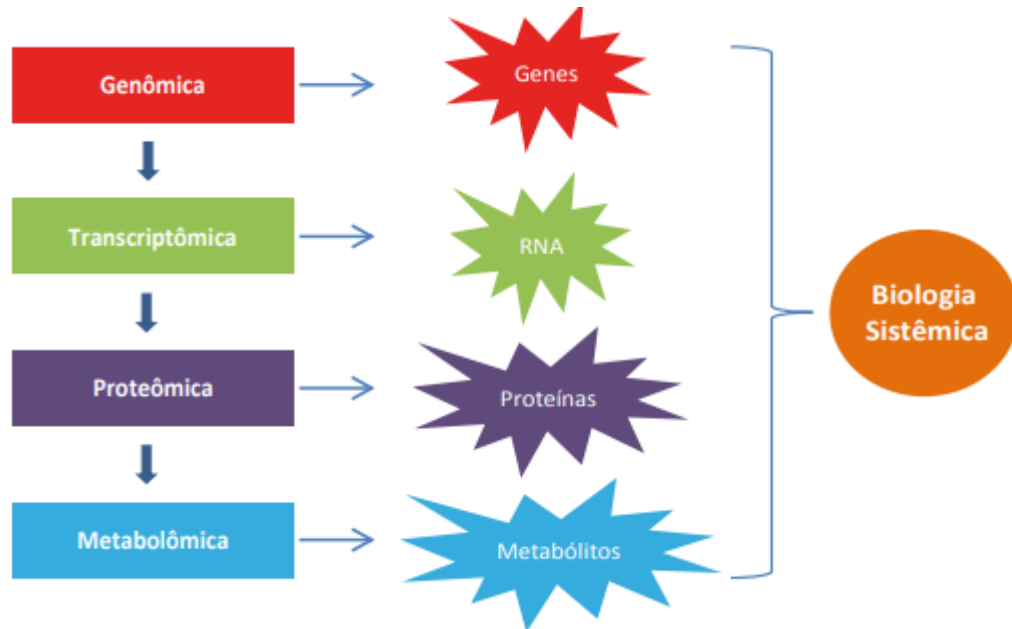
2.4 METABOLÔMICA

Os avanços tecnológicos e a procura por respostas mais sistêmicas permitiram o surgimento de uma nova era, a chamada “Era das Ômicas” (KILDEGAARD et al., 2013). Apesar da genômica estar bem avançada, há necessidade de se compreender o organismo em nível sistêmico, na qual um gene não é mais estudado como entidade isolada, mas sim como sendo parte de uma rede complexa, pois, no organismo somente o genoma permanece constante, independente do estágio de desenvolvimento, tecido ou condição ambiental (KILDEGAARD et al., 2013).

As ciências ômicas concernem a área da genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (Figura 2). A genômica é o estudo focado na caracterização do conteúdo de genomas inteiro ou genomas de representação reduzida (ABDELNUR, 2011). A transcriptômica visa caracterizar a expressão gênica em organismos inteiros e/ ou tecidos

específicos (PORTNOY et al., 2020). A proteômica é o estudo em larga escala das proteínas (CHANDRAMOULI; QIAN, 2009).

Figura 2. Conjunto das áreas das ciências ômicas e correlação com biologia sistêmica.



Fonte: Abdelnur, 2011.

O termo “perfil metabólico” foi introduzido por Horning e Horning em 1971, onde os pesquisadores realizaram um estudo na urina e extrato de tecido humano, dos quais, detectaram compostos presentes nas amostras utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) (HORNING; HORNING, 1971). A metabolômica, surgiu como termo na década de 90, sendo definida como o estudo dos metabólitos em larga escala (FUNARI et al., 2013). Caracteriza-se pela análise qualitativa e quantitativa dos metabólitos, em um estado fisiológico ou de desenvolvimento de uma célula, tecido ou organismo (KOEK et al., 2011; NICKLER et al., 2015).

A metabolômica é designada como a genômica funcional, pois os metabólitos são provenientes dos genes ativos naquele tempo e local (SAITO; MATSUDA, 2010). Pode ser dividida em duas categorias, alvo (*Target*) e global (*Untarget*). A metabolômica alvo, é a análise direcionada a grupos conhecidos, sendo que através do uso de padrões internos, pode ser realizada de maneira quantitativa ou semi-quantitativa (DUDLEY et al., 2010; CANUTO et al., 2018). Já a metabolômica global, é a análise do perfil de todos os metabólitos, contidas no sistema biológico em estudo (ROBERTS et al., 2012; CANUTO et al., 2018).

Para realizar a metabolômica, deve-se conhecer bem o organismo que se está trabalhando. Por se tratar do produto final, o metaboloma dos organismos, qualquer variação

poderá mudar o perfil metabólico o que pode ocasionar em perda de experimento, bem como, resultados não confiáveis (SAITO; MATSUDA, 2010; MUSHTAQ et al., 2014). Neste sentido, é necessário realizar a parada do metabolismo ou *quenching* metabólico (KRONTHALER; GSTRAUNTHALER; HEEL, 2012), bem como, utilizar diferentes combinações de solventes, para realizar a extração dos metabólitos, devido à presença de grande variedade (MUSHTAQ et al., 2014).

Para a obtenção de perfis, é necessário empregar técnicas analíticas de alto poder de resolução, pois trata-se de uma molécula de baixo peso molecular (CANUTO et al., 2018). Diversas técnicas são utilizadas para a avaliação da produção destes metabólitos, como cromatografia gasosa (CG/MS) (ABDELNUR, 2011; DIXON et al., 2011) e líquida (LC/MS) (GRATA et al., 2008) acoplada a espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010) e infravermelho próximo (NIRS) (LIU et al., 2015). Neste contexto, perfis metabólicos são estabelecidos de acordo com o resultado de sinais cromatográficos ou espectroscópicos representativos da amostra em análise.

Os perfis metabólicos são contrastados com bibliotecas de espectros, a fim de identificar os picos gerados. Muitas bibliotecas já vem no próprio equipamento analítico, sendo as mais usuais a NIST (do inglês, National Institute of Standards and Technology), banco de dados humanos, HMDB (Human Metabolome Database), que contém 114176 entradas de metabólitos (WISHART et al., 2018), Metlin, MassBank. Ao final, os metabólitos diferentemente expressos, são buscados em rotas metabólicas, para realizar a interpretação biológica.

A metabolômica pode ser empregada para descobrir biomarcadores e caminhos relacionados (WANG; BYUN; PENNATHUR, 2010; BRUNETTI et al., 2013; COURANT et al., 2013; WANG et al., 2013). Zeng et al. (2016) utilizaram a metabolômica para analisar respostas celulares e alterações de *Euglena gracilis* a condições de cultivo heterotrófico e mixotrófico. Os autores concluíram que a metabolômica contribui no entendimento das alterações metabólicas sob diferentes condições de cultura, fornecendo base teórica para aplicações industriais de microalgas.

Farid et al. (2018) utilizaram polissacarídeos extraídos de quatro espécies de microalgas (*C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *C. reinhardtii* e *D. salina*) e injetaram em mudas de tomate, para avaliar o efeito bioestimulador nas vias bioquímicas e metabólicas relacionadas à defesa da planta. Os autores verificaram em análise metabolômica quantitativa, mediada por perfis obtidos da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, que os polissacarídeos

de *D. salina*, *C. sorokiniana* e *C. reinhardtii* aumentaram o conteúdo de ácido alfa-linolênico e os teores de ácidos graxos de cadeia longa, contribuindo no mecanismo de defesa antioxidante do tomateiro.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFEZ, S. I. I.; ABO-ELYOUSR, K. A. M.; ABDEL-RAHIM, I. R. Fungicidal activity of extracellular products of cyanobacteria against *Alternaria porri*. **European Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 239–245, 3 abr. 2015.
- ABDELNUR, P.V. Metabolômica e espectrometria de massas. **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, v. 11, p. 1-4, 2011.
- ABDULSAMAD, J.K.; VARGHESE, S.A.; THAJUDEEN, J. Cost effective cultivation and biomass production of green microalga *Desmodesmus subspicatus* mb. 23 in NPK fertilizer medium. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2019, p. 599-604, 2019.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. **World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision**. 2012.
- AMER, H. M. et al. Growth and chemical constituents of cardoon plant in response to foliar application of various algal extracts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, n. September, p. 101336, 2019.
- AN, S.S.; FRIEDL, T.; HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. **Plant Biology**, v. 1, n. 4, p. 418-428, 1999.
- ANGELO, E.A.; ANDRADE, D.S.; FILHO, A.C. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 125-136, 2014.
- ANISIMOV, M. M.; CHAIKINA, E. L. Effect of seaweed extracts on the growth of seedling roots of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seasonal changes in the activity. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 2, n. 3, p. 19-23, 2014.
- BARONE, V. et al. Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 1061-1071, 2018.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006, 301 p.
- BASHEER, S.; HUO, S.; ZHU, F.; QIAN, J.; XU, L.; CUI, F.; ZOU, B. Microalgae in Human Health and Medicine. In: **Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products**. Springer, Singapore, 2020. 149-174 p.
- BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39-48, 2015.
- BRAUN, J. C. A.; COLLA, L. M. Use of Microalgae for the Development of Biofertilizers and Biostimulants. **BioEnergy Research**, p. 1-22, 2022.
- BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

- BETTANI, S.R.; OLIVEIRA RAGAZZO, G.; SANTOS, N.L.; KIECKBUSCH, T.G.; BASTOS, R.G.; SOARES, M.R.; DA SILVA, M. Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. **Carbohydrate polymers**, v. 203, p. 322-330, 2019.
- BICUDO, C.; MENEZES, M. **Introdução: As algas do Brasil**. In: FORZZA, R.C., org., et al. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: ANDREA JAKOBSSON Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, 49-60 p.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1987. 61 p. (EMBRAPA. CNPSo. Documentos, 21).
- BOLD, H.C.; WYNNE, M.L.L. **Introduction to the algae: Structure and reproduction**. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, 1978, 706 p.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Editora UFV, Viçosa. 1999, 817p.
- BORKERT, C. M. et al. **Seja o doutor da sua soja**. Potafós, v. 5, n. 66, p. 1-17, 1994.
- BROCH, D. L.; RANNO, S. K. Fertilização do solo, adubação e nutrição da cultura da soja. Fundação MS. Tecnologia e Produção: Soja e Milho, 2012.
- BRASIL. **Instrução Normativa Nº 46 de 06 de Outubro de 2011 (Produção vegetal e animal) - Regulada pela IN 17-2014**. MAPA, 2011. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf/view>>. Acesso em 09 Jul 2019.
- BRUNETTI, C.; GEORGE, R.M.; TATTINI, M.; FIELD, K.; DAVEY, M. P. Metabolomics in plant environmental physiology. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 13, p. 4011-4020, 2013.
- CANDIDO, C.; LOMBARDI, A.T. Mixotrophy in green microalgae grown on an organic and nutrient rich waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 20, 2020.
- CANUTO, G.A.B.; COSTA, J.L.; CRUZ, P.L.R.; SOUZA, A.R.L.; FACCIO, A.T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K.T.; TAVARES, M.F.M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.
- CARVALHO, E.M.; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H.C.; NAKAGAKI, J.M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry and Biotechnology Report**, v. 1, n. 2, p. 14-18, 2012.
- CASTRO, J.S. CALIJURI, M.L.; ASSEMANY, P.P.; CECON, P.R.; DE ASSIS, I.R.; RIBEIRO, V.J. Microalgae biofilm in soil: Greenhouse gas emissions, ammonia volatilization and plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 574, p. 1640-1648, 2016.
- CCALA. *Desmodesmus subspicatus* (R. Chodat) E. Hegewald et A. Schmidt. Culture Collection of Autotrophic Organisms, 2020. Disponível em <

<http://ccala.butbn.cas.cz/en/Desmodesmus-subspicatus-r-chodat-e-hegewald-et-a-schmidt-0>>. Acesso em 24 Mar 2020.

CHANDRAMOULI, K.; QIAN, P.Y. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. **Human genomics and proteomics: HGP**, v. 2009, p. 1-22, 2009.

CHATTERJEE, A.; SINGH, S.; AGRAWAL, C.; YADAV, S.; RAI, R.; RAI, L. C. Role of algae as a biofertilizer. In: **Algal Green Chemistry**. Elsevier, 2017. p. 189-200.

CHIAIESE, P. CORRADO, G.; COLLA, G.; KYRIACOU, M.C.; ROUPHAEL, Y. Renewable sources of plant biostimulation: microalgae as a sustainable means to improve crop performance. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1782, 2018.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007

CHOO, M.Y. OI, L.E.; LING, T.C.; NG, E.P.; LEE, H.V.; JUAN, J. C. Conversion of Microalgae Biomass to Biofuels. In: **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. Academic Press, 2020, 149-161 p.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 686-702, 2011.

COLUSSE, G.A.; DUARTE, M.E.R.; DE CARVALHO, J.C.; NOSEDA, M.D. Media effects on laboratory scale production costs of *Haematococcus pluvialis* biomass. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100236, 2019.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, Brasília, v.9 – safra 2021/2022. Quarto levantamento, p. 1-09, janeiro, 2022. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>>. Acesso em 19 jun 22.

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**, v. 28, n. 4, p. 2367-2377, 2016.

CORDEIRO, E. C. N. et al. Microalga biofertilizer improves potato growth and yield, stimulating amino acid metabolism. **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 1, p. 385-394, 2022.

COURANT, F.; MARTZOLFF, A.; RABIN, G.; ANTIGNAC, J.P.; LE BIZEC, B.; GIRAUDEAU, P.; TEA, I.; AKOKA, S.; COUZINET, A.; COGNE, G.; GRIZEAU, D.; GONÇALVES, O. How metabolomics can contribute to bio-processes: a proof of concept study for biomarkers discovery in the context of nitrogen-starved microalgae grown in photobioreactors. **Metabolomics**, v. 9, n. 6, p. 1286-1300, 2013.

CRISPINO, C. C. et al. **Adubação nitrogenada na cultura da soja**. Circular técnica 75, Londrina, PR: EMBRAPA, 2001. 6 p.

DALL'AGNOL, Amélio. **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. Brasília, DF: Embrapa, 2016., 2016.

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.D.; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DE CAMPOS, R.F.; WENDLING, C.S.; MATIAS, C.A. Utilização de Microalgas no Processo de Tratamento de Efluentes: Biorremediação e sua Interação. **Revista UNIPLAC**, v. 6, n. 1, 2018.

DINESHKUMAR, R.; KUMARAVEL, R.; GOPALSAMY, J.; SIKDER, M.N.A.; SAMPATHKUMAR, P. Microalgae as bio-fertilizers for rice growth and seed yield productivity. **Waste and biomass valorization**, v. 9, n. 5, p. 793-800, 2018.

DINESHKUMAR, R.; SUBRAMANIAN, J.; GOPALSAMY, J.; JAYASINGAM, P.; ARUMUGAM, A.; KANNADASAN, S.; SAMPATHKUMAR, P. The impact of using microalgae as biofertilizer in maize (*Zea mays* L.). **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 5, p. 1101-1110, 2019.

DINESHKUMAR, R.; SUBRAMANIAN, J.; SAMPATHKUMAR, P. Prospective of *Chlorella vulgaris* to augment growth and yield parameters along with superior seed qualities in black gram, *Vigna mungo* (L.). **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 4, p. 1279-1287, 2020.

DIXON, E.; CLUBB, C.; PITTMAN, S.; AMMANN, L.; RASHEED, Z.; KAZMI, N.; KESHAVARZIAN, A.; GILLEVET, P.; RANGWALA, H.; COUCH, R.D. Solid-phase microextraction and the human fecal VOC metabolome. **PLoS one**, v. 6, n. 4, p. 18471, 2011.

DOMINGUES, C.D.; TORGAN, L.C. Chlorophyta de um lago artificial hipereutrófico no sul do Brasil. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 67, n. 1, p. 75-91, 2012.

DUDLEY, E.; YOUSEF, M.; WANG, Y.; GRIFFITHS, W.J. Targeted metabolomics and mass spectrometry. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 80, p. 45 - 83, 2010.

DUNCK, B.; JUNQUEIRA, M.G.; BICHOFF, A.; SILVA, M.V.; PINEDA, A.; PAULA, A.C.M.; ZANCO, B.F.; MORESCO, G.A.; IATSKIU, P.; BORTOLINI, J.C.; SOUZA, Y.R.; TRAIN, S.; RODRIGUES, L.C.; JATI, S.; RODRIGUES, L. Periphytic and planktonic algae records from the upper Paraná river floodplain, Brazil: an update. **Hoehnea**, v. 45, p. 560-590, 2018.

D'UTRA, G. **Soja**. *Jornal Agrícola*, São Paulo, 13, 08/06/1882, 1882.

EKMAY, R.; GATRELL, S.; LUM, K.; KIM, J.; LEI, X.G. Nutritional and metabolic impacts of a defatted green marine microalgal (*Desmodesmus* sp.) biomass in diets for weanling pigs and broiler chickens. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9783-9791, 2014.

EMBRAPA. Agroenergia em revista: microalgas. **Embrapa Agroenergia-Outras publicações técnicas (INFOTECA-E)**, n. 10, p. 1-60, 2016.

EMBRAPA. **Visão 2030: O Futuro da Agricultura Brasileira**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018.

FÁBREGAS, J.D.A.; REGUEIRO, M.; MASEDA, A.; OTERO, A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 530-535, 2000.

FAHEED, F.A.; FATTAH, Z.A. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. **Journal of Agriculture and Social Sciences**, v. 4, p. 165-169, 2008.

FAOSTAT. Crops. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2022. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 19 Jun 2022.

FARID, R.; MUTALE-JOAN, C.; REDOUANE, B.; NAJIB, E.M.; ABDERAHIME, A.; LAILA, S.; HICHAM, E.A. Effect of microalgae polysaccharides on biochemical and metabolomics pathways related to plant defense in *Solanum lycopersicum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 188, n. 1, p. 225-240, 2018.

FATIMA, Z.; ZIA, M.; CHAUDHARY, M.F. Interactive effect of Rhizobium strains and P on soybean yield, nitrogen fixation and soil fertility. **Pakistan journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 255, 2007.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11p.

FERNÁNDEZ-LINARES, L.C.; BARAJAS, C.G.; PÁRAMO, E.D.; CORONA, J.A.B. Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. **Bioresource technology**, v. 244, p. 400-406, 2017.

FUNARI, C.S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 2, p. 1051-1061, 2016.

GATEAU, H.; SOLYMOSI, K.; MARCHAND, J.; SCHOEFS, B. Carotenoids of microalgae used in food industry and medicine. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 17, n. 13, p. 1140-1172, 2017.

GHOSH, D. et al. Algal biofertilizer towards green sustainable agriculture. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2022. p. 27-45.

GONÇALVES, A.; PIRES, J.C.M.; SIMOES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 24, p. 405 -415, 2017.

GRATA, E.; BOCCARD, J.; GUILLARME, D.; GLAUSER, G.; CARRUPT, P.A.; FARMER, E.E.; WOLFENDER, J.L.; RUDAZ, S. UPLC–TOF-MS for plant metabolomics: a sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 261-270, 2008.

GRZESIK, M.; ROMANOWSKA-DUDA, Z.; KALAJI, H. M. Effectiveness of cyanobacteria and green algae in enhancing the photosynthetic performance and growth of willow (*Salix viminalis* L.) plants under limited synthetic fertilizers application. **Photosynthetica**, v. 55, n. 3, p. 510–521, 2017.

- GUIRY, M.D; GUIRY, G.M. *Desmodesmus* (Chodat) S.S.An, T.Friedl & E.Hegewald. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em 05 Fev 2020.
- HARLAN, J. R. **Crops and man**. Medison: ASA, CSS of AM, 1975. 295 p.
- HEGEWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). **Archiv fur Hydrobiologie-Supplementband Only**, v. 131, p. 1-18, 2000.
- HEGEWALD, E.; SCHMIDT, A.; BRABAND, A.; TSARENKO, P. Revision of the *Desmodesmus* (Sphaeropleales, Scenedesmaceae) species with lateral spines. 2. The multi-spined to spineless taxa. **Algological Studies**, v. 116, n. 1, p. 1-38, 2005.
- HENTSCHKE, G.S.; TORGAN, L.C. Chlorococcales lato sensu (Chlorophyceae, excl. *Desmodesmus* e *Scenedesmus*) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 65, n. 1, p. 87-100, 2010.
- HILTON, R. L.; TRAINOR, F.R. Algae from a Connecticut soil. **Plant and soil**, v. 19, n. 3, p. 396-399, 1963.
- HIRAKURI; M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 70p.
- HO, S.H.; HUANG, S.W, CHEN, C.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.
- HORNING, E.C.; HORNING, M.G. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. **Clinical chemistry**, v. 17, n. 8, p. 802-809, 1971.
- HUGHES, A.D.; KELLY, M.S.; BLACK, K.D.; STANLEY, M.S. Biogas from Macroalgae: is it time to revisit the idea?. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 86, 2012.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.
- HYMOWITZ, Theodore. On the domestication of the soybean. **Economic botany**, v. 24, n. 4, p. 408-421, 1970.
- IFTIKHAR, S.; SALEEM, M.; AHMAD, K.S.; JAFFRI, S.B. Synergistic mycoflora–natural farming mediated biofertilization and heavy metals decontamination of lithospheric compartment in a sustainable mode via *Helianthus annuus*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 11, p. 6735-6752, 2019.
- ILAVARASI, A.; MUBARAKALI, D.; PRAVEENKUMAR, R.; BALDEV, E.; THAJUDDIN, N. Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production. **Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 540-545, 2011.
- Jl, F.; LIU, Y.; HAO, R.; LI, G.; ZHOU, Y.; DONG, R. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. **Bioresource technology**, v. 161, p. 200-207, 2014.

- JI, F.; PANG, A.; NING, L.; RODGERS, K.; LIU, Y.; DONG, R. Fed-batch cultivation of *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater for improved nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 184, p. 116-122, 2015.
- JOHNSON, J.L.; FAWLEY, M.W.; FAWLEY, K.P. The diversity of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* (Chlorophyceae) in Itasca State Park, Minnesota, USA. **Phycologia**, v. 46, n. 2, p. 214-229, 2007.
- KESSLER, E.; SCHÄFER, M.; HÜMMER, C.; KLOBOUCEK, A.; HUSS, V.A.R. Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). **Botanica Acta**, v. 110, n. 3, p. 244-250, 1997.
- KHAN, M.; SHIN, J.H.; KIM, J.D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 36, 2018.
- KILDEGAARD, H.F.; BAYCIN-HIZAL, D.; LEWIS, N.E.; BETENBAUGH, M.J. The emerging CHO systems biology era: harnessing the 'omics revolution for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1102-1107, 2013.
- KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature protocols**, v. 5, n. 3, p. 536, 2010.
- KOCIRA, S. et al. Modeling biometric traits, yield and nutritional and antioxidant properties of seeds of three soybean cultivars through the application of biostimulant containing seaweed and amino acids. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 388, 2018.
- KOEK, M.M. JELLEMA, R.H.; VAN DER GREEF, J.; TAS, A.C.; HANKEMEIER, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 307-328, 2011.
- KRONTHALER, J.; GSTRAUNTHALER, G.; HEEL, C. Optimizing high-throughput metabolomic biomarker screening: a study of quenching solutions to freeze intracellular metabolism in CHO cells. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 16, n. 3, p. 90-97, 2012.
- KUTÍLEK, M.; NIELSEN, D.R. Soil Is the Skin of the Planet Earth. In: **Soil**. Springer, Dordrecht, 2015, 3-19 p.
- LEWIS, L.A.; FLECHTNER, V.R. Cryptic species of *Scenedesmus* (chlorophyta) from desert soil communities of Western North America 1. **Journal of phycology**, v. 40, n. 6, p. 1127-1137, 2004.
- LI, Y. et al. *Chlorella* triggers stomatal closure mediated by NADPH oxidase and improves instantaneous water use efficiency in *Vicia faba*. **Plant Signaling and Behavior**, v. 9, n. 6, 6 maio 2014.
- LIU, X.; CHEN, G.; TAO, Y.; WANG, J. Application of effluent from WWTP in cultivation of four microalgae for nutrients removal and lipid production under the supply of CO₂. **Renewable Energy**, v. 149, p. 708-715, 2020.

- LIU, B.; LIU, J.; CHEN, T.; YANG, B.; JIANG, Y.; WEI, D.; CHEN, F. Rapid characterization of fatty acids in oleaginous microalgae by near-infrared spectroscopy. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 4, p. 7045-7056, 2015.
- LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae : a new opportunity for microalgal biotechnology ? **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 273–282, 2015.
- MAGRO, F.G.; DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA, L. M. Produção de bioetanol utilizando microalgas: uma revisão. **Semina: Ciências exatas e tecnológicas**, v. 37, n. 1, p. 159-174, 2016.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Agronômica Ceres, 2006.
- MARCHELLO, A.E.; SANTOS, A.C.; LOMBARDI, A.T.; DE SOUZA, C.W.O.; MONTANHIM, G.C. Physiological and Ecological aspects of *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) under photoautotrophic and mixotrophic conditions. **Microbial ecology**, v. 76, n. 3, p. 791-800, 2018.
- MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.
- MAZEPA, E. et al. Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. **Algal Research**, v. 59, p. 102434, 2021.
- MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean composition. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 91, n. 3, p. 363-384, 2014.
- MELO, F.B.H. A utilização de fertilizantes e a modernização da agricultura paulista. **Agricultura em São Paulo**, SP, v. 22, n. 1/2, p. 341-362, 1975.
- MENEZES, M.; TUCCI, A.; PERES, C.K.; FAJAR, A.; BRANCO, C.Z. Chlorophyceae. In: FORZZA, R. et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB118453>>. Acesso em 05 Fev 2020.
- MEYER, M. C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Bioinsumos na cultura da soja**. Embrapa: Brasília, DF, 2022, 550p.
- MIAO, M.S.; YAO, X.D.; SHU, L.; YAN, Y.J.; WANG, Z.; LI, N.; CUI, X.T.; LIN, Y.; KONG, Q. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 120-125, 2016.
- MOCKSHELL, J.; VILLARINO, M.A.; ELIZA J. Agroecological intensification: Potential and limitations to achieving food security and sustainability, In: Ferranti, P., Berry, E.M., Anderson, J.R. (Eds.), **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, v. 3, 2018, 64–70 p., Elsevier.
- MORESCO, C.; BUENO, N.C. *Scenedesmaceae* (Chlorophyceae-Chlorococcales) de um lago artificial urbano: *Desmodesmus* e *Scenedesmus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 289-296, 2007.

- MOTA, M.R.; SANGOI, L.; SCHENATTO, D.E.; GIORDANI, W.; BONIATTI, C.M.; DALL'IGNA, L. Stabilized nitrogen sources as an alternative for increasing grain yield and nitrogen use efficiency by Maize. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 2, p. 512-522, 2015.
- MUSHTAQ, M.Y.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R.; WILSON, E.G. Extraction for metabolomics: access to the metabolome. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 4, p. 291-306, 2014.
- NAGAPPAN, S.; DEVENDRAN, S.; TSAI, P.C. JAYARAMAN, H.; ALAGARSAMY, V.; PUGAZHENDHI, A.; PONNUSAMY, V. K. Metabolomics integrated with transcriptomics and proteomics: Evaluation of systems reaction to nitrogen deficiency stress in microalgae. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 1-14, 2020.
- NEUMAIER, N. et al. Estádios de desenvolvimento da cultura de soja. **Embrapa Soja- Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2000.
- NIDERA, 2022. **Produtos**. Disponível em: <<http://www.niderasementes.com.br/produto/ns7901-rr.aspx>> Acesso em: 19 Jun 2022.
- NICHOLS, H.W.; BOLD, H. C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. **Journal of Phycology**, v. 1, n. 1, p. 34-38, 1965.
- NICKLER, M.; OTTIGER, M.; STEUER, C.; HUBER, A.; ANDERSON, J. B.; MÜLLER, B.; SCHUETZ, P. Systematic review regarding metabolic profiling for improved pathophysiological understanding of disease and outcome prediction in respiratory infections. **Respiratory research**, v. 16, n. 1, p. 125, 2015.
- ONU. **Population: The Numbers**. Population Matters, 2022. Disponível em <https://populationmatters.org/the-facts/the-numbers?gclid=Cj0KCQiA9orxBRD0ARIsAK9JDxT4ILLDycS8VJLzA8zZ7vpOFtEq8iMKR-0VbyiJchHh0E11TOEvjNMaaVjWEALw_wcB>. Acesso em 16 Jun 2022.
- PAGANO, M. C.; MIRANSARI, M. The importance of soybean production worldwide. In: **Abiotic and biotic stresses in soybean production**. Academic Press, 2016. p. 1-26.
- PALINSKA, K.A.; THOMASIU, C.F.; MARQUARDT, J.; GOLUBIC, S. Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccata. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 10, p. 2253-2263, 2006.
- PEREIRA, C.M.P.; HOBUSS, C.B.; MACIEL, J.V.; FERREIRA, L.R.; PINO, F.B.D.; MESKO, F. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35 n. 10, p. 2013-2018, 2012.
- PEREIRA, R. G. et al. Sistemas de manejo do solo: soja [*Glycine max* (L.)] consorciada com *Brachiaria decumbens* (STAPF). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p. 44-51, 2011.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 781-796, 2013.

PORTNOY, D.S.; FIELDS, A.T.; GREER, J.B.; SCHLENK, D. Genetics and Oil: Transcriptomics, Epigenetics, and Population Genomics as Tools to Understand Animal Responses to Exposure Across Different Time Scales. In: **Deep Oil Spills**. Springer, Cham, 2020. p. 515-532.

PRASANNA, R.; TRIVENI, S.; BIDYARANI, N.; BABU, S.; YADAV, K.; ADAK, A.; KHETARPAL, S.; PAL, M.; SHIVAY, Y.S.; SAXENA, A.K. Evaluating the efficacy of cyanobacterial formulations and biofilmed inoculants for leguminous crops. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n. 3, p. 349-366, 2014.

PRIMIERY, B. F.; SANTOS, R. F. Solo, adubação e nutrição da cultura da soja (*Glycine max* L.). **Acta Iguazu**, p. 80-91, 2017.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae—A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; KUMAR, N.A.; SRIDHAR, S.; RENGASAMY, R. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 77–88, 2008.

RANIA, M.A.; HALA, M.T. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by placket-burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global J. Biotechnol. Biochem**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 728 p.

REDDY, C.A.; SARAVANAN, R.S. Polymicrobial multi-functional approach for enhancement of crop productivity. In: Advances in applied microbiology. **Academic Press**, v. 82, 2013, 53-113 p.

RENUKA, N. et al. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 4, p. 1255-1273, 2018.

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**, v. 23, n. 7, p. 6608-6620, 2016.

REZENDE, P. M. de et al. Enxofre aplicado via foliar na cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1255-1259, 2009.

RIBEIRO, D.M.; RONCARATTI, L.F.; POSSA, G.C.; GARCIA, L.C.; CANÇADO, L.J.; WILLIAMS, T.C.R.; BRASIL, B.D.S.A.F. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, p. 100354, 2020.

RONGA, D. et al. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, v. 9, n. 4, p. 1–22, 2019.

ROBERTS, L.D.; SOUZA, A.L.; GERSZTEN, R.E.; CLISH, C.B. Targeted metabolomics. **Current protocols in molecular biology**, v. 98, n. 1, p. 1-24, 2012.

SAITO, K.; MATSUDA, F. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 463-489, 2010.

SARY, D. H.; EL-NWEHY, S. S.; MOKHTAR, M. A. Effect of algae extract foliar application on yield and quality traits of soybean (*Glycine max* L.) grown on calcareous soil under irrigation water regime. **Plant Archives**, v. 20, n. 1, p. 2417-2430, 2020.

SAVCI, S. An agricultural pollutant: chemical fertilizer. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 3, n. 1, p. 73, 2012.

SFREDO, G. J. **Soja no Brasil: calagem, adubação e nutrição mineral**. Londrina: Embrapa Soja, 2008.

SIMÕES, M.A.; SANTOS, S.D.; DANTAS, D.D.M.D.M.; GALVÉZ, A.O. **Algas cultiváveis e sua aplicação biotecnológica**. Instituto Federal: Aracaju, 2016, 91 p. [e-book]. Disponível em <https://repositorio.ifs.edu.br/biblioteca/bitstream/123456789/952/1/E-book_Algas_cultivaveis.pdf>. Acesso em 15 Jan 2020.

SINGH, B.; BAUDDH, K.; BUX, F. **Algae and environmental sustainability**. v. 7. Springer, New Delhi, India, 2015, 181 p.

SOLETO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.D.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, n. 1-4, p. 217-224, 2005.

SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E.; REIN, T.A. **Uso do gesso agrícola nos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1996. 20p. (EMBRAPA-CPAC. Circular técnica 32).

SOYSTAT, 2022. **International: Brazil & Argentina Production**. SoyStat. Disponível em <<http://soystats.com/international-brazil-argentina-production/>>. Acesso em 19 Jun 2022.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

SRIVASTAVA, A. K.; GUPTA, S.; ARORA, D. K. Agglutination response of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* to *Macrophomina phaseolina* under different growth conditions. **Microbiological research**, v. 151, n. 2, p. 193-200, 1996.

STANIER, R. Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 2, p. 171, 1971.

STEWART JR, C. Neal et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene. **Plant physiology**, v. 112, n. 1, p. 121-129, 1996.

STIRK, W.A.; ÖRDÖG, V.; NOVÁK, O.; ROLČÍK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains1. **Journal of phycology**, v. 49, n. 3, p. 459-467, 2013.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal** .pdf. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRAINOR, F.R. **Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae)-phenotypic plasticity**. Nova Hedwigia, Beihefte, Beih, v. 117, 1998, 367 p.

USDA. Data. **U.S. Department of Agriculture**, 2022. Disponível em <<https://www.usda.gov/topics/data>>. Acesso em 19 Jun 2022.

VARFOLOMEEV, S.D.; WASSERMAN, L.A. Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 789-807, 2011.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos de cerrados**. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. p.297-360.

VERNETTI, F. J. História e importância da soja no Brasil. **A Lavoura**, v. 81, p. 21-24, 1977.

VERNETTI, F. J.; GASTAL, M. F. C. **Descrição botânica da soja**. Pelotas, RS: EMBRAPA, 1979, 11 p.

VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis* arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology**. CRC Press, 1997, 233 p.

WANG, J.H.; BYUN, J.; PENNATHUR, S. Analytical approaches to metabolomics and applications to systems biology. In: **Seminars in nephrology**. WB Saunders, v. 30, n. 5, p. 500-511, 2010.

WANG, J.; CHEN, L.; TIAN, X.; GAO, L.; NIU, X.; SHI, M.; ZHANG, W. Global metabolomic and network analysis of *Escherichia coli* responses to exogenous biofuels. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 11, p. 5302-5312, 2013.

WIN, T.T.; BARONE, G.D.; SECUNDO, F.; FU, P. Algal biofertilizers and plant growth stimulants for sustainable agriculture. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 203-211, 2018.

WISHART, D.S.; FEUNANG, Y.D.; MARCU, A.; GUO, A.C.; LIANG K.; VÁZQUEZ-FRESNO, R.; SAJED, T.; JOHNSON, D.; LI, C.; KARU, N.; SAYEEDA, Z.; LO, E.; ASSEMPOUR, N.; BERJANSKII, M.; SINGHAL, S.; ARNDT, D.; LIANG, Y.; BADRAM, H.; GRANT, J.; SERRA-CAYUELA, A.; LIU, Y.; MANDAL, R.; NEVEU, V.; PON, A.; KNOX, C.; WILSON, M.; MANACH, C.; SCALBERT, A. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D608-D617, 2018.

YADAV, G.; MEENA, D. K.; SAHOO, A. K.; DAS, B. K.; SEN, R. Effective valorization of microalgal biomass for the production of nutritional fish-feed supplements. **Journal of Cleaner Production**, v. 243, p. 118697, 2020.

YIN, Q. et al. Evaluation of nitrate and phosphate adsorption on Al-modified biochar: influence of Al content. **Science of the Total Environment**, v. 631, p. 895-903, 2018.

ZENG, M.; HAO, W.; ZOU, Y.; SHI, M.; JIANG, Y.; XIAO, P.; LEI, A.; HU, Z.; ZHANG, W.; ZHAO, L.; WANG, J. Fatty acid and metabolomic profiling approaches differentiate heterotrophic and mixotrophic culture conditions in a microalgal food supplement 'Euglena'. **BMC biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 49, 2016.

ZHENG, H.Q.; CHIANG-HSIEH, Y.F.; CHIEN, C.H.; HSU, B.K.J.; LIU, T.L.; CHEN, C.N.N.; CHANG, W.C. AlgaePath: comprehensive analysis of metabolic pathways using transcript abundance data from next-generation sequencing in green algae. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 196, 2014.

ZUCCARO, G.; YOUSUF, A.; POLLIO, A.; STEYER, J. P. Microalgae Cultivation Systems. In: **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. Academic Press, 2020, p. 11-29.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO.

Evaluation of commercial fertilizer as an alternative medium for *Desmodesmus abundans* (Kirchner) E. Hegewald cultivation and the use of microalgal biomass via foliar application in soybean *Glycine max* (L.) Merr.

“Artigo elaborado de acordo com o periódico ALGAL RESEARCH”

Evaluation of commercial fertilizer as an alternative medium for *Desmodesmus abundans* (Kirchner) E. Hegewald cultivation and the use of microalgal biomass via foliar application in soybean *Glycine max* (L.) Merr.

Highlights

Low-cost *Desmodesmus abundans* cultivation in commercial fertilizer medium

Higher abundance of metabolites organic acids and sugars in biomass grown in CF.

Concentrations of *D. abundans* biomass was tested as a foliar biofertilizer in soybean

20% v/v microalgal biomass improves soybean growth and productivity.

20% v/v microalgal biomass increases protein and N content in soybeans.

Abstract

Microalgae such as *Desmodesmus* sp. have emerged as a promising alternative renewable resource due to its biomass production and compounds present in the cells or excreted, such as organic acids and amino acids, have, for example, the ability to stimulate the development of crops such as soybeans. However, because the cost of production, what is still one of the main challenges, there is an effort to search for alternative/ low-cost microalgal culture media. The objectives of this work were, evaluate commercial fertilizer with more accessible costs for *Desmodesmus abundans* L2B Bold biomass production, analyzing the metabolome and photosynthetic pigments profile of microalgae and, subsequently testing the potential of biomass as a foliar biofertilizer in soybean crops. The commercial fertilizer was supplemented with ammonium nitrate and potassium chloride. For metabolomics analysis, samples were spiked with ribitol as an internal standard, derivatized and then analyzed via GC-MS. The microalgal biomass produced in a commercial fertilizer medium was evaluated as a biofertilizer in 3 different concentrations, applied to the soybean crop at 30, 50 and 70 days after sowing. The population, photosynthetic pigments and dry biomass of *D. abundans* L2B Bold were similar in both, BG-11 and commercial fertilizer culture media. The use of a commercial fertilizer (CF) reduced the production cost of 1 kg of dry microalgal biomass by 31.8% compared to BG-11. Different metabolite profiles were found in the microalgal biomass in BG-11 and CF; the main classes identified in the microbial biomass, regardless of culture medium were organic acids (19%), amines (14%), sugars (12%), fatty acids (11%) and esters (10%). Foliar application of 20% (v/v) *D. abundans* L2B Bold biomass in soybean promoted a larger stem diameter (5.88 mm), increases in leaf fresh and dry mass (12.8 and 4.0 g plant⁻¹, respectively) and stem mass (7.2 and 2.1 g plant⁻¹, respectively); there was also increases in N (26%) and protein (38.1%) in the seeds, and a higher pod number (10.9), seed number (25.2) and seed mass (3.43 g) per plant compared to other treatments. These results demonstrate the potential of *D. abundans* L2B Bold as a biofertilizer for soybean production crops due to its constituent compounds.

Keywords: Bioinputs, Microalgae, Bioeconomy, Metabolite profile, Soybean.

1. Introduction

Microalgae have increasingly attracted the interest of researchers and institutions due to their great economic and commercial relevance, as their biomass can be an alternative raw material as a renewable resource with great biotechnological potential [1,2]. Microalgae and presents characteristics such as high amounts of lipids and amino acids [3] and a rich composition of macro- and micronutrients (P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn, Zn, Mo and Se) [4]. In addition, microalgae produce plant phytohormones, such as cytokinin [5], auxin and gibberellin [6,7].

Due to the potential of microalgae and their large-scale application, there is an effort to obtain their biomass more economically. In this sense, strategies for formulating alternative and low-cost culture media have been adopted. One possible formulation is the use of low-cost commercial nutrient sources, such as inorganic agricultural fertilizers [8], which at low concentrations have been shown to be effective for microalgal cultivation [9,10]. These widely available fertilizers have known and defined compositions, with adequate nitrogen and phosphorus contents [11] and essential nutrients for increasing microalgae biomass [12].

Among the most recently studied microalgae, *Desmodesmus* sp., a eukaryotic microorganism found in fresh water, has been reported in Brazilian aquatic environments [12,13]. Because of its cells constituent compounds [3–6], microalgae such as *D. abundans* have great potential in the agricultural sector, serving as a source of bioinput [14,15] and contributing to the bioeconomy in agricultural production [16]. Furthermore, chemical molecules from nonrenewable sources, usually used in agriculture, are becoming less accessible; combined with increasing pressure for more sustainable practices and management, the adoption of solutions, such as biofertilizers and biostimulant-based microalgae, which increase crop production, has been encouraged [17].

In Brazil, the soybean [*Glycine max* (L.) Merll.] crop has leveraged the use of bioinputs, with almost half of the registered biological products recommended for the crop [15]. This scenario is a result of efforts to increase the crop's yield and reduce carbon emissions, combined with the fact that Brazil is the largest producer of soybean oilseeds, with estimates of 140.5 million tons of seeds harvested in 2022 [18,19]. Its seeds are rich in protein (40%), oil (20%), carbohydrates (35%) and ash (5%) [20] and serve as sources of human and animal food.

The use of green microalgae as biofertilizers in crops have shown positive results, improving productivity [14]. The application of *Chlorella vulgaris* by foliar spray or soil drench increased the diameter and length tomato fruit compared to untreated plants, also improving the

quality and shelf life of the tomato owing to the increased total soluble solid and minerals such as P, K, Ca and Mg [21]. Foliar spray *C. vulgaris* on Black Gram increased the number, grams and mineral content of seeds, thus improving yield attributes and quality of seeds [22]. Furthermore, application of *Asteracys quadriloculare* biomass via foliar application to two potato cultivars increased yield, through biochemical changes that contributed to better activity of enzymes involved in the metabolism of amino acids, sugar and nitrate reductase activity [23]. However, despite being the subject of research with bioinputs, for the soybean crop, there are no reports of microalgae-based foliar biofertilizer evaluating the growth, production and nutritional quality of seeds.

The present study aimed to investigate commercial fertilizer for *D. abundans* L2B Bold biomass production; analyzing changes in the metabolome and photosynthetic pigments of the microalgae and also, in evaluate the biomass applied via foliar on soybean plants as biofertilizer.

2. Materials and methods

The experiment was carried out in two stages: low-cost production of *Desmodesmus abundans* L2B Bold biomass and the study of the metabolic profile of microalgae biomass, followed by the foliar application of *D. abundans* L2B Bold biomass to the soybean crop.

2.1. Step 1. Obtaining and cultivating microalgae and experimental design

To perform the experiments, microalgae isolated from a lake in the municipality of Ijaci in Minas Gerais were used: *D. abundans* L2B Bold, isolated and identified by Bonett et al. [13] and registered in Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen under number AAF3A35.

The cultivation of the microalgae *D. abundans* L2B Bold was tested in two types of culture media, standard BG-11 medium [24] and a commercial fertilizer (CF). Three replications of each of these two treatments were conducted, in a completely randomized design. The composition of the culture media is shown in Table 1.

Table 1.

Composition of BG-11 analytical culture medium and commercial agricultural fertilizer.

Blue-green algal medium (BG-11) [24]	Commercial fertilizer (CF)
NaNO ₃ (1500 mg L ⁻¹)	Forth® Plantio (1250 mg L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄ (40 mg L ⁻¹)	Phosphorus (total) - 12% (120 mg L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O (75 mg L ⁻¹)	Calcium (total) - 21% (210 mg L ⁻¹)

CaCl ₂ .H ₂ O (36 mg L ⁻¹)	Magnesium (total) - 6% (60 mg L ⁻¹)
Na ₂ CO ₃ (20 mg L ⁻¹)	Sulfur (total) - 4% (40 mg L ⁻¹)
Ácido cítrico (6 mg L ⁻¹)	Silicon (total) - 1% (10 mg L ⁻¹)
Citrato férrico de amônio (6 mg L ⁻¹)	Boron (total) - 0.04% (0.4 mg L ⁻¹)
Na ₂ EDTA (1 mg L ⁻¹)	Copper (total) - 0.07% (0.7 mg L ⁻¹)
Micronutrientes (1 mL)	Iron (total) - 0.2% (2 mg L ⁻¹)
H ₃ BO ₃ (2860 mg L ⁻¹)	Zinc (total) - 0.18% (1.8 mg L ⁻¹)
MnCl ₂ .4H ₂ O (1810 mg L ⁻¹)	Manganese (total) - 0.1% (1 mg L ⁻¹)
ZnSO ₄ .7H ₂ O (222 mg L ⁻¹)	Ammonium nitrate (720 mg L ⁻¹)
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (390 mg L ⁻¹)	Potassium chloride (280 mg L ⁻¹)
CuSO ₄ .5H ₂ O (79 mg L ⁻¹)	Na ₂ EDTA (1 mg L ⁻¹)
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (49.4 mg L ⁻¹)	
1.0 g L ⁻¹ de glucose	1.0 g L ⁻¹ de glucose

The microalgae were initially cultivated in 250 mL flasks containing 100 mL of culture medium sterilized in an autoclave (121 °C and 1.5 atm for 15 minutes) with an initial optical density of 0.1 OD₆₈₀ nm calculated according to Havlik et al. [25]. Cultivation took place on a bench with natural light and a temperature of 25 ± 2 °C.

2.1.1. Population and photosynthetic pigments of microalgae.

The microalgae populations were monitored by cells counting in a Neubauer chamber [26], every three days, until cell growth stabilized.

The evaluations of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids followed the methodology of Fernández-Linares et al. [27]. 1.0 mL of each sample was centrifuged for 5 min at 17000 g and the supernatant was removed. Subsequently, the cells were suspended in 1.0 mL of methanol and incubated at 45 °C in the dark for 30 min. The tubes were centrifuged (17000 g for 5 min) and the methanolic extract was transferred to plastic cuvettes for measurement at 480, 652, 665 and 750 nm. The concentrations of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids were estimated according to equations described by Fernández-Linares et al. [27].

2.1.2. Metabolomic Analysis Based on GC-MS

Biomass collections were carried out with centrifugation at 8000 g for 10 min at 4 °C. Subsequently, the biomasses were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80 °C before use. Metabolomic analysis was performed according to Wang et al. [28] and Zeng et

al. [29]. Initial samples were collected, before the experiment and after stabilization of culture, i.e., at 12 days of cultivation. The following steps were carried out:

1) Extraction of metabolites: cells were resuspended in 1 mL of cold methanol/chloroform/H₂O (MCW) 10:3:1 (10/3/1) solution, frozen in liquid nitrogen, and thawed five times. Supernatants were collected by centrifugation at 14000 g for 3 min at 4 °C. To normalize for variations between samples, an internal standard (IS) solution (100 µg mL⁻¹ Ribitol, 10 µL⁻¹) was added to 100 µL of supernatant in a 1.5 mL microtube before being dried by vacuum centrifugation for 2-3 hours (4 °C);

2) Sample derivation: the samples were dissolved in 10 µL of methoxyamine hydrochloride (40 mg mL⁻¹ in pyridine), shaken at 30 °C for 90 min, added to 90 µL⁻¹ of N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and incubated at 37 °C for 30 min to trimethylsilylate the polar functional groups. The derivatized samples were collected by centrifugation at 14,000 g for 3 min, and the supernatant was used directly for GC/MS analysis;

3) GC-MS: Analysis was performed on a GC-MS system-GC 7890 coupled to Shimadzu QP2010 Plus GC/MS system equipped with an SLB5ms capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), with 70 eV of electronic impact ionization. One microliter (1 µL⁻¹) of derivatized sample was injected in 1:5 Split mode; the injector temperature was maintained at 230 °C. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. The column temperature started at 45 °C for 2 min, then by temperature ramping of 5 °C min⁻¹ to a final temperature of 280 °C, and then held constant for additional 2 min. The range of mass scan was m/z 38–650;

4) Data processing and statistical analysis: Mass fragmentation spectra were analyzed to identify compounds using the NIST library version 2011. Peak areas of all identified metabolites were normalized against the internal standard and the acquired relative abundances [28].

2.1.3. Dry biomass and economic performance

At the end of cultivation, the biomass was collected by centrifugation at 5000 × g for 10 minutes at 4 °C, placed in an oven with forced air circulation at 60 ± 5 °C until a constant mass was obtained, and weighed on an analytical balance.

The cost of microalgal dry biomass production in both culture media was determined according to Ribeiro et al. [10]. The prices of nutrients and/or reagents used were obtained, and the costs for the production of 1 L of BG-11 and CF medium were calculated, adding the cost of each amount of reagent used. With the dry biomass data obtained at the end of the cultivation,

the amount of medium necessary to produce 1 kg of microalgal dry biomass was calculated. Next, the amount of medium necessary to produce 1 kg of dry biomass was multiplied by the cost per 1 L.

2.2. Step 2. General conditions and experimental design

The experiment was carried out from May to October 2021 at the Department of Biology of Federal University of Lavras – UFLA, Lavras – MG, Brazil (22°42' south, 47°38' west, altitude 546 m) in a greenhouse with a modular, prefabricated structure whose sides and top were covered in polyethylene, with additional shading to reduce the irradiance by 50%; the average temperature was 25 °C, and the relative humidity was 70%.

The treatments consisted of different biomass concentrations (10, 20 and 30% v/v) of *D. abundans* L2B Bold with a population of 10^7 cells mL⁻¹ and a control group (no addition of microalgae, only water) applied via foliar application on soy plants, totaling four treatments. A randomized block design with 3 replications was used, each replication consisting of eight pots, totaling 96 pots, and each pot containing four plants.

Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) cultivar “Nidera NS 7901 RR”, with a life cycle of 118 to 128 days, was used to carry out the experiment. Cultivation was carried out in 5 kg pots filled with 4 kg of a substrate composed of soil (horizon B) plus washed sand (3:1 v/v) supplemented with 200 kg ha⁻¹ of P₂O₅, 100 kg ha⁻¹ of K₂O and dolomitic limestone; the substrate was allowed to react for 15 days for better homogeneity of the materials, according to recommendations by Sousa and Lobato [30], with adaptations. Substrate chemical analyses were carried out at the UFLA Department of Soil Sciences, according to Silva's methodology [31]. Substrate pH was evaluated in CaCl₂, and for micronutrients, Mehlich 1 extraction was used except for boron and sulfur, which were extracted with hot water and monocalcium phosphate in acetic acid, respectively.

The substrate mixture, before cultivation, presented the following chemical attributes: pH = 5.8; P, K and Na (mg dm⁻³) = 17.60, 152.87 and 7.00, respectively; Ca, Mg, Al, H + Al, SB, t and T (cmol_c dm⁻³) = 3.00, 1.26, 0.10, 1.90, 4.65, 4.75 and 6.55, respectively; m and V (%) = 2.11 and 71.02, respectively; organic matter = 3.50 dag kg⁻¹; P-Rem = 15.40 mg L⁻¹; Zn, Fe, Mn, Cu, B and S (mg dm⁻³) = 4.90, 29.70, 16.30, 1.65, 0.25 and 103.70, respectively. Substrate texture: Clay textured soil, with 61.0 dag kg⁻¹ of clay, 22.0 dag kg⁻¹ of silt and 17.0 dag kg⁻¹ of sand. After 15 days, six seeds were sown in each pot and irrigated to maintain field

capacity at 70%. After complete emergence, two seedlings were thinned, leaving four plants per pot.

2.2.1. Obtaining biomass and foliar application

To obtain the biomass, the results of step 2.1 were considered, i.e., the microalgae were cultivated in a medium based on commercial fertilizer (Table 1). Cultivation took place on a bench exposed to natural light at 25 ± 2 °C. The microalgal population was monitored through cell counts in a Neubauer chamber until reaching a population of 10^7 cells mL⁻¹.

Next, the biomass was collected by centrifugation at $5000 \times g$ for 10 minutes at 4 °C and then diluted to different concentrations of 10, 20 and 30% v/v. The microalgal suspensions were applied via foliar spraying to flow onto the foliage in three periods of the soybean crop cycle: V3 – third trifoliolate leaf, which occurred 30 days after sowing; R1 – beginning of flowering, after 50 days; R5 – beginning of seed filling, after 70 days. For foliar applications 30 cm from the target, a 7 L Manual Sprayer - PALISAD-647508 was used, with a constant pressure of 2 BAR (or 29 PSI), a flow rate of 0.50 L min⁻¹.

2.2.2. Evaluated characteristics

The evaluation of stem height and diameter was carried out from the first spraying of the microalgae and then every 15 days until 100 days after sowing (DAS). Height was measured using a measuring ruler graduated in cm and diameter with a digital caliper in mm.

After 80 DAS, eight whole plants were collected from each treatment to determine the fresh mass of leaves, stems and roots. To determine the dry mass, the fresh material was packed in paper bags and kept in an oven with forced air circulation at 65 ± 5 °C until constant weight. The plant material from the dried leaves was ground and homogenized, and the macro- and micronutrient contents were determined [32].

To quantify the content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids, soybean leaves were collected 48 h after biofertilizer sprays (three applications), corresponding to 32, 52 and 72 DAS. Fifty milligrams of leaf samples were weighed and placed in test tubes with 5.0 mL of 80% acetone, where they were kept for 24 h in a refrigerated environment for pigment extraction [33]. Then, the OD of the supernatant was measured with a spectrophotometer at wavelengths of 470, 646.8 and 663.2 nm. The chlorophyll and carotenoid contents were calculated according to Lichtenthaler and Buschmann [34].

Finally, when the seeds reached 13% moisture, the remaining plants were harvested to determine the pod number/plant and seed number/plant, the seed mass and the mass of 100 seeds. The seeds were placed in paper bags and dried in an oven with forced air circulation at 65 ± 5 °C until constant mass was obtained. Then, they were ground and homogenized, and macro- and micronutrient contents were determined [32].

2.3. Statistical analysis

Population data, dry biomass and photosynthetic pigments were subjected to analysis of variance (ANOVA), and when significant by the F test ($p < 0.05$), the averages were compared by Tukey's test for the type of culture medium ($p < 0.05$). A logarithmic scale was used to transform data regarding the cell population of microalgae. In the metabolome analysis, the levels of the identified metabolites were grouped and are shown in a heatmap constructed using the *gplots* package [35] of R software, version 3.6.0 [36].

Plant height and stem diameter data taken during the cultivation cycle were assessed in plots subdivided by time and subjected to analysis of variance (ANOVA) and, when significant to the F test ($p < 0.05$), were subjected to regression analysis as a function of evaluation times and concentration of microalgal biomass, all at 5% probability. Mass and productivity data were compared by regression analysis for microalgal biomass concentration ($p < 0.05$). The data for photosynthetic pigments, macro- and micronutrients in leaves and seeds were compared using Tukey's test ($p < 0.05$). In addition, data were tested for normality using the Shapiro–Wilk test in the Past statistical program and transformed by square root of $x+0.5$ to fit a normal distribution.

3. Results and discussion

3.1. Biomass production of *D. abundans* in two culture media

To reduce the cost of producing microalgal biomass and make cultivation more accessible, an experiment was developed comparing a culture medium using a commercial fertilizer (CF) and a standard culture medium, i.e., BG-11 (Table 1). To compare the growth between the different media, the same initial microalgal cell density represented by 0.1 OD₆₈₀ nm was used, which corresponded to 3×10^5 cells mL⁻¹ of *D. abundans* L2B Bold.

The population data were similar in both culture media, as shown in Fig. 1. The population of *D. abundans* L2B Bold presented a similar curve in both media used, reaching the exponential phase (log) within 3 to 6 days. After 12 days, the microalgal population showed

slow growth, tending toward stabilization, with a population of 3.2×10^8 cells mL^{-1} in BG-11 and 2.0×10^8 cells mL^{-1} in the CF at 15 days of cultivation (Table 2). The growth followed the same trend as *Scenedesmus abundans* cultivated in CHU-13 medium; however, our result was superior, as the authors found a population of 6.0×10^6 after 15 days of cultivation [37].

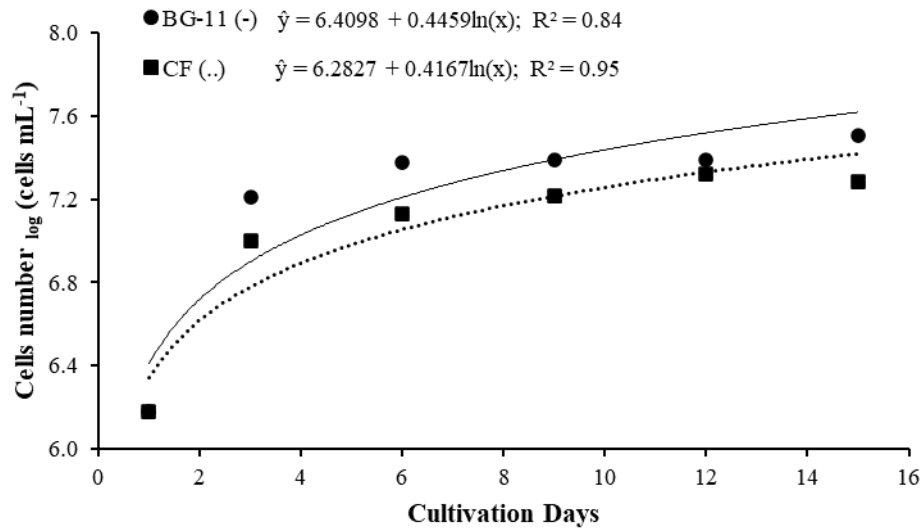


Fig. 1. *D. abundans* L2B Bold throughout cultivation in cultures on a standard medium BG-11 and commercial fertilizer (CF).

Table 2.

Population, photosynthetic pigments contents, dry biomass and production cost of 1 kg of dry biomass of *D. abundans* L2B Bold in different media after 15 days of cultivation.

Media	Population	DB	Cost 1 kg BMS
	Cells mL^{-1}	g L^{-1}	R\$
BG-11	$3.2 \times 10^8 (\pm 0.05)^a$	$1.86 (\pm 0.07)^a$	99.90
CF	$2.0 \times 10^8 (\pm 0.10)^a$	$1.32 (\pm 0.35)^a$	68.13
Media	Chlorophyll <i>a</i>	Chlorophyll <i>b</i>	Carotenoids
	----- mg L^{-1} -----		
BG-11	$15.86 (\pm 0.86)^a$	$2.40 (\pm 0.15)^a$	$26.03 (\pm 1.37)^a$
CF	$12.50 (\pm 0.50)^b$	$1.78 (\pm 0.06)^b$	$21.13 (\pm 0.81)^b$

* Equal letters in the column do not differ from each other, according to Tukey's test ($p < 0.05$).

BG-11 (blue-green algae medium), CF: Commercial fertilizer, DB: Dry biomass. Production of 1 L: BG-11 (BRL 0.18), Fertilizer (BRL 0.09).

However, the photosynthetic pigment contents of *D. abundans* L2B Bold were affected in cultivation using a commercial fertilizer (CF), with a decrease of 21.2% in chlorophyll *a*, 25.8% in chlorophyll *b*, and 18.8% in carotenoids after 15 days of culture compared to the BG-11 standard medium (Table 2). Therefore, N limitation probably occurred during *D. abundans* L2B Bold cultivation in the CF because microalgae of the genus *Desmodesmus* employ strategies such as the degradation of proteins and chlorophylls under N-deprived conditions [38]. Because chlorophyll is composed of mainly N, its breakdown redirects nutrients to growth metabolism and thus does not cause a negative effect on cell proliferation in CF cultivation (Fig. 1 and Table 2).

In addition, the lower concentration of magnesium in the CF medium compared to the BG-11 medium also affected the chlorophyll content of *D. abundans* L2B Bold biomass (Table 2). This is because magnesium is the central atom of chlorophyll and its ions are cofactors of key enzymes in metabolic pathway [39], thus decreasing the chlorophyll *a* and *b* content of the biomass. Mg-deprived in culture medium affected the chlorophyll content and growth of microalgae *C. vulgaris* and *S. obliquus*, however, there was an increase in cellular lipid content compared to the control treatment [40].

In mixotrophic cultivation, i.e., the addition of carbon sources (in this case, glucose), as used in this work, provides greater production of microalgal biomass [2]. However, to optimize growth, one must consider the sources of nitrogen and phosphorus, which are required at greater levels by *D. abundans*, and determine a concentration adequate for the microalgae [37]. The N deprivation observed by cultivation in the CF is probably due to the N source used, in this case, ammonium nitrate (NH_4NO_3), which supplies both nitrate (NO_3^-) and ammonia (NH_4^+) consumed by the microalgae, motivating N deprivation (Fig. 1).

The dry biomass of *D. abundans* L2B Bold was similar in BG-11 medium (1.82 g L^{-1}) and in CF (1.32 g L^{-1}) (Table 2), demonstrating that the formulations of commercial fertilizer (Table 1) used in the present study were adequate, satisfying the nutritional needs, as the dry biomass was statistically equal to a standard medium (BG-11) (Table 2). In addition, the costs for the production of 1 kg of dry biomass of microalgae in the two-culture media were calculated. The results of the cost analysis indicated that the use of commercial fertilizer reduced the cost of producing 1 kg of dry biomass of *D. abundans* L2B Bold by 31.8% relative to cultivation in BG-11 (Table 2). Recently, Ribeiro et al. [10] found that the production of microalgal biomass of *C. sorokiniana* cultivated with combinations of fertilizers based on urea, ammonia and nitrate reduced the cost by 95% compared to using BG-11 medium.

Fertilizers, such as those used in the present work, have known and stabilized compositions [8] and are easily found in local stores. Therefore, the similar results of population, dry biomass and cost reduction in the production of 1 kg of dry biomass in the cultivation in CF compared to the standard BG-11 medium (Fig. 1 and Table 2) justify cultivation in fertilizers. Thus, they are considered an economical substitute for nutrient requirements to obtain low-cost *D. abundans* L2B Bold biomass and are consequently amenable to large-scale use [8,10,41].

3.2. Metabolic profile of *D. abundans* L2B Bold in CF and BG-11

Analysis of the metabolites of *D. abundans* L2B Bold biomass cultivated in BG-11 and commercial fertilizer (CF) media was performed using a global metabolomics approach. A total of 177 metabolites were identified from the classes of organic acids, sugars, amino acids, amines, alcohols, ketones, esters and others. The most abundant classes were organic acids (19%), amines (14%), sugars (12%), fatty acids (11%) and esters (10%) (Fig. 2, Supplementary Table). The metabolite profiles are shown in a heatmap (Fig. 2), where the blue and red colors represent positive and negative correlations, respectively, of the metabolites of the microalgal biomass cultivated in different media formulations. In general, there was a higher abundance of metabolites in *D. abundans* L2B Bold biomass cultivated in CF compared to cultivation in BG-11, with increased levels of 96 metabolites identified under these conditions (Fig. 2). However, only 35 metabolites were more abundant in the biomass cultivated in BG-11 (Fig. 2).

The levels of fatty acids were more abundant in *D. abundans* L2B Bold biomass cultivated in CF, including 9,12-octadecadienoic acid (C18:2z) (8 ng g microalgae⁻¹), the main fatty acid of this microalgae. In addition, the levels of octadecanoic acid (C18:0) (14 ng g microalgae⁻¹), octatriacontyl pentafluoropropionate (296 ng g microalgae⁻¹), butanoic acid (C4:0) (11 ng g microalgae⁻¹), octacosyl trifluoroacetate (42 ng g microalgae⁻¹), docosanoic acid (C20:0) (19 ng g microalgae⁻¹), hexadecanoic acid (135 ng g microalgae⁻¹) (C16:0) and hexacosyl pentafluoropropionate (16 ng g microalgae⁻¹) also increased during cultivation in the CF (Fig. 2 and Supplementary Table).

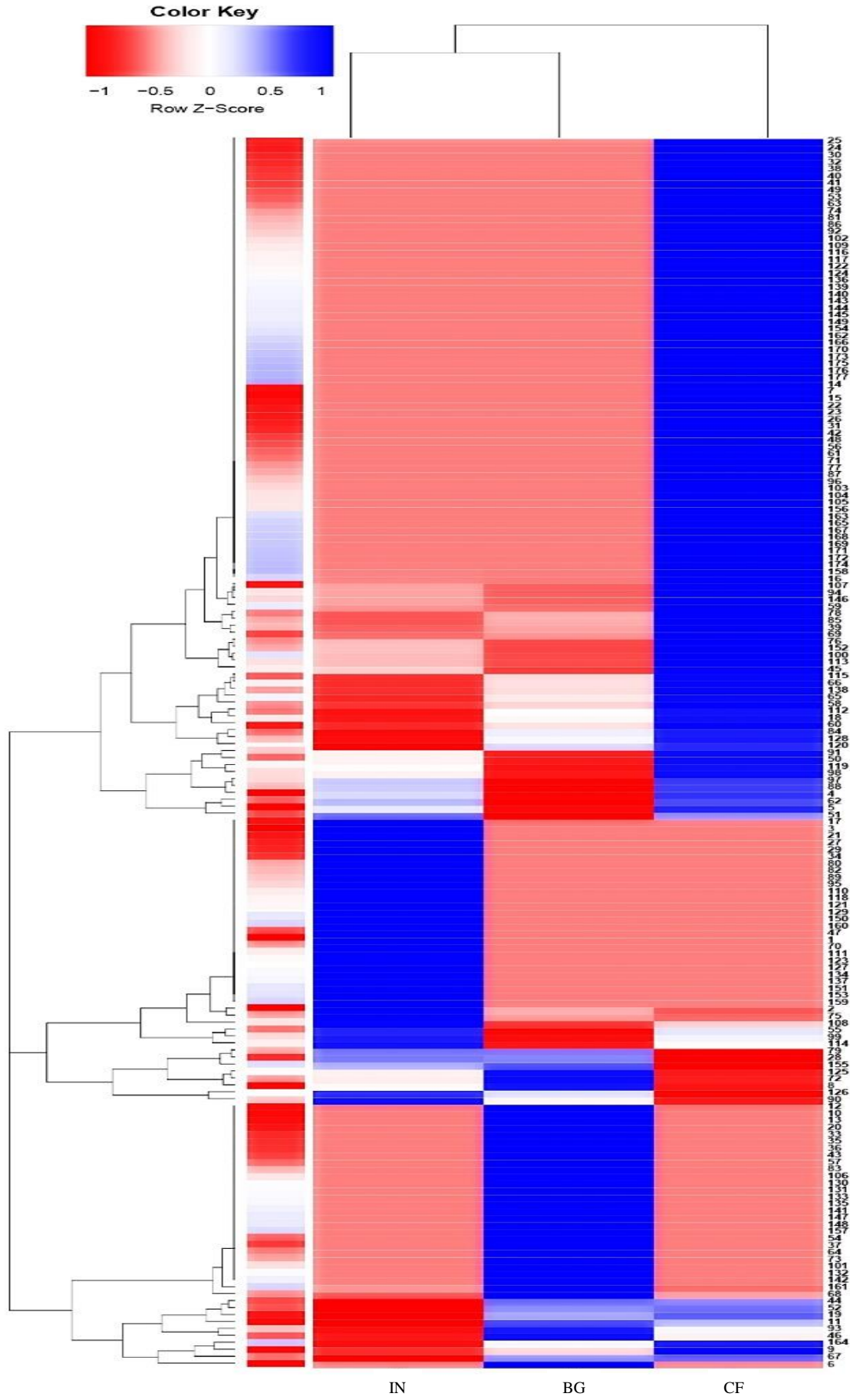


Fig. 2. Heat map of the metabolite compounds contained in *D. abundans* L2B Bold biomass initial (IN) and cultivated in blue-green algae 11 (BG) medium and commercial fertilizer (CF).

Thus, the accumulation of neutral lipids, mainly saturated fatty acids (Fig. 2. Supplementary Table), and the lower contents of photosynthetic pigments (Table 2) observed in the microalgae cultivated in the CF suggest stress caused by N depletion because this strategy to supply N demand has already been previously described for *D. abundans* [42]. The occurrence of the acyl group, i.e., hexadecanoic acid (C16:0) and octadecanoic acid (C18:0), which are more abundant in this culture, are final products of the *de novo* biosynthesis of fatty acids in microalgal plastids, a condition that occurs under N deprivation [42–44].

It has been suggested that the ability of membrane lipids to desaturate fatty acids is important for photosynthetic organisms to tolerate stress, particularly N deprivation [45]. Therefore, this metabolic pathway probably allowed conditions for cells to proliferate and not be affected by N depletion, producing biomass similar to the BG-11 standard medium (Table 2), a culture in which common metabolites were not observed under N deprivation conditions. (Fig. 2).

The highest concentrations of 2-[(trimethylsilyl)oxy]tetradecanoic acid (8 ng g microalgae⁻¹), arabino-hexaric acid (12 ng g microalgae⁻¹), azelaic acid (C9:0) (10 ng g microalgae⁻¹) and glycolic acid (11 ng g microalga⁻¹) in *D. abundans* L2B Bold biomass occurred in cultivation in CF (Fig. 2). The levels of 2-(methoxyimino)propanoic acid (31 ng g microalga⁻¹) were higher in cultivation in BG-11 (Fig. 2 and Supplementary Table). Therefore, the oleic fatty acids observed in the metabolic profile (linolenic and octadecanoic and hexadecanoic acids) (Fig. 2 and Supplementary Table) of the biomass cultivated in the CF were oxidized, thus producing dicarboxylic acids, such as azelaic acid, which was more abundant in the cultivated biomass in fertilizers (Fig. 2 and Supplementary Table). Azelaic acid is used as a carbon source for heterotrophic microalgae [46], which can explain the *D. abundans* L2B Bold population and consequently dry biomass in both culture media, even with stress, because of the N limitation observed in cultivation in CF.

Increases in glycolic acid levels in biomass cultivated in CF (Fig. 2 and Supplementary Table) are the result of chemical energy production through photorespiration in microalgae [47]. Photorespiration may have occurred because of the breakdown of chlorophyll *a* and *b*, as lower rates were observed in *D. abundans* L2B Bold biomass under these cultivation conditions (Table 2), promoting the production of chemical energy by photorespiration.

The highest levels of sugars such as alpha-D-glucopyranoside, 1,3,4,6-tetrakis-O (1.42 $\mu\text{g g microalgae}^{-1}$), D-(+)-talose, pentakis (1.55 $\mu\text{g g microalgae}^{-1}$), D-allose, pentakis (1.50 $\mu\text{g g microalgae}^{-1}$) and D-glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O (1.65 $\mu\text{g g microalgae}^{-1}$) in *D. abundans* L2B Bold biomass cultivated in the CF, products of carbon and energy source assimilation, indicate that the commercial fertilizer (CF) contributed to a better C uptake compared to the cultivation in BG-11. These molecules are metabolized in the tricarboxylic acid cycle (TCA), which directly or indirectly produces energy through the oxidation of acetyl-CoA and serves in the formation and biosynthesis of other compounds, such as amino acids and fatty acids [48]. Furthermore, compounds such as alpha-D-glucopyranoside, D-(+)-talose, D-allose and D-glucose (Fig. 2 and Supplementary Table) are rich in organic carbon and provide carbon/energy sources to increase triacylglycerol (TAG) biosynthesis, leading to lipid accumulation in *D. abundans* L2B Bold biomass, as shown in Fig. 2.

Many compounds from the classes of esters, ketones, alcohols and acetyls were identified, but most were found in very low concentrations in the microalgal biomass cultivated in both culture media (Fig. 2). These metabolites are the result of the fermentation process for the generation of ATP and NADH energy, probably because of the hypoxic conditions found in environments with little aeration, such as our cultivation conditions, and the consequence of microalgal proliferation, destabilizing oxygen concentrations [49].

In the biomass of *D. abundans* L2B Bold, four free amino acids were identified, of which aminolevulinic acid and alanine were more abundant in biomass cultivated in the CF, while glycine was more abundant in biomass in BG-11 (Fig. 2). The higher amino acid levels present in the biomass cultivated in the CF are mainly due to the N source used, in this case ammonium nitrate (NH_4NO_3), because in microalgae such as *D. abundans* L2B Bold, ammonium (NH_4^+) is captured via the ammonia channel transporter (NH_3), releasing protons and thus reducing energy expenditure [10].

In addition, the main route of N assimilation in microalgae is through the enzymes glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT), which use ammonia to form glutamine, the main component for amino acid synthesis [10]. Thus, the higher abundance of amino acids in the biomass cultivated in the CF can be explained by the greater biosynthesis of free amino acids, which in turn serve as a reserve of N for the production of microalgal biomass [38].

The study of the *D. abundans* L2B Bold metabolome provided information for cultivation in standard BG-11 medium and in a commercial fertilizer (CF). These findings allow

greater knowledge for improving microalgal cultivation, increasing biomass production and consequently reducing the process costs. In addition, these findings provided knowledge of molecules contained in the biomass of *D. abundans* L2B Bold, such as organic acids, mainly fatty acids, amino acids and sugars (Fig. 2 and Supplementary Table), which can stimulate the production of plant crops, presenting potential use as a biofertilizer. Therefore, because of these compounds, an experiment was carried out with the use of *D. abundans* L2B Bold biomass via foliar application to soybean crops to investigate the effect on soybean growth and yield.

3.3. Growth and productivity of soybean plants with microalgal biofertilizer

Soybean plant height was not influenced by the application of *D. abundans* L2B Bold biomass; the general average height was 68.5 cm. The stem diameter of soybean plants was influenced by the interaction of different concentrations of microalgal biomass and evaluation periods (Fig. 3). The application of microalgal biomass favored increased stem diameter, with a maximum diameter of 5.88 mm with the application of 20% of microalgal biomass at 80 DAS (Fig. 3), while in the control treatment, the maximum diameter was 5.16 mm at 80 DAS (Fig. 3).

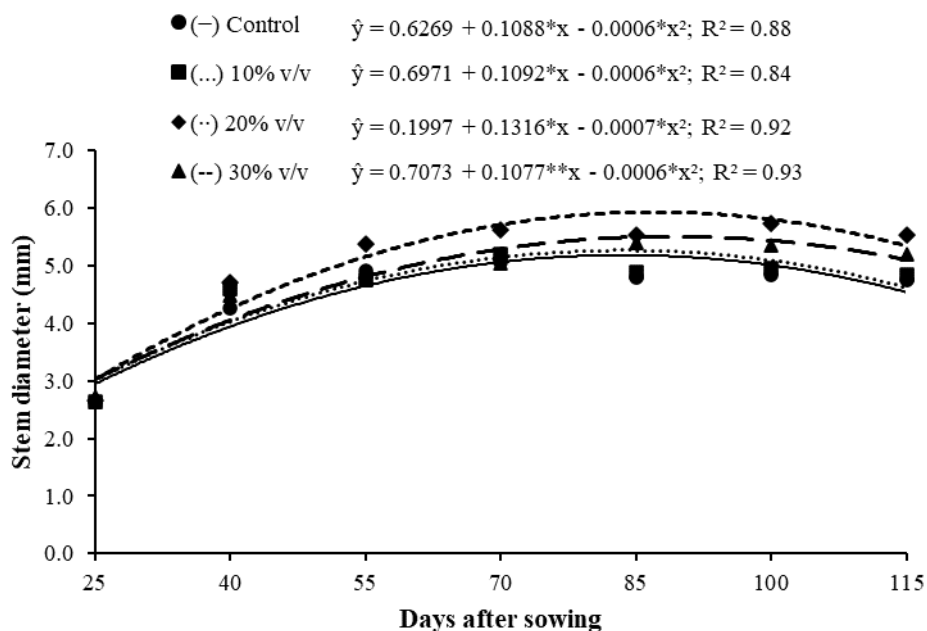


Fig. 3. Stem diameter of soybean plants with foliar application of increasing concentrations (0, 10, 20 and 30% v/v) of *D. abundans* L2B Bold biomass with a population of 10^7 cells mL^{-1} throughout the cultivation cycle.

Soybean plants sprayed with increasing concentrations of *D. abundans* L2B Bold biomass are shown in Fig. 4. It can be observed that spraying microalgal biomass promoted more uniform growth and better shoot development, such as larger leaves, favoring light capture for energy production in soybean plants; the best plant appearance was observed with the application of 20% (v/v) of *D. abundans* L2B Bold biomass (Fig. 4).



Fig. 4. Visual aspect of soybean plants under foliar application of increasing concentrations (0, 10, 20 and 30% v/v) of *D. abundans* L2B Bold biomass with a population of 10^7 cells mL^{-1} throughout the cultivation cycle.

Leaf fresh and dry mass and stem dry mass were influenced by foliar application of microalgae (Fig. 5). The stem fresh mass and root dry mass were not influenced by the microalgae, with averages of 6.42 and 2.39 g plant^{-1} , respectively. The greatest increases in mass occurred with the application of 20% microalgal biomass, with increases of 22% in fresh mass (Fig. 5A) and 23% in dry mass (Fig. 5B) of the leaves and 26.7% in stem dry mass (Fig. 5C) compared to plants without microalgal application (Figs. 5A, B and C).

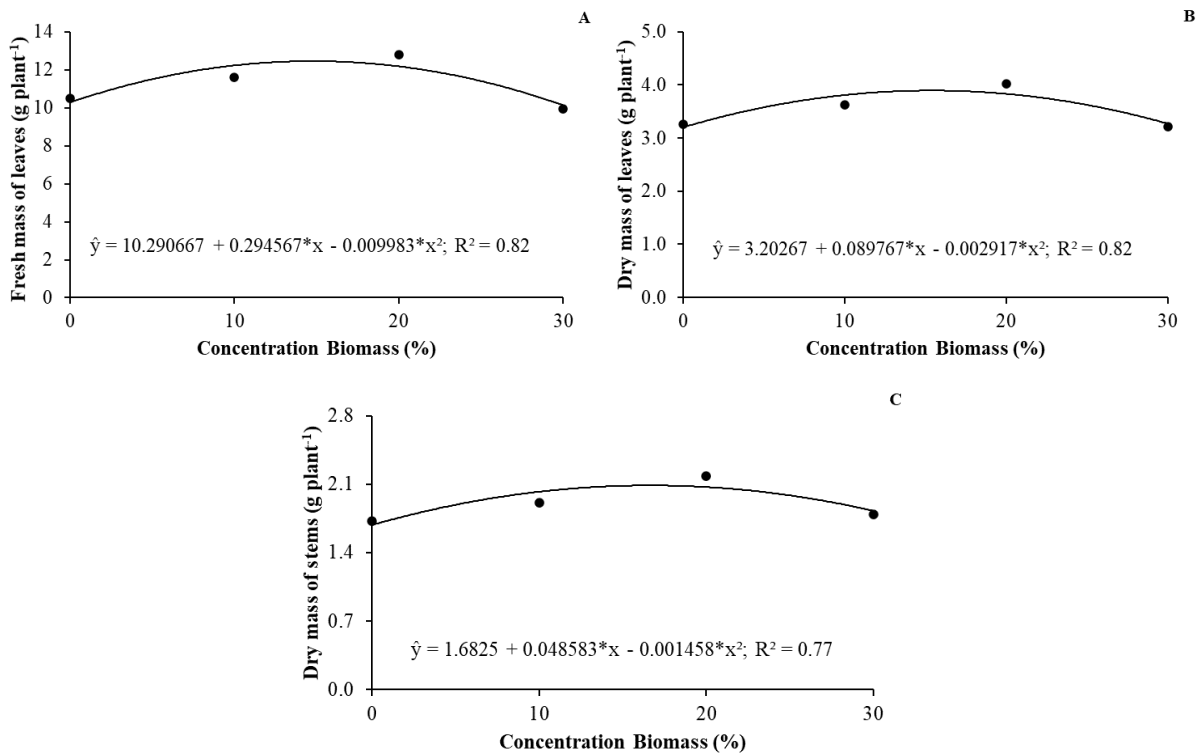


Fig. 5. Fresh and dry mass (A and B) of leaves and dry mass (C) of stems of the soybean plant after 70 days of sowing, cultivated under foliar applications of increasing concentrations of *D. abundans* L2B Bold (0, 10, 20 and 30 %) of a population of 10^7 cells mL⁻¹.

Our results regarding the increases in shoot fresh and dry mass with microalgal application are in agreement with several studies in the literature [4,50,51]. The application of 0.4 g L^{-1} *D. subspicatus* biomass significantly increased the shoot fresh and dry mass of tomato plants compared to the control [5]. In the same work, the authors found that aqueous extract of *D. subspicatus*, promoted cell division that stimulated the root system, providing greater nutrient uptake and resulting in better plant growth and consequently in greater accumulation of shoot mass.

Finally, the remaining plants were harvested to evaluate yield. Thus, the pod and seed numbers per plant and the 100-seed mass of soybeans were positively influenced by the foliar application of microalgal biomass (Fig. 6). Microalgal biomass spraying promoted higher yields, reaching maximum productivity at the 20% biomass application, with increases of 21.2% in the number of pods (Fig. 6A) and 27.7% of seeds (Fig. 6B), 42.3% of seed mass (Fig. 6C) and 14.4% of 100 seed mass (Fig. 6D) of soybean plants compared to the control (without microalgae).

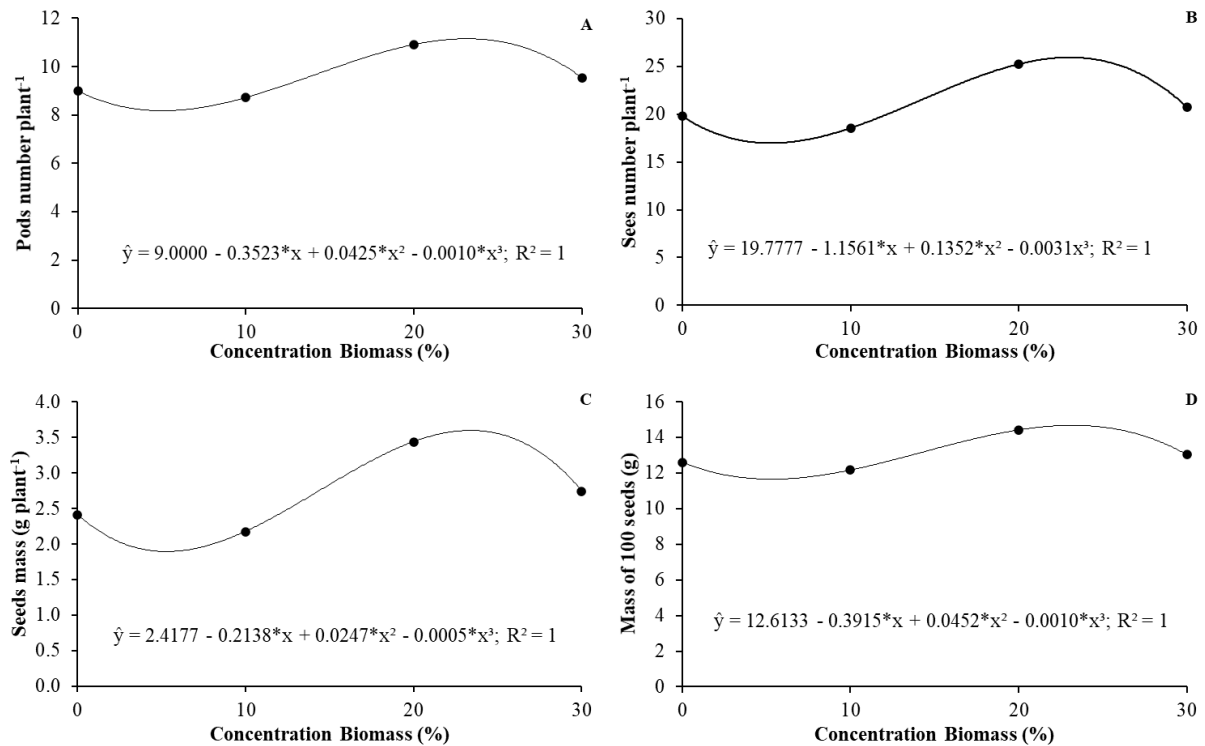


Fig. 6. Number of pods/plant (A) and seeds/plant (B), mass of seeds/plant (C) and mass of 100 seeds (D) of soybean cultivated with application of biomass concentrations of *D. abundans* L2B Bold with population 10^7 cells ml⁻¹.

Thus, foliar application of 20% *D. abundans* L2B Bold biomass promoted an increase in stem diameter (Fig. 3), gain in leaf fresh and dry mass and stem dry mass (Figs. 4 and 5), and greater pod production and seed number (Fig. 6) compared to the other treatments. The positive action of the microalgae on the soybean plant is due to the compounds contained in the biomass, such as amino acids (alanine and glycine), organic acids (linolenic, octadecanoic, hexadecanoic, azelaic and glycolic acids), sugars (alpha.-D-glucopyranoside, D-(+)-talose, D-allose and D-glucose) (Fig. 2 and Supplementary Table, [3]) and macro- and micronutrients [4], which, when applied via the foliar route, are readily absorbed by leaves through their stomata and cuticle pores and assimilated by metabolic pathways [52].

Amino acids such as alanine and glycine are mobile in soybean plants, with different actions. Alanine stimulates photosynthesis and protein synthesis [48] and may increase productivity and the specific weight of seeds [53], which occurred in our experiment (Fig. 6). Glycine, on the other hand, helps mainly in nutrient input because of its chelating function, i.e., cationic macro- and micronutrients attach to glycine instead of free cations, and because it is a mobile amino acid in the plant, it participates in nutrient transport through the phloem [48,53], which contributes to the increase in productivity with the application of biofertilizer (Fig. 6).

The amino acids present in *D. abundans* L2B Bold biomass are also sources of N, providing an exogenous source throughout the crop cycle and contributing to nitrogen metabolism [23,54].

The organic acids present in *D. abundans* biomass, such as linolenic, octadecanoic, hexadecanoic, azelaic and glycolic acids, are readily absorbed by the stomata of soybean leaves, providing carbon [55] and contributing to the larger stem diameter (Fig. 3) and greater shoot fresh and dry mass (Figs. 4 and 5), consequently increasing pod and seed number and 100 seed mass (Figs. 6A, B and C). Similar to our results, foliar application of 10 g 100 mL⁻¹ of *C. vulgaris* biomass and N-urea in the soil (1 g per pot) increased the shoot dry mass of *P. vulgaris*, the pod number per plant and the seed number per pod compared to plants without application of microalgal biomass [51]. Attribute increases are related to an adequate and balanced supply of nutrients to the plant throughout the growing period [51], indicating the action of *C. vulgaris* as a biostimulant to increase the growth and production of leguminous crops.

3.4. Leaf photosynthetic pigments and macro- and micronutrient contents of soybean leaves and seeds

The evaluations of photosynthetic pigment contents in the leaves and macro- and micronutrients in leaves and seeds were carried out only for the best microalgal treatment, i.e., 20% biomass, and samples from the control group. The photosynthetic pigment contents were not influenced by the application of *D. abundans* L2B Bold biomass (Fig. 7). Similarly, Lara et al. [56] reported that the foliar spraying of *Asterarcys quadricellulare* biomass in two tomato cultivars (cv. Giuliana-Sakata[®] and Neptuno-Blueseeds[®]) also did not influence the photosynthetic pigments of leaves; according to the authors, the effectiveness of microalgae in pigments is affected by different cultures and cultivars.

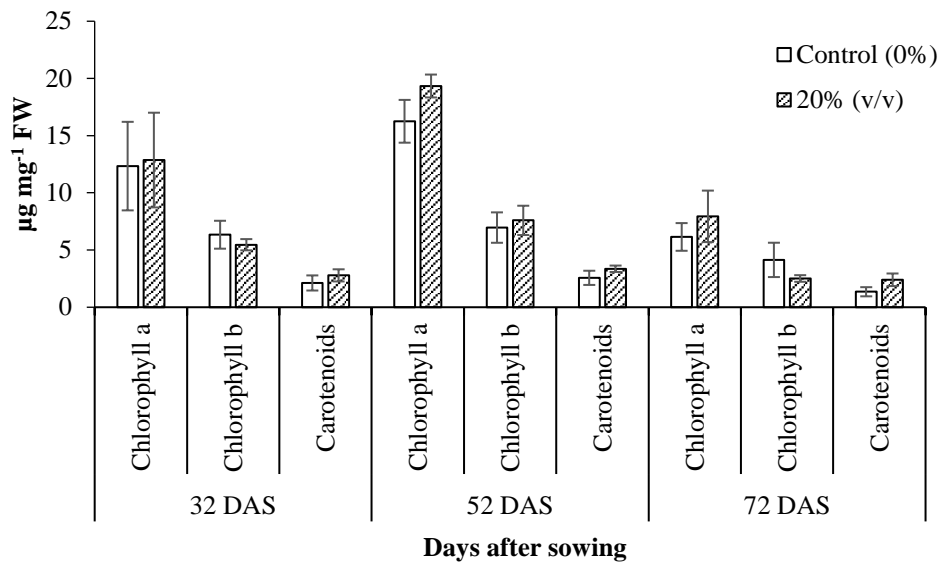


Fig. 7. Chlorophyll *a*, *b* and carotenoid content of soybean leaves with and without foliar application of 20% v/v of *D. abundans* L2B Bold biomass with a population of 10^7 cells mL^{-1} throughout the cultivation cycle. FW: Fresh weight of leaves.

Peak levels of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids occurred at 52 DAT (Fig. 7), corresponding to the period of greatest nutrient uptake by the crop (45 days). This is an important response for the soybean crop, because after this stage, for 30 days, the critical period occurs, in which the species must be well nourished to avoid affecting seed yields [57]. Subsequently, pigment levels tend to drop because of the nutrients being used to fill the seeds, as found in this work (Fig. 7).

For the nutrient content of the soybean plant leaves, only the potassium content was influenced, in which a higher content (15.56 g kg^{-1}) was observed in the leaves of the control plant compared to the content (12.66 g kg^{-1}) of leaves under 20% BF (Table 3). For the other macro- and micronutrient contents, there were no significant differences with the application of microalgal biomass (Table 3).

Table 3.

Macro and micronutrient content in leaves and soybeans, without and with 20% spraying of *D. abundans* L2B Bold biomass with a population of 10^7 cells mL^{-1} .

Minerals	Sfredo [57]	Leaf tissue		Brunini et al. [58]	Seeds content	
		without microalgae	with microalgae		without microalgae	with microalgae
N (g kg^{-1})	32.0	14.3 ± 0.4 a	13.7 ± 0.2 a	51.0	46.4 ± 7.7 b	58.5 ± 2.3 a

P (g kg ⁻¹)	2.4	2.9 ± 0.1 a	2.8 ± 0.3 a	5.0	7.9 ± 0.2 a	7.7 ± 0.1 a
K (g kg ⁻¹)	15.0	15.5 ± 2.2 a	12.6 ± 0.6 b	17.0	20.5 ± 0.4 a	20.3 ± 1.3 a
Ca (g kg ⁻¹)	9.2	15.1 ± 0.1 a	15.2 ± 0.4 a	3.0	3.3 ± 0.2 a	3.5 ± 0.4 a
Mg (g kg ⁻¹)	4.7	3.6 ± 0.1 a	3.63 ± 0.1 a	2.0	3.1 ± 0.1 a	3.0 ± 0.1 a
S (g kg ⁻¹)	10.0	1.7 ± 0.1 a	1.8 ± 0.1 a	5.4	3.9 ± 0.1 a	4.0 ± 0.3 a
Cu (mg kg ⁻¹)	-	-	-	10.0	7.3 ± 0.9 a	5.9 ± 1.7 b
Zn (mg kg ⁻¹)	21.0	64.2 ± 2.7 a	63.7 ± 1.2 a	40.0	76.6 ± 2.0 a	76.5 ± 2.1 a
Fe (mg kg ⁻¹)	390.0	193.0 ± 92.3 a	190.3 ± 34.3 a	70.0	69.0 ± 2.2 a	62.1 ± 2.6 b
Mn (mg kg ⁻¹)	100.0	110.4 ± 17.1 a	100.9 ± 9.9 a	30.0	31.8 ± 1.5 a	32.0 ± 1.0 a
B (mg kg ⁻¹)	57.0	23.4 ± 1.4 a	22.0 ± 0.3 a	20.0	15.4 ± 1.0 a	12.3 ± 2.9 b
Protein content (%)	-	-	-	32.7	30.16 ± 0.23 b	38.11 ± 1.52 a

Means followed by the same letter on the line do not differ from each other, according to Tukey's test ($p > 0.05$).

K is an important enzymatic activator and regulates the opening and closing of stomata; it is highly mobile in plant organs and is transported to flowers or developing fruits [57], creating favorable conditions for metabolic processes that require more energy. In this sense, the lower foliar K content of plants treated with 20% microalgal biomass (Table 3) may be due to K metabolism, since the best results for stem diameter (Fig. 3), leaf fresh and dried mass and stem mass (Fig. 5) occurred in this treatment. Some elements, such as N, Mg, S and, mainly, Fe, regardless of the treatment, are present in lower amounts than those recommended in the literature [57]. This difference is because the analyses took place at 80 DAS, immediately after nutrient accumulation decreased, due to mobilization for the reproductive phase, flower emission and seed formation, and later seed filling [59], especially the N content, the essential element of soybean proteins.

The nitrogen content of soybean seeds was increased by 26% with the application of biofertilizer compared to seeds cultivated without microalgae (Table 3). However, the content of some micronutrients, such as Cu, Fe and B, declined in seeds treated with biofertilizer (Table 3). The protein content of the soybean seeds increased by 26.4% with the application of the biofertilizer compared to the control (Table 3). The higher N content in soybeans is because of the amino acids (glycine and alanine) present in *D. abundans* L2B Bold biomass (Fig. 2 and Supplementary Table), as they are linked to N metabolism and regulate N uptake by the plant [23,54] that is then exported to the seeds (Table 3). The analysis of the minerals in the seeds revealed that the contents were within the ranges observed in the literature [58], regardless of the treatment.

The crude protein concentration (38.11%) observed in soybeans grown under 20% *D. abundans* L2B Bold biomass foliar spraying (Table 3) was higher than those obtained in 11 different soybean cultivars, ranging from 32.7 to 35.5% [58]. Biofertilizers and biostimulants from microalgae can promote an increase in soluble proteins in plants through N assimilation [54] and an increase in the number of transcripts of key enzymes involved in nitrogen metabolism [23], thus stimulating the metabolism of amino acids and leading to protein synthesis [60].

Thus, our study demonstrates the potential of *D. abundans* L2B Bold biomass grown on a commercial fertilizer (CF) for low-cost and affordable biomass production (Table 2) because of its constituent compounds (Fig. 2, Supplementary Table); foliar application in soybean stimulated an increase in stem diameter (Fig. 3), fresh and dry mass of the plant (Fig. 5), and N and protein content in soybean seeds (Table 3), in addition to greater production of pods and consequently seeds (Fig. 6), without compromising the nutritional properties of the seeds (Table 3). In this context, microalgae-based biofertilizers are alternative bioinputs for more sustainable agriculture [15] and can contribute by providing compounds [14], with the aim of supplying the demand for the production of the most cultivated oilseed in the world.

4. Conclusions

Therefore, we conclude that the use of commercial fertilizer makes the cultivation and biomass production of *Desmodium abundans* L2B Bold cheaper and more accessible, because agricultural fertilizers are widely commercialized and easily obtained in comparison to analytical-grade components, such as the formulation of BG-11.

Foliar application of 20% (v/v) *D. abundans* L2B Bold biomass in soybean crops promotes better plant growth and higher seed production as well as an increase in total proteins and nitrogen in the seeds, which may be a potential source of bioinput in oilseed production.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support.

Supplementary Table. Metabolites identified by NIST library, after separation by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), using MCW as an extractor of the biomass of the microalgae *D. abundans* L2B Bold cultivated in BG-11 medium and commercial fertilizer (CF).

No.	Compound	IN	BG	CF
		-----µg g microalgae-----		
----- <i>Desmodesmus abundans</i> L2B Bold-----				
Acetals				
1	Acrolein dimethyl acetal	0.00054	-	-
2	Decanal dimethyl acetal	0.00263	0.00039	-
3	Methoxyacetaldehyde diethyl acetal	0.00087	-	-
4	1.3.5-Trioxepane	0.00105	-	0.00148
5	1.3-Dioxolane	0.00072	0.00047	0.00087
6	3-Hydroxy-2-methylpentyl propionate	0.00051	0.00089	0.00051
7	Dimethoxymethane	-	-	0.00029
Fatty acids				
8	trimethylsilyl 2.3.4-tris(trimethylsilyloxy)butanoate	0.00159	0.00336	-
9	9.12-Octadecadienoic acid (Z,Z) - Linoleic acid. TMS(9Z.12Z)-. trimethylsilyl ester	0.00363	0.00497	0.00838
10	D-erythro-Pentonic acid	-	0.00109	-
11	Cyclopropene. 3.3-diphenyl-1-trimethylsilyl	-	0.00032	0.00026
12	Hexadecane. 1.1-dimethoxy	-	0.0002	-
13	Trimethylsilyl 4-[bis(trimethylsilyl)amino]-4-oxo-2- [(trimethylsilyl)amino]butanoate	-	0.00204	-
14	Octadecanoic acid. 2-oxo	-	-	0.01499
15	Octanoic acid. trimethylsilyl	-	-	0.00302
16	Octatriacontyl pentafluoropropionate	0.00122	-	0.2969
17	1.2.3-Propanetricarboxylic acid	0.00238	-	-
18	Butanoic acid. 4-[bis(trimethylsilyl)amino]	-	0.00521	0.01141
19	trans-3-Hexenedioic acid. bis(trimethylsilyl)	-	0.00149	0.00172
20	Tris.2-trimethylsilyloxypropane-1.2.3-tricarboxylate	-	0.00214	-
21	2.6.11-Trimethyldodecane	0.00891	-	-
22	Octacosyl trifluoroacetate	-	-	0.04249
23	Methyl 3.3-dimethoxypropionate	-	-	0.00054
24	Docosanoic acid. docosyl	-	-	0.01945
25	Hexadecanoic acid. octadecyl	-	-	0.13543
26	Hexacosyl pentafluoropropionate	-	-	0.01663
27	4-Pentenoic acid. trimethylsilyl ester	0.00123	-	-
28	Butanedioic acid. [(trimethylsilyl)oxy]	0.00494	0.00482	-

29	Octanoic acid trimethylsilyl ester	0.00262	-	-
30	Tetradecanoic acid. trimethylsilyl ester	-	-	0.00232
Organic acids				
31	beta.-Hydroxypyruvic acid	-	-	0.00363
32	2-[(Trimethylsilyl)oxy]tetradecanoic acid	-	-	0.00807
33	2-Keto-d-gluconic acid. pentakis(O-trimethylsilyl)	-	0.00492	-
34	2-Methyl-3-ethyl-3-hydroxyglutaric acid	0.00255	-	-
35	3-Deoxy-ribo-hexonic acid. pentakis-TMS	-	0.02755	-
36	4-Methylvaleric acid	-	0.00106	-
37	Acetic acid. Trimethylsilyl bis[(trimethylsilyl)oxy]acetate	-	0.00093	-
38	Allonic acid. 2.3.5.6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)	-	-	0.00793
39	Arabino-hexaric acid. 3-deoxy-2.4.5-tris-O-(trimethylsilyl)	-	0.00131	0.01291
40	Azelaic acid. bis(trimethylsilyl) ester	-	-	0.01078
41	Benzeneacetic acid. .alpha..3.4-tris[(trimethylsilyl)oxy]	-	-	0.00464
42	D-(-)-Lactic acid. trimethylsilyl ester	-	-	0.00208
43	Decanoic acid. 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[[(trimethylsilyl)oxy]methyl]ethyl ester	-	0.00171	-
44	D-Gluconic acid. 2.3.4.5.6-pentakis-O-(trimethylsilyl)	-	0.00228	0.00224
45	Ethanedioic acid. bis(trimethylsilyl) ester	0.00073	-	0.00267
46	Gluconic acid. .gamma.-lactone	-	0.0072	0.00304
47	Glutamic acid. N-(trimethylsilyl)	0.00166	-	-
48	Glycolic acid. trimethylsilyl ester	-	-	0.01138
49	Hydantoic acid	-	-	0.00329
50	L-(+)-Lactic acid. trimethylsilyl ester	0.00183	0.00046	0.0037
51	Malonic acid. bis(2-trimethylsilylethyl ester	0.00615	0.00228	0.00587
52	Mannonic acid. 2.3.4.6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)	-	0.05239	0.0551
53	Methylmaleic acid. bis(trimethylsilyl) ester	-	-	0.00143
54	N.O.O'-Tris-6-hydroxy-2-amino-hexanoic acid	-	0.00106	-
55	Oxalic acid. ethyl neopentyl ester	0.0047	-	0.00308
56	Propanedioic acid. methyl	-	-	0.00705
57	Propanoic acid. 2-(methoxyimino)	-	0.03187	-
58	Propanoic acid. 2-oxo-. trimethylsilyl ester	-	0.00157	0.00642
59	Sulfurous acid. Isopropyl pentadecyl sulfite	0.00217	-	0.03243
Sugares				
60	alpha.-D-Glucopyranoside. 1.3.4.6-tetrakis-O	0.15711	0.54788	1.42586
61	2.3.4-Trihydroxybutyric acid tetrakis	-	-	0.00463
62	D-(-)- Tagatofuranose.5TMS derivate	0.00254	0.00172	0.00268
63	D-(-)-Fructose. pentakis(trimethylsilyl) ether	-	-	0.43078

64	D-(+)-Galactopyranose. pentakis(trimethylsilyl) ether	-	0.11351	-
65	D-(+)-Talose. pentakis(trimethylsilyl) ether	-	0.56108	1.55837
66	D-Allose. pentakis(trimethylsilyl) ether. methyloxime	-	0.46803	1.50399
67	D-Fructose. 1.3.4.5.6-pentakis-O-(trimethylsilyl)	0.1639	0.50674	0.53745
68	d-Galactose. 2.3.4.5.6-pentakis-O-. o-methyloxyme	-	0.24137	0.0274
69	D-Glucose. 2.3.4.5.6-pentakis-O-(trimethylsilyl)	-	0.12666	1.65006
70	d-Mannitol. 1-decylsulfonyl	0.02288	-	-
71	d-Mannose. 2.3.4.5.6-pentakis-O. o-methyloxyme	-	-	0.0168
72	D-Psicofuranose. pentakis(trimethylsilyl) ether	0.00503	0.01288	-
73	Galactose methoxyamine	-	0.06894	-
74	Glucopyranose. pentakis-O-trimethylsilyl	-	-	0.1831
75	L-(-)-Sorbose. 5TMS derivative	0.12086	0.01194	-
76	Mannose. 6-Deoxy-2.3.4.5-tetrakis-O-hexose	0.00126	-	0.00631
77	Myo-Inositol. 1.2.3.4.5.6-hexakis-O-(trimethylsilyl)	-	-	0.00134
78	Per-O- (3-O-.beta.-d-mannopyranosyl-d-glucitol)	-	0.00296	0.01947
79	Sorbopyranose. 1.2.3.4.5-pentakis-O-(trimethylsilyl)	0.01127	0.01136	-
80	Pulchelloside I. trimethylsilyl ether	0.00172	-	-
Amines				
81	Baclofen. N-dimethylaminomethylene	-	-	0.00105
82	(2S)-2-amino-N-ethylpropanamide	0.00033	-	-
83	(2S,3S)-N-Methoxy-2.3.4-tris(trimethylsilyloxy)butan-1-imine	-	0.00215	-
84	1.3-Benzoxazol-2-amine-ditms	-	0.00222	0.00369
85	2-(2'.4'.4'.6'.6'.8'.8'-Heptamethyltetrasiloxan-2'-yloxy)	-	0.00049	0.0035
86	2-Aminononadecane	-	-	0.01119
87	2-Azabutane. N-amidino-4.4-dimethoxy	-	-	0.00339
88	2-Methylaminomethyl-1.3-dioxolane	0.00193	-	0.00251
89	2-Propenamide. Acrylamide	0.00053	-	-
90	3.6-bis(methylsulfanyl)-1.2.4.5-tetrazine	0.0024	0.00106	-
91	3-Trifluoromethylbenzylamine. N.N-dinonyl	0.0023	0.00086	0.00425
92	Benzeneethanamine. N-[(pentafluorophenyl)methylene]	-	-	0.00492
93	Butanal. 2.3.4-tris[(trimethylsilyl)oxy]	-	0.00941	0.0051
94	Diethylenetriamine	0.00052	-	0.004927
95	N.N-bis(trimethylsilyl)-1.3-benzoxazol-2-amine	0.00181	-	-
96	N.N-dimethylformamide	-	-	0.00101
97	N-methylhexan-1-amine	0.00017	-	0.00021
98	Phenethylamine. N-methyl-β.3.4-tris(trimethylsiloxy)	0.00103	-	0.00248
99	Propanamide	0.00344	-	0.002
100	dl-Alanylglycylglycine	0.00089	-	0.00501
101	benzhydryl(trimethyl)silane	-	0.00104	-

102	Ala-gly. trimethylsilyl ester	-	-	0.00062
103	Albizzin	-	-	0.00147
104	N-(2-Methylphenyl)-3-trimethylsilyloxybut-2-enamide	-	-	0.00328
105	1-Propanamine	-	-	0.00328
Alcohols				
106	1.3-Dioxolane-2-methanol	-	0.00041	-
107	1.4-Butanediol	0.00089	-	0.008165
108	2-(Methylamino)ethanol	0.00104	-	0.00028
109	2-[(Trimethylsilyl)oxy]propan-1-ol	-	-	0.00199
110	Cyclohexanol. 2-(trimethylsilyl)	0.00245	-	-
111	pentane-1.3.5-triol	0.00055	-	-
Amino acids				
112	delta. Amino levulinic acid tri-TMS	-	0.00509	0.01017
113	Carbamic acid. methyl ester	0.00013	-	0.00076
114	Alanine	0.00105	-	0.0005
115	beta-alanine	-	0.00035	0.00112
116	D-Alanine	-	-	0.00205
117	dl-Alanyl-dl-methionine	-	-	0.00038
118	Glycine	0.0016	-	-
119	l-Alanine	0.00083	-	0.001723
ketones				
120	(Z)-Bis-1.2-(trimethylsilyloxy)ethylene	-	0.00084	0.00121
121	3.5-Dimethyl-4-octanone	0.00028	-	-
122	3-Hexanone. 2.2-dimethyl	-	-	0.00474
123	3-Methylheptan-4-one	0.00057	-	-
124	4-(Trimethylsilyloxy)-3-penten-2-one	-	-	0.00481
125	alpha-ketoglutaric acids	0.00135	0.00328	-
Estes				
126	1-(2-Methoxyethoxy)-2-methyl-2-propanol	0.00096	0.00063	-
127	1-Ethyl-2-pentamethyldisilanyloxycyclohexane	0.00069	-	-
128	2-(1-Bromoethyl)-1.3-dioxolane	-	0.00071	0.00128
129	2-Methylbutyl propionate	0.00048	-	-
130	Bis(2-methoxyethyl) 2.3-dihydroxysuccinate	-	0.00272	-
131	Bis (2E)-2-(methoxyimino)pentanedioate	-	0.00329	-
132	Bis 2.3-bis[(trimethylsilyl)oxy]succinate	-	0.00167	-
133	Bis 2-[(trimethylsilyl)oxy]tetradecanedioate	-	0.00084	-
134	bis(trimethylsilyl) carbonate	0.00106	-	-
135	ethyl 3-bromo-2-(1-ethoxyethoxy)propanoate	-	0.0067	-
136	Hexacosyl trifluoroacetate	-	-	0.00336

137	isopropoxy(trimethyl)silane	0.00083	-	-
138	Propane. 2-methoxy-2-methyl	-	0.00036	0.00123
139	Silane. trimethyl(1-methylethoxy)	-	-	0.00264
140	Silanol. trimethyl-. carbonate	-	-	0.00191
141	Trimethylsilyl 4-pentenoate	-	0.00182	-
142	Trimethylsilyl propionate	-	0.00043	-
Other class				
143	alpha.-D-Mannofuranoside. 1-O-octyl	-	-	0.00161
144	beta.-d-Lyxofuranoside. O-nonyl	-	-	0.00369
145	1.1-dimethoxypropane	-	-	0.00189
146	1.2-Hydrazinedicarboxamide	0.00062	-	0.00615
147	1.4-dihydro-1.2.4-triazol-5-one	-	0.00249	-
148	1.5-bis(trimethylsilyloxy)pentan-2-yloxy-trimethylsilane	-	0.00102	-
149	1.6:3.4-Dianhydro-2-deoxy-.beta.-d-ribo-hexopyranose	-	-	0.006
150	1-Chloroheptacosane	0.03327	-	-
151	1-decylsulfonyldecane	0.00582	-	-
152	1H-1.2.4-Triazole-3-carboxylic acid	0.00215	-	0.01118
153	1-iodononane	0.00028	-	-
154	2-(1.1.3.3-Tetramethylbutyl)-1.4-benzenediol ditms	-	-	0.0013
155	2.6-Lutidine 3.5-dichloro-4-dodecylsulfanyl	0.0026	0.00302	-
156	2-methylhexacosane	-	-	0.09629
157	2-pentadecyl-1.3-dioxolane	-	0.00061	-
158	3H-1.2.4-Triazol-3-one. 1.2-dihydro	0.00012	-	0.0255
159	8-hexylpentadecane	0.03711	-	0.00017
160	Ammonium carbamate	0.00013	-	-
161	cyclopenten-1-yloxy(trimethyl)silane	0.00177	0.02454	-
162	Di-n-decylsulfone	-	-	0.0012
163	Disulfide. di-tert-dodecyl	-	-	0.00283
164	1.2.5-Oxadiazole-3.4-dicarboxamide tetratms	0.00226	0.00339	0.00433
165	Heptacosane. 1-chloro	-	-	0.00725
166	Heptadecane. 2.6.10.15-tetramethyl	-	-	0.02771
167	Hexadecane. 1.1-dimethoxy	-	-	0.00141
168	Octacosyl trifluoroacetate	-	-	0.04249
169	Octadecane. 1-[2-(hexadecyloxy)ethoxy]	-	-	0.00668
170	Octane. 1-(1-ethoxyethoxy)	-	-	0.00454
171	Tetrapentacontane. 1.54-dibromo	-	-	0.16137
172	Tetratetracontane	-	-	0.20153
173	Triacontane. 1-bromo	-	-	0.91814
Desconhecidos				

174	1-Pentene. trimethylsilyloxyphenyl)	1-trimethylsilyloxy-1-(2'-	-	-	0.0017
175	2-Pentamethyldisilanyloxybutane		-	-	0.00454
176	Diethyl 4,4'-methylenedioallophanate		-	-	0.00119
177	Isocitric lactone. bis(trimethylsilyl)		-	-	0.01243

References

- [1] C. Falaise, C. François, M.A. Travers, B. Morga, J. Haure, R. Tremblay, F. Turcotte, P. Pasetto, R. Gastineau, Y. Hardivillier, V. Leignel, J.L. Mouget, Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture, *Mar. Drugs*. 14 (2016) 1–27. <https://doi.org/10.3390/md14090159>.
- [2] G. Zuccaro, A. Yousuf, A. Pollio, J.-P. Steyer, Microalgae Cultivation Systems, in: *Microalgae Cultiv. Biofuels Prod.*, Elsevier Inc., 2020: pp. 11–29. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00002-3>.
- [3] R. Ekmay, S. Gatrell, K. Lum, J. Kim, X.G. Lei, Nutritional and metabolic impacts of a defatted green marine microalgal (*Desmodesmus* sp.) biomass in diets for weanling pigs and broiler chickens, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 9783–9791. <https://doi.org/10.1021/jf501155n>.
- [4] S.R. Bettani, G. de Oliveira Ragazzo, N. Leal Santos, T.G. Kieckbusch, R. Gaspar Bastos, M.R. Soares, M. Altenhofen da Silva, Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer, *Carbohydr. Polym.* 203 (2019) 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.041>.
- [5] E. Mazepa, B. V. Malburg, G. Mógor, A.C. de Oliveira, J.O. Amatussi, D.O. Corrêa, J.S. Lemos, D.R.B. Ducatti, M.E.R. Duarte, Á.F. Mógor, M.D. Nosedá, Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*, *Algal Res.* 59 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102434>.
- [6] Y. Lu, J. Xu, Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology?, *Trends Plant Sci.* 20 (2015) 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>.
- [7] W.A. Stirk, J. Van Staden, Plant growth regulators in seaweeds: Occurrence, regulation and functions, in: *Adv. Bot. Res.*, 1st ed., Academic Press Inc., Scottsville, 2014: pp. 125–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00005-6>.
- [8] L.H. Sipaúba-Tavares, A.M.D.L. Segali, F.A. Berchielli-Morais, B. Scardoeli-Truzzi, Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic

- fertilizer and macrophyte, *Acta Limnol. Bras.* 29 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x3916>.
- [9] J.K. Abdulsamad, S.A. Varghese, J. Thajudeen, Cost effective cultivation and biomass production of green microalga *Desmodesmus subspicatus* mb. 23 in NPK fertilizer medium, *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 9 (2019) 599–604. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.599-604>.
- [10] D.M. Ribeiro, L.F. Roncaratti, G.C. Possa, L.C. Garcia, L.J. Cançado, T.C.R. Williams, B. dos Santos Alves Figueiredo Brasil, A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers, *Bioresour. Technol. Reports.* 9 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100354>.
- [11] L. Covell, M. Machado, M.G.M.V. Vaz, J. Soares, A.D. Batista, W.L. Araújo, M.A. Martins, A. Nunes-Nesi, Alternative fertilizer-based growth media support high lipid contents without growth impairment in *Scenedesmus obliquus* BR003, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43 (2020) 1123–1131. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02301-z>.
- [12] A. Tucci, C.Z. Branco, C.K. Peres, A. Fajar, M. Menezes, Chlorophyceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, *Flora Do Bras.* (2015). <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB118453> (accessed December 10, 2020).
- [13] J.E. Abril Bonett, P. de Sousa Geraldino, P.G. Cardoso, F. de Freitas Coelho, W.F. Duarte, Isolation of freshwater microalgae and outdoor cultivation using cheese whey as substrate, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 29 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101799>.
- [14] J.C.A. Braun, L.M. Colla, Use of Microalgae for the Development of Biofertilizers and Biostimulants, *Bioenergy Res.* (2022) 1–22. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10456-8>.
- [15] M.C. Meyer, A. de F. Bueno, S.M. Mazaro, J.C. da Silva, *Bioinsumos na cultura da soja*, Brasília - DF, 2022.
- [16] Embrapa, *Visão 2030 - o futuro da agricultura brasileira*, Embrapa, Brasília - DF, 2018. <http://www.embrapa.br/futuro>.
- [17] P. Chiaiese, G. Corrado, G. Colla, M.C. Kyriacou, Y. Rouphael, Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01782>.
- [18] CONAB. Brazilian National Food Supply Agency, *Acompanhamento da Safra*

- Brasileira, Bol. Da Safra 2021. 9 (2022) 60. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>.
- [19] SoyStats, International: Brazil & Argentina Production, Am. Soybean Assoc. (2022). <http://soystats.com/international-brazil-argentina-production/> (accessed June 24, 2022).
- [20] J. Medic, C. Atkinson, C.R. Hurburgh, Current knowledge in soybean composition, JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc. 91 (2014) 363–384. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2407-9>.
- [21] M.R. Suchithra, D.M. Muniswami, M.S. Sri, R. Usha, A.A. Rasheeq, B.A. Preethi, R. Dinesh kumar, Effectiveness of green microalgae as biostimulants and biofertilizer through foliar spray and soil drench method for tomato cultivation, South African J. Bot. 146 (2022) 740–750. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.12.022>.
- [22] R. Dineshkumar, J. Subramanian, P. Sampathkumar, Prospective of *Chlorella vulgaris* to Augment Growth and Yield Parameters Along with Superior Seed Qualities in Black Gram, *Vigna mungo* (L.), Waste and Biomass Valorization. 11 (2020) 1279–1287. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0465-9>.
- [23] E.C.N. Cordeiro, Á.F. Mógor, J.O. Amatussi, G. Mógor, H.M.C. Marques, G.B. de Lara, Microalga biofertilizer improves potato growth and yield, stimulating amino acid metabolism, J. Appl. Phycol. 34 (2022) 385–394. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02656-0>.
- [24] A. Ilavarasi, D. Mubarakali, R. Praveenkumar, E. Baldev, N. Thajuddin, Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production, Biotechnology. 10 (2011) 540–545. <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.540.545>.
- [25] I. Havlik, P. Lindner, T. Scheper, K.F. Reardon, On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria, Trends Biotechnol. 31 (2013) 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.005>.
- [26] M.H. Sarrafzadeh, H.J. La, S.H. Seo, H. Asgharnejad, H.M. Oh, Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification, J. Biotechnol. 216 (2015) 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.010>.
- [27] L.C. Fernández-Linares, C. Guerrero Barajas, E. Durán Páramo, J.A. Badillo Corona, Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium, Bioresour. Technol. 244 (2017) 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.141>.
- [28] J. Wang, L. Chen, X. Tian, L. Gao, X. Niu, M. Shi, W. Zhang, Global metabolomic and network analysis of *Escherichia coli* responses to exogenous biofuels, J. Proteome Res.

- 12 (2013) 5302–5312. <https://doi.org/10.1021/pr400640u>.
- [29] M. Zeng, W. Hao, Y. Zou, M. Shi, Y. Jiang, P. Xiao, A. Lei, Z. Hu, W. Zhang, L. Zhao, J. Wang, Fatty acid and metabolomic profiling approaches differentiate heterotrophic and mixotrophic culture conditions in a microalgal food supplement “Euglena,” *BMC Biotechnol.* 16 (2016) 49. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0279-4>.
- [30] D.M.G. de Sousa, E. Lobato, Correção do solo e adubação da cultura da soja, Embrapa - CPAC. (1996) 31.
- [31] F.C. da Silva, Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, 2nd ed., Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2009.
- [32] E. Malavolta, Manual de Nutrição Mineral de Plantas, 1st ed., Agronômica Ceres, São Paulo - SP, 2006. <https://pt.scribd.com/document/468454177/Manual-de-Nutricao-Mineral-de-Plantas-Malavolta-Completo-pdf> (accessed June 24, 2022).
- [33] C. Costa, J.A. Costa, Índice de clorofila em soja, Turrialba. 39 (1989) 85–90.
- [34] H.K. Lichtenthaler, C. Buschmann, Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy, *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 1 (2001) F4.3.1-F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>.
- [35] G.R. Warnes, B. Bolker, L. Bonebakker, R. Gentleman, W. Huber, A. Liaw, T. Lumley, M. Maechler, A. Magnusson, S. Moeller, M. Schwartz, B. Venables, T. Galili, Various R Programming Tools for Plotting Data [R package gplots version 3.1.1], (2016). <https://cran.r-project.org/package=gplots> (accessed July 25, 2020).
- [36] R DEVELOPMENT CORE TEAM, A Language and Environment for Statistical Computing, (2020). <https://www.r-project.org/> (accessed July 5, 2020).
- [37] R.K. Moorthy, M. Premalatha, M. Arumugam, Batch sedimentation studies for freshwater green alga *Scenedesmus abundans* using combination of flocculants, *Front. Chem.* 5 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00037>.
- [38] L. Xia, H. Yang, Q. He, C. Hu, Physiological responses of freshwater oleaginous microalgae *Desmodesmus* sp. NMX451 under nitrogen deficiency and alkaline pH-induced lipid accumulation, *J. Appl. Phycol.* 27 (2015) 649–659. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0371-x>.
- [39] V. da Silva Ferreira, C. Sant’Anna, Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6>.
- [40] P.C. Gorain, S.K. Bagchi, N. Mallick, Effects of calcium, magnesium and sodium

- chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae, *Environ. Technol. (United Kingdom)*. 34 (2013) 1887–1894. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.812668>.
- [41] S.E. Ezeani, G.O. Abu, Commercial Microalgae Culture in Inorganic Fertilizer Media, *Curr. J. Appl. Sci. Technol.* 38 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.9734/cjast/2019/v38i430372>.
- [42] L. Xia, J. Rong, H. Yang, Q. He, D. Zhang, C. Hu, NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*, *Bioresour. Technol.* 161 (2014) 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.063>.
- [43] V. Pozzobon, W. Levasseur, C. Guerin, N. Gaveau-Vaillant, M. Pointcheval, P. Perré, *Desmodesmus* sp. pigment and FAME profiles under different illuminations and nitrogen status, *Bioresour. Technol. Reports.* 10 (2020) 100409. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2020.100409>.
- [44] Y. Xiao, J. Zhang, J. Cui, Y. Feng, Q. Cui, Metabolic profiles of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under nitrogen-deficiency stress, *Bioresour. Technol.* 130 (2013) 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.116>.
- [45] M. Patelou, C. Infante, F. Dardelle, D. Randewig, E.D. Kouri, M.K. Udvardi, E. Tsiplakou, L. Mantecón, E. Flemetakis, Transcriptomic and metabolomic adaptation of *Nannochloropsis gaditana* grown under different light regimes, *Algal Res.* 45 (2020) 101735. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101735>.
- [46] A.A. Shibl, M.A. Ochsenkühn, A.R. Mohamed, L. Coe, Y. Yun, S.A. Amin, Molecular mechanisms of microbiome modulation by the diatom secondary metabolite azelaic acid, *BioRxiv.* (2022) 2022.04.08.487398. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.08.487398v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.08.487398v1.abstract>.
- [47] N.K. Kang, M. Kim, K. Baek, Y.K. Chang, D.R. Ort, Y.S. Jin, Photoautotrophic organic acid production: Glycolic acid production by microalgal cultivation, *Chem. Eng. J.* 433 (2022) 133636. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2021.133636>.
- [48] L. Taiz, E. Zeiger, I. Moller, A. Murphy, *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*, 6^a, Artmed, Porto Alegre, 2017.
- [49] A. Atteia, R. Van Lis, A.G.M. Tielens, W.F. Martin, Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827 (2013) 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.08.002>.

- [50] F.A. Faheed, Z.A.-E. Fattah, Effect of *Chlorella vulgaris* as Bio-fertilizer on Growth Parameters and Metabolic Aspects of Lettuce Plant, *J. Agric. Soc. Sci.* 4 (2008) 1813–2235. <http://www.fspublishers.org>.
- [51] D.A. Refaay, E.M. El-Marzoki, M.I. Abdel-Hamid, S.A. Haroun, Effect of foliar application with *Chlorella vulgaris*, *Tetrademus dimorphus*, and *Arthrospira platensis* as biostimulants for common bean, *J. Appl. Phycol.* 33 (2021) 3807–3815. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02584-z>.
- [52] D. Battacharyya, M.Z. Babgohari, P. Rathor, B. Prithiviraj, Seaweed extracts as biostimulants in horticulture, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 196 (2015) 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>.
- [53] W.D. Carciochi, L.H.M. Rosso, M.A. Secchi, A.R. Torres, S. Naeve, S.N. Casteel, P. Kovács, D. Davidson, L.C. Purcell, S. Archontoulis, I.A. Ciampitti, Soybean yield, biological N₂ fixation and seed composition responses to additional inoculation in the United States, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56465-0>.
- [54] M. Weiland, S. Mancuso, F. Baluska, Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*, *Funct. Plant Biol.* 43 (2015) 1–25. <https://doi.org/10.1071/FP15109>.
- [55] I.D. Coutinho, L.M.M. Henning, S.A. Döpp, A. Nepomuceno, L.A.C. Moraes, J. Marcolino-Gomes, C. Richter, H. Schwalbe, L.A. Colnago, Flooded soybean metabolomic analysis reveals important primary and secondary metabolites involved in the hypoxia stress response and tolerance, *Environ. Exp. Bot.* 153 (2018) 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.018>.
- [56] G.B. Lara, Á. Mógor, J. de O. Amatussi, E.C.N. Cordeiro, H.M.C. Marques, G. Mógor, Microalga improve the growth, yield, and contents of sugar, amino acid, and protein of tomato, *Cienc. e Agrotecnologia*. 46 (2022) 1–9. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202246023821>.
- [57] G.J. Sfredo, Soja no Brasil: calagem, adubação e nutrição mineral, Embrapa Soja. (2008) 148. <http://www.cnpso.embrapa.br/download/Doc305.pdf>.
- [58] M.A. Brunini, M.A. de L. Barros, M. Pereira, J.B. Cerqueira, P.T.R. Menezes, I.R. Furtado, Qualidade De Grãos De Onze Cultivares De Soja, *Nucl. Anim.* 8 (2016) 55–62. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.2154>.
- [59] A.L. Thomas, J. a. Costa, Desenvolvimento da planta de soja e o potencial de rendimento de grãos, *Soja Manejo Para Alta Prod. Grãos.* (2010) 13–33.
- [60] S. Nardi, D. Pizzeghello, M. Schiavon, A. Ertani, Plant biostimulants: Physiological

responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism, *Sci. Agric.* 73 (2016) 18–23. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0006>.

ANEXOS

Quadro 1. Quadrados médios de contagem celular da microalga *D. abundans* L2B Bold ao longo do ciclo nos diferentes meios de cultivo.

FV	GL	Quadrados médios
Meio	1	0,2841 ^{ns}
Resíduo <i>a</i>	2	0,0095
Período	5	1,2859**
Período x Meio	5	0,0252 ^{ns}
Resíduo <i>b</i>	22	0,0177
C.V. 1 (%)		6,10
C.V. 2 (%)		10,51
Média Geral		1,7x10 ⁷

** significativo pelo teste F, p<0,01; * significativo pelo teste F, p<0,05; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.

Quadro 2. Quadrados médios da análise de variância dos teores de pigmentos da biomassa e biomassa seca da microalga *D. abundans* L2B Bold.

FV	GL	Quadrados médios			
		Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenoides	Biomassa seca
Meio	1	0,0371*	0,0067*	0,0023*	0,0578 ^{ns}
Resíduo	4	0,0798	0,0148	0,2816	0,0177
C.V. (%)		7,45	7,62	6,67	9,24
Média Geral		13,95	2,07	22,97	1,60

** significativo pelo teste F, p<0,01; * significativo pelo teste F, p<0,05; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.

Quadro 3. Quadro de análise de variância dos quadrados médios de altura das plantas e diâmetro do caule de plantas de soja em função das concentrações da biomassa de *D. abundans* L2B Bold e épocas de avaliações.

FV	GL	Quadrados médios	
		Altura das plantas	Diâmetro do caule
Bloco	2	4,7586	0,3064

Concentração	3	7,5912 ^{ns}	0,6774*
Resíduo <i>a</i>	6	15,3082	0,0971
Épocas de avaliações	6	472,0155**	7,0645**
Épocas de avaliações x Concentração	18	1,0695 ^{ns}	0,0492*
Resíduo <i>b</i>	972	1,9294	0,0184
C.V. 1 (%)		28,50	13,76
C.V. 2 (%)		10,17	6,0
Média Geral		68,54	4,69

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$; * significativo pelo teste F, $p < 0,05$; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.

Quadro 4. Quadrados médios dos conteúdos dos pigmentos fotossintéticos das folhas de soja em função da aplicação via foliar de 20% da biomassa *D. abundans* L2B Bold e controle.

FV	GL	Quadrados médios		
		Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenoides
Bloco	2	1,4822	0,5352	0,2105
Concentração	1	0,5248 ^{ns}	0,1808 ^{ns}	0,5869 ^{ns}
Resíduo <i>a</i>	2	0,0785	0,2672	0,0344ns
Épocas de coletas	2	7,2322**	2,3023**	0,3289**
Épocas de coletas x Concentração	2	0,0863 ^{ns}	0,1839 ^{ns}	0,0172 ^{ns}
Resíduo <i>b</i>	26	0,1493	0,0349	0,0254
C.V. 1 (%)		7,97	21,49	10,97
C.V. 2 (%)		10,99	7,77	9,42
Média Geral		12,48	5,50	2,43

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$; * significativo pelo teste F, $p < 0,05$; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.

Quadro 5. Quadrados médios das massas frescas e secas de folhas e caules e massas secas das raízes da planta da soja em função da aplicação via foliar de diferentes concentrações da biomassa de *D. abundans* L2B Bold.

FV	GL	Quadrados médios	
		MF Folhas	MS Folhas
Bloco	2	69,2264	8,3660

Concentração	3	38,7805**	3,3316**	
Resíduo	90	2,7443	0,1663	
C.V. (%)		14,77	11,56	
Média Geral		11,21	3,52	
FV	GL	Quadrados médios		
		MF Caules	MS Caules	MS Raízes
Bloco	2	7,9568	1,4114	2,2301
Concentração	3	8,3394**	0,9990**	0,9513 ^{ns}
Resíduo	90	0,7738	0,0457	0,9257
C.V. (%)		13,70	11,26	20,95
Média Geral		6,42	1,90	2,39

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$; * significativo pelo teste F, $p < 0,05$; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.

Quadro 6. Quadrados médios dos macros e micronutrientes foliares de soja em função da aplicação foliar de 20% da biomassa de *D. abundans* L2B Bold e controle.

FV	GL	Quadrados médios					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Bloco	2	0,0816	0,1266	7,0816	0,1050	0,0066	0,0050
Concentração	1	0,6016 ^{ns}	0,0150 ^{ns}	12,6150*	0,0066 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0150 ^{ns}
Resíduo	2	0,2916	0,0600	2,7050	0,1616	0,0200	0,0650
C.V. (%)		3,85	8,50	11,65	2,65	3,89	14,57
Média Geral		14,01	2,88	14,11	15,20	3,63	1,75
FV	GL	Quadrados médios					
		Cu	Zn	Fe	Mn	B	
Bloco	2	-	14,9550	15,9854	180,3116	2,2016	
Concentração	1	-	0,4266 ^{ns}	0,0934 ^{ns}	134,4266 ^{ns}	3,0816 ^{ns}	
Resíduo	2	-	2,9216	3,2349	501,1216	2,2316	
C.V. (%)		-	2,67	13,20	21,19	6,58	
Média Geral		-	64,00	191,68	105,66	22,71	

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$; * significativo pelo teste F, $p < 0,05$; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.

Quadro 7. Quadrados médios dos macros e micronutrientes dos grãos de soja em função da aplicação foliar de *D. abundans* L2B Bold e controle.

FV	GL	Quadrados médios					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Bloco	2	44,5550	0,1050	1,1316	0,3216	0,006	0,0800
Concentração	1	219,6150*	0,0600 ^{ns}	0,0816 ^{ns}	0,0600 ^{ns}	0,0150 ^{ns}	0,0150 ^{ns}
Resíduo	2	66,2550	0,0050	2,1016	0,0350	0,0173	0,0600
C.V. (%)		15,52	0,91	7,10	5,40	1,80	6,20
Média Geral		52,45	7,80	20,41	3,46	3,11	3,95

FV	GL	Quadrados médios					
		Cu	Zn	Fe	Mn	B	Teor de proteína
Bloco	2	5,2266	14,2066	17,7450	1,0016	6,4866	75,8822
Concentração	1	2,6666*	0,0266 ^{ns}	70,7266*	0,1066 ^{ns}	14,4150*	379,215*
Resíduo	2	1,7866	0,5066	4,5316	4,9616	12,1400	10,9594
C.V. (%)		20,15	0,93	3,25	6,98	25,04	9,70
Média Geral		6,63	76,56	65,60	31,93	13,91	34,13

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$; * significativo pelo teste F, $p < 0,05$; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.

Quadro 8. Quadrados médios do número de legumes e grãos por planta de soja, bem como, peso dos grãos soja função da aplicação via foliar de concentrações crescentes da biomassa de *D. abundans* L2B Bold.

FV	GL	Quadrados médios		
		Nº legumes	Nº grãos	Peso de grãos
Bloco	2	0,4557	2,0648	0,5547
Concentração	3	0,8958*	3,5675**	0,7988**
Resíduo	138	0,1041	0,2794	0,0576
C.V. (%)		10,25	11,48	13,60
Média Geral		9,54	21,07	2,69

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$; * significativo pelo teste F, $p < 0,05$; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.

Quadro 9. Quadrado médio do peso de 100 grãos de soja em função da aplicação foliar de *D. abundans* L2B Bold.

FV	GL	Quadrados médios
		Peso 100 grãos
Bloco	2	6,5469
Concentração	3	5,7018*
Resíduo	18	1,2162
C.V. (%)		8,45
Média Geral		13,05

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$; * significativo pelo teste F, $p < 0,05$; ns: não significativo pelo teste F. CV: Coeficiente de variação.