

THIAGO ABRANTES SILVA

BIOMASSA DE MICROALGAS COMO BIOESTIMULANTE: APLICAÇÃO NO SOLO, PRODUTIVIDADE DE PLANTA E ANÁLISE DE CICLO DE VIDA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Maria Lúcia Calijuri

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586b
2021
Silva, Thiago Abrantes, 1992-
Biomassa de microalgas como bioestimulante : aplicação no solo, produtividade de planta e análise de ciclo de vida / Thiago Abrantes Silva. – Viçosa, MG, 2021.
90 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Lúcia Calijuri.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Águas residuais - Purificação. 2. Produtos biológicos.
3. Solos - Respiração. 4. Adubos e fertilizantes orgânicos.
5. Ciclo de vida - Avaliação. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Civil. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Civil. II. Título.

CDD 22. ed. 628.3

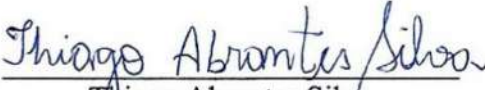
THIAGO ABRANTES SILVA

BIOMASSA DE MICROALGAS COMO BIOESTIMULANTE: APLICAÇÃO NO SOLO, PRODUTIVIDADE DE PLANTA E ANÁLISE DE CICLO DE VIDA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de março de 2021.

Assentimento:


Thiago Abrantes Silva
Autor


Maria Lúcia Calijuri
Orientadora

**À minha mãe duas vezes, Amélia, *in memoriam*.
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe duas vezes, Amélia, que agora está no céu, mas estará sempre viva em meu coração;

Agradeço à professora Maria Lúcia Calijuri, por toda a orientação, suporte e confiança depositada em mim;

Aos Doutores Jackeline de Siqueira Castro e Vinícius José Ribeiro, por todo suporte, paciência e esclarecimento de dúvidas;

Agradeço à Doutora Gabriella Peterlini Tavares, por todo apoio e participação em fins de semanas intermináveis realizando análises.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior por toda a paciência em explicar os mais diversos conceitos do universo da estatística;

À Jéssica Ferreira, pelo apoio imprescindível para a elaboração deste trabalho;

Agradeço aos professores da Universidade Federal Viçosa (UFV) pelos valiosos ensinamentos e ensino de qualidade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, pela oportunidade de realização deste curso;

A toda a minha família, por todo o amor, sempre me dando forças para que eu chegasse até aqui;

Ao Pablo, pela parceria, amor e carinho, me ajudando e me incentivando em todos os momentos;

Aos meninos: Alexia, Arthur, Iara e Matheus, por terem sido grandes amigos nessa jornada. E aos demais colegas do SIGEOnPA: Letícia, Vitor, Juliana, Adriana, Sabrina e Bianca.

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

Enfim, agradeço a todos que não foram citados, nominalmente, mas que contribuíram para que o meu objetivo fosse alcançado.

BIOGRAFIA

Thiago Abrantes Silva, filho de Roberto Carlos da Silva e Elisângela dos Santos Abrantes, nasceu em Mauá – SP, em 27 de abril de 1992. Concluiu o ensino médio em 2009 na “Escola Estadual Sebastião Vayego de Carvalho”. Em 2015, iniciou o curso de Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde se formou como engenheiro ambiental em julho de 2019. Em agosto de 2019, ingressou no programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UFV, quando iniciou suas atividades do mestrado. Em março de 2021, defende sua dissertação perante o programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO

SILVA, Thiago Abrantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Biomassa de microalgas como bioestimulante: Aplicação no solo, produtividade de planta e análise de ciclo de vida.** Orientadora: Maria Lúcia Calijuri.

A biomassa de microalgas cultivada em efluentes tem potencial para ser aplicada em rotas tecnológicas sustentáveis para a obtenção de bioprodutos. Essa biomassa é rica em matéria orgânica e nutrientes e possui grande aplicação como bioestimulante do solo. No presente estudo, aplicou-se biomassa de microalgas seca na forma de mistura, em solos de diferentes horizontes: (i) Horizonte A: Retirado na profundidade de 0 a 10 cm, com alto teor de matéria orgânica (Solo A) e; (ii) Horizonte B: Retirado na profundidade entre 20 e 40 cm (Solo B). Aplicou-se doses de 0,25%, 0,5%, 1% e 2% de biomassa em cada tipo de solo. Avaliou-se, para cada dose aplicada em cada tipo de solo, a respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana, carbono orgânico total e atividade enzimática das enzimas β -glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e urease. Além disso, avaliou-se o crescimento de milho (*Zea Mays* L.) mediante a aplicação da biomassa de microalgas no solo. Conclui-se que, para as análises relativas ao solo, a aplicação de 2% de biomassa no solo A apresentou os maiores valores de respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana, carbono orgânico total e atividade enzimática, ou seja, esse tratamento maximizou as variáveis analisadas. Entretanto, considerando que o crescimento de planta deve estar em consonância com as alterações nas características do solo, o resultado que proporcionou a maior massa da matéria seca da parte aérea da planta, portanto a dose ideal de biomassa, foi mediante aplicação de 0,55% de biomassa no solo A. Em doses maiores de biomassa o crescimento da planta foi inibido. Dos resultados obtidos, entende-se que a utilização da biomassa de microalgas como bioestimulante do solo é uma alternativa para o aproveitamento de bioprodutos gerados no tratamento de águas residuárias. Com relação aos impactos ambientais do experimento, por meio da avaliação do ciclo de vida, realizada no software Simapro®, foram avaliados os impactos ambientais da aplicação de biomassa de microalgas produzida a partir do tratamento de efluente de indústria de alimentos em dois tipos de solos com diferentes teores de matéria orgânica. Os principais dados utilizados na análise são de origem primária. A unidade funcional da análise foi 1 kg de planta. Diferentes cenários (quatro) foram analisados, nos quais, para cada tipo de solo, avaliou-se opções na etapa de colheita da biomassa, sendo coagulação química e sedimentação

gravitacional. O inventário realizado mostra que, no geral, há maior gasto energético e de insumos para o solo de Horizonte B, para equalizar a eficiência da produtividade de planta no solo de Horizonte A. Os resultados da pegada de carbono mostram que, apesar de haver fatores contribuintes que apresentaram carga positivo de pegada de carbono, no geral, todos os cenários avaliados tiveram economia de pegada de carbono. Observa-se que se evita mais água, nitrogênio e fósforo para o tratamento em solo de Horizonte B, pois para esse solo é necessário produzir mais biomassa para se obter a mesma eficiência de crescimento da planta quando comparado ao solo de Horizonte A. Pela análise de Monte Carlo, as principais incertezas observadas no presente estudo são relativas à depleção fóssil e mudanças climáticas nos cenários que utilizam coagulação química.

Palavras-chave: Tratamento de Efluente. Bioprodutos. Respiração do Solo. Fertilização Orgânica. Avaliação de Ciclo de Vida.

ABSTRACT

SILVA, Thiago Abrantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2021. **Microalgae biomass as biostimulant: Soil application, plant productivity and life cycle assessment.** Adviser: Maria Lúcia Calijuri.

The microalgae biomass grown in wastewater has the potential to be applied in sustainable technological routes to obtain bioproducts. This biomass is rich in organic matter and nutrients and has great application as soil biostimulant. In the present study, dry microalgae biomass was applied as a mixture, in soils of different horizons: (i) Horizon A: Taken at a depth of 0 to 10 cm, with a high organic matter content (Soil A) and; (ii) Horizon B: Taken at depth between 20 and 40 cm (Soil B). Doses of 0.25%, 0.5%, 1% and 2% of biomass were applied to each soil type. Basal soil respiration, microbial biomass carbon, total organic carbon and enzymatic activity of β -glycosidase, acid phosphatase, arylsulfatase and urease were evaluated for each dose applied to each soil type. In addition, the growth of corn (*Zea Mays* L.) was evaluated by applying microalgae biomass to the soil. It is concluded that, for the analyzes related to the soil, the application of 2% of biomass in soil A presented the highest values of basal respiration of the soil, microbial biomass carbon, total organic carbon and enzymatic activity, that is, this treatment maximized the analyzed variables. However, considering that plant growth must be in line with changes in soil characteristics, the result that provided the largest shoot dry matter mass, therefore the ideal dose of biomass, was by applying 0.55 % of biomass in the soil A. In larger doses of biomass, plant growth was inhibited. From the results obtained, it is understood that the use of microalgae biomass as a soil biostimulant is an alternative for the use of bioproducts generated in wastewater treatment. With regard to the environmental impacts of the experiment, through the life cycle assessment, carried out in the Simapro® software, the environmental impacts of microalgae biomass produced from the food industry wastewater treatment applied in two types of soils with different levels of organic matter were evaluated. The main data used in the analysis are of primary origin. The functional unit of the analysis was 1 kg of plant. Different scenarios (four) were analyzed, in which, for each type of soil, options were evaluated in the biomass harvest stage, being chemical coagulation and gravitational sedimentation. The inventory carried out shows that, in general, there is a higher energy and input expenditure for Horizon B soil, to equalize the efficiency of plant productivity in Horizon A soil. The results of carbon footprint show that, although there are factors contributors who

had a positive carbon footprint charge, in general, all scenarios evaluated had a carbon footprint economy. It is observed that more water, nitrogen and phosphorus are avoided for the treatment in soil of Horizon B, because in this soil it is necessary to produce more biomass to obtain the same growth efficiency of the plant when compared to the soil of Horizon A. Regarding Monte Carlo analysis, the main uncertainties observed in the life cycle assessment are related to fossil depletion and climate change in scenarios that use chemical coagulation.

Keywords: Effluent Treatment. Bioproducts. Soil Respiration. Organic Fertilization. Life Cycle Assessment.

LISTA DE TABELAS

Table 4.1. Phytoplankton community present in the biomass produced from effluent treatment.	25
Table 4.2. Chemical characteristics of microalgae biomass.	26
Table 4.3. Chemical and physical characteristics of the soils used in the experiment.	27
Table 4.4. Coefficients of the logistic equation and time required to achieve the CO ₂ release half-life time ($t_{1/2} = -b/c$) in 40 days for the different types of soil and treatments applied. .	39
Table 4.5. Coefficients of the logistic equation and time required to reach half of the maximum cumulative production of MBC ($t_{1/2} = -b/c$) in 40 days for the different types of soil and the different treatments applied.	40
Table 4.6. Coefficients of the logistic equation, the half-life time of β -glucosidase (a), arylsulfatase (b), acid phosphatase (c), and urea (d) ($t_{1/2} = -b/c$) for 40 days for the different types of soil and the different treatments applied.	41
Table 4.7. Basal soil respiration in different works.	48
Tabela 5.1. Dados primários e secundários utilizados como entrada na ACV.	62
Tabela 5.2. Inventários de ciclo de vida.	68
Tabela 5.3. Resumo percentual dos principais fatores de impacto para cada categoria.	74
Tabela 5.4. Resultados da simulação de Monte Carlo para as categorias de impacto diretamente afetadas pelas emissões relacionadas à aplicação de biomassa de microalgas no solo.	80
Tabela 5.5. Probabilidade de cenários com sedimentação gravitacional indicarem impactos menores do que cenários em que se utilizou NaOH na etapa de colheita de biomassa.	81

LISTA DE FIGURAS

Fig. 4.1. BSR in different types of soil, for the different treatments applied over time. (a) Soil A and (b) Soil B.....	34
Fig. 4.2. MBC in different types of soil, for the different treatments applied over time. (a) Soil A and (b) Soil B.....	35
Fig. 4.3. TOC concentration for the different treatments and different types of soil analysed 0 DAT, 20 DAT, and 40 DAT. (a) Soil A (b) Soil B.	36
Fig. 4.4. Enzymatic activity in different horizons, for different treatments applied over time. β -glucosidase in (a) soil A, (b) soil B, acid phosphatase in (c) soil A, (d) soil B, arylsulfatase in (e) soil A, (f) in soil B, urease in (g) soil A and (h) soil B.....	38
Fig. 4.5. Concentration of (a) calcium, (b) zinc, (c) sodium, (d) boron and (e) iron for each treatment and each soil. * Significant at 5% probability. ** Significant at 1% probability.....	46
Fig. 4.6. Relationship between biomass dose and SDMM for soils A and B.	46
Fig. 5.1. Fronteiras do sistema de ACV (a) para SC1 e SC2 e (b) para SC3 e SC4.	65
Fig. 5.2. Balanço de massa de carbono.	70
Fig. 5.3. Pegada de carbono (total e por fator de impacto) nos 4 cenários avaliados.	70
Fig. 5.4. Categorias de impacto para os 4 cenários avaliados: (a) eutrofização de água doce, (b) ecotoxicidade de água doce, (c) ecotoxicidade terrestre, (d) depleção fóssil, (e) formação de material particulado e (f) acidificação terrestre.....	73
Fig. 5.5. Normalização dos impactos ambientais para os 4 cenários avaliados.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CO ₂	Dióxido de carbono.
ACV	Avaliação de ciclo de vida.
GEE	Gases de efeito estufa.
MO	Matéria orgânica.
MOS	Matéria orgânica do solo.
HRAP	High rate algal pond.
SOM	Soil organic matter.
OM	Organic Matter.
MBC	Microbial biomass carbon.
C	Carbono.
P	Fósforo.
S	Enxofre.
N	Nitrogênio.
BSR	Basal soil respiration.
TOC	Total organic carbon.
LESA	Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental.
UFV	Universidade Federal de Viçosa.
VSS	Volatile suspended solids.
N-NO ₃ ⁻	Nitrate.
N-NH ₄ ⁺	Ammoniacal nitrogen.
TKN	Total Kjeldahl nitrogen.
COD	Chemical oxygen demand.
TP	Total phosphorus.
NaOH	Hidróxido de sódio.
HCl	Ácido clorídrico.
K	Potássio.
Ca	Cálcio.
Mg	Magnésio.
Cu	Cobre
Fe	Ferro.
Zn	Zinco.
Mn	Manganês
Na	Sódio.
B	Boro.
Ni	Níquel.
Pb	Chumbo.
Cd	Cádmio.
Cr	Cromo.
H	Hidrogênio.
ADFE	Air-dried fine earth.

Al	Alumínio.
SB	Sum of bases.
t	Effective cation exchange capacity.
T	Cation exchange capacity.
V	Base saturation index.
m	Aluminium saturation index.
RP	Remnant phosphorus.
CRD	Completely randomized design.
SDMM	Shoot dry matter mass.
MUB	4-methylumbelliferone buffer.
PNG	p-nitrophenyl-β-D-glucoside.
CaCl ₂	Calcium chloride.
THAM	Tris-Hydroxymethyl-Amino-Methane buffer.
PNF	p-nitrophenyl phosphate.
PNS	p-nitrophenyl sulphate.
KCl·Ag ₂ SO ₄	Potassium chloride - silver sulphate.
MgO	Magnesium oxide.
H ₂ SO ₄	Shulphuric acid.
TC	Total carbon.
IC	Inorganic carbon.
K ₂ SO ₄	Potassium sulphate.
PVC	Polyvinyl chloride.
BaCl ₂	Barium chloride.
DAT	Days after transplanting.
ODS	Objetivos do desenvolvimento sustentável.
LAT	Lagoa de alta taxa.
mMSPA	Massa de matéria seca da parte aérea.
RoW	Rest of the word.
1,4-DB	1,4-diclorobenzeno.
NO _x	Óxido de nitrogênio.
CV	Coeficiente de variação.
PM	Particulate matter.
SO ₂	Ácido sulfúrico.
eq	Equivalente.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho é parte dos estudos realizados no Núcleo de Pesquisas Ambientais Avançadas (nPA) do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa (UFV) que englobam tratamento de efluentes e produção de biomassa algal, bem como obtenção de bioenergia e outros produtos de valor agregado derivados dessa integração. No presente estudo, ênfase foi dada em examinar a utilização da biomassa de microalgas, gerada a partir do tratamento de água residuária proveniente do setor agroindustrial, e aplicá-la no solo. Analisar o efeito dessa prática na bioestimulação do solo em termos de atividade biológica e crescimento de milho (*Zea mays* L.) comparando a aplicação em solos provenientes de diferentes horizontes e com diferentes teores de matéria orgânica. Avaliar os impactos ambientais relativos a essa aplicação por meio da avaliação de ciclo de vida.

Este documento foi organizado, além de uma introdução geral e das considerações finais, em dois capítulos, sendo um, com o objetivo de estudar a aplicação no solo de biomassa de microalgas produzida a partir do tratamento de efluente de indústria alimentícia, onde foram realizados experimentos em vasos dispostos em ambiente aberto e foram analisadas a respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana, e as enzimas β -glicosidase, arilsulfatase, fosfatase ácida e urease e crescimento de milho (*Zea Mays* L.). E o segundo tratou da avaliação de ciclo de vida do experimento realizado no primeiro capítulo. Avaliou-se a pegada de carbono, relativo às mudanças climáticas, impacto ambiental em termos de ecotoxicidade de água doce, acidificação terrestre, eutrofização de água doce, formação de material particulado, ecotoxicidade terrestre e depleção fóssil. Além disso, avaliou-se a incerteza dos impactos ambientais gerados utilizando a análise de Monte Carlo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. HIPÓTESES.....	19
3. OBJETIVO.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. CAPÍTULO I: MICROALGAE BIOMASS AS A RENEWABLE BIOSTIMULANT: FOOD INDUSTRY EFFLUENT TREATMENT, SOIL HEALTH IMPROVEMENT AND PLANT GROWTH.....	21
4.1. Introduction.....	21
4.2. Materials and methods	23
4.2.1. Microalgae biomass: Production and characterization.....	23
4.2.2. Soils: Collection, characterization, and preparation.....	26
4.2.3. Experiments	28
4.2.3.1. Experimental design.....	28
4.2.3.2. Cultivation of corn (Zea mays L.): Conducting and evaluating the culture	28
4.2.3.3. Soil Enzymatic Activity	29
4.2.3.4. TOC.....	31
4.2.3.5. MBC	31
4.2.3.6. BSR	32
4.2.4. Statistical analysis	33
4.3. Results.....	34
4.3.1. Temporal Analysis.....	34
4.3.1.1. BSR	34
4.3.1.2. MBC	35
4.3.1.3. TOC.....	35
4.3.1.4. Soil enzymatic activity	36
4.3.2. Effect of microalgae biomass for the maximum values of the analysed variables	38
4.3.2.1. BSR	38
4.3.2.2. MBC	39
4.3.2.3. Enzymatic Activity.....	40
4.3.3. Plant growth.....	43

4.4.	Discussion	47
4.5.	Conclusion	51
	References	52
5.	CAPÍTULO II: BENEFÍCIOS AMBIENTAIS DO USO DE BIOESTIMULANTE DE MICROALGAS NO CRESCIMENTO DE MILHO (<i>ZEA MAYS L.</i>)	57
5.1.	Introdução	58
5.2.	Materiais e Métodos.....	59
5.2.1.	Objetivo e unidade funcional.....	60
5.2.2.	Configuração experimental e obtenção de dados primários.....	60
5.2.2.1.	Produção de biomassa	60
5.2.2.2.	Crescimento da planta	63
5.2.2.3.	Quantificações de carbono	63
5.2.3.	Definição do escopo da ACV: Descrição dos cenários, fronteiras do Sistema e suposições consideradas.....	64
5.2.4.	Avaliação de ciclo de vida: metodologia, categorias de impacto e base de dados	66
5.2.5.	Pegada de carbono	67
5.2.6.	Análise de incerteza.....	67
5.3.	Resultados e discussão.....	67
5.3.1.	Inventário de ciclo de vida.....	67
5.3.2.	Balanco de carbono	69
5.3.3.	Pegada de carbon	70
5.3.4.	Categorias de impactos ambientais	72
5.3.4.1.	Eutrofização	74
5.3.4.2.	Ecotoxicidade.....	75
5.3.4.3.	Depleção fossil	76
5.3.4.4.	Formação de material particulado	76
5.3.4.5.	Acidificação terrestre	77
5.3.5.	Normalização.....	77
5.3.6.	Análise de Incerteza.....	78
5.4.	Conclusão.....	82
	Referências.....	83
6.	CONCLUSÃO GERAL	87
	REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso da biomassa de microalgas produzida a partir do tratamento de efluente é de interesse crescente, por contribuírem para uma forma sustentável de tratar efluente, podem gerar biocombustível, diminuindo a carga de combustíveis fósseis, ser utilizada como biofertilizante, dentre outras formas de uso (HUSSAIN et al., 2021). Diversos trabalhos demonstram as vantagens do uso dessa biomassa produzida a partir do tratamento de efluente em lagoas de alta taxa (LATs) (ASSEMANY et al., 2018; ASSIS et al., 2019a, 2019b; CASTRO et al., 2020c; COUTO et al., 2018). Dentre os usos dessa biomassa, como a aplicação dessa biomassa de microalgas no solo também tem atraído atenção (CASTRO et al., 2020c; MARKS et al., 2017).

Essa aplicação no solo pode ser avaliada da perspectiva da atuação como bioestimulante, caracterizado por restaurar a fertilidade do solo e atuar na manutenção do seu equilíbrio químico, físico e biológico (CARDOSO et al., 2013; VASCONCELOS; CHAVES, 2020; YAKHIN et al., 2017). Nesse contexto, uma diversidade de compostos orgânicos entra no solo, servindo de substrato para os macro e micronutrientes, podendo ser assimilados, liberados como produtos metabólicos ou respirados como dióxido de carbono (CO₂) (CARDOSO et al., 2013).

Essa atuação da biomassa de microalgas como bioestimulante do solo pode ser medida utilizando indicadores que indicam se a fração biológica do solo está em condições adequadas. Dentre essas análises tem-se o carbono da biomassa microbiana e a atividade enzimática (MARKS et al., 2017). O primeiro é capaz de mostrar a quantidade de microrganismos presente no meio através de quantificação de carbono proveniente da presença de organismos vivos, o segundo determina se os organismos presentes estão assimilando os nutrientes necessários para a planta e o solo. Ademais, avaliar a liberação de dióxido de carbono (CO₂) permite a determinação da atividade microbiana do solo, pois o CO₂ liberado indica a presença de carbono lábil ou prontamente metabolizável do solo (TOUHAMI et al., 2020).

Além de examinar a aplicação no solo dessa biomassa de microalgas como bioestimulante do solo em termos técnicos, é importante verificar os impactos ambientais relativos a essa aplicação. Logo, faz-se importante garantir que o uso da biomassa de microalgas cause impactos menores do que os produtos já utilizados para os respectivos fins (AMANN et al., 2018; CASTRO et al., 2020a). A avaliação do ciclo de vida (ACV) é uma forma que vem ganhando destaque para determinar os impactos ambientais de processos que envolvem

produção de biomassa de microalgas no tratamento de efluente e aplicação no solo (ARASHIRO et al., 2018; CASTRO et al., 2020a; HERRERA et al., 2021; SOUZA et al., 2019)

A ACV, ainda, permite realizar análises como a pegada de carbono. A pegada de carbono quantifica e avalia a emissão de gases de efeito estufa representando os principais gases pelo CO₂. Por meio desse estudo, é possível determinar os principais processos do ciclo de vida que mais contribuem para a emissão de gases de efeito estufa (GEE) e, a partir disso, determinar formas de mitigação afim de tornar os processos mais ambientalmente sustentáveis (DELRE; TEN HOEVE; SCHEUTZ, 2019). Nesse contexto, a pegada de carbono é uma ferramenta capaz de auxiliar na definição dos processos da aplicação de biomassa de microalgas que contribuem para a emissão de gases de efeito estufa e, conseqüentemente, estudar propostas para mitigar essa emissão (CLABEAUX et al., 2020).

Embora haja relatos de que a biomassa de microalgas é um bom bioestimulante de solos, não se tem informações dessas análises sendo realizadas em solos com diferentes teores de matéria orgânica e em concomitância com o crescimento de plantas, além de avaliar os impactos ambientais associados a essa aplicação. Logo, sobre o que já foi realizado com a biomassa de microalgas produzidas a partir de efluentes, sobre o que é viável com base em diversos estudos e as potencialidades que ainda precisam ser estudadas, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da aplicação da biomassa de microalgas no solo como forma de mistura em termos de atividade biológica do solo e crescimento de cultura, comparando a aplicação em solos com diferentes teores de matéria orgânica (MO) e avaliar os impactos ambientais dessa aplicação utilizando ACV.

A pesquisa está estruturada em 2 capítulos, sendo que, um trata do experimento em casa de vegetação e outro da avaliação do seu ciclo de vida.

Capítulo I: Microalgae biomass as a renewable biostimulant: Food industry effluent treatment, soil health improvement and plant growth.

Capítulo II: Benefícios ambientais do uso de bioestimulante de microalgas no crescimento de milho (*Zea Mays* L.).

2. HIPÓTESES

- A aplicação da biomassa de microalgas atua como bioestimulante, culminando em um solo biologicamente mais ativo e, conseqüentemente, mais produtivo;
- A biomassa de microalgas atua de forma diferente em solo rico em matéria orgânica (Horizonte A) quando comparado a solo com menor teor de matéria orgânica (Horizonte B).
- A aplicação no solo da biomassa algal rica em nutrientes poderá contribuir para o crescimento de milho (*Zea mays* L.), promovendo melhoria nas propriedades da cultura;
- Os impactos ambientais são menores quando se aplica biomassa de microalgas em solo rico em matéria orgânica (Horizonte A) quando comparado a solo com menor teor de matéria orgânica (Horizonte B).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Utilizar biomassa de microalgas, gerada a partir do tratamento de água residuária proveniente do setor agroindustrial, e aplicá-la no solo como bioestimulante.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a dose de biomassa algal para aplicação no solo que proporciona a melhor resposta de atividade biológica do solo;
- Analisar a atividade biológica do solo por meio da respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana e atividade das enzimas β -glicosidase, arilsulfatase, fosfatase ácida e urease comparando horizontes (A, B) com diferentes teores de MO;
- Verificar o efeito da aplicação do material orgânico na elevação dos teores de MOS a curto prazo;
- Avaliar o crescimento de milho (*Zea mays* L.) mediante a aplicação de diferentes doses de biomassa algal no solo, comparando-o com o crescimento sem o uso de bioestimulante;
- Avaliar o ciclo de vida e pegada de carbono de bioestimulante do solo produzido com biomassa de microalgas.

4. CAPÍTULO I: MICROALGAE BIOMASS AS A RENEWABLE BIOSTIMULANT: FOOD INDUSTRY EFFLUENT TREATMENT, SOIL HEALTH IMPROVEMENT AND PLANT GROWTH

Abstract: Microalgae biomass contributes effluent bioremediation and it is a concentrated source of nutrients and organic matter, making it a potential alternative to be applied to the soil as a biostimulant. In this context, this study aimed to apply microalgae biomass produced from the food industry effluent treatment to the soil. This biomass was applied dry and in the form of a mixture to demonstrate its potential in increasing plant production and soil metabolic functions, analysed in short term. Biomass was applied in soils from: (i) Horizon A: taken at a depth of 0 to 10 cm and; (ii) Horizon B: taken at a depth between 20 and 40 cm. Doses of 0.25%, 0.5%, 1%, and 2% of biomass were applied to each soil type. Basal soil respiration, microbial biomass carbon, total organic carbon, and enzymatic activity of β -glucosidase, acid phosphatase, arylsulfatase, and urease were evaluated for each dose applied to each soil type. Besides, the growth of corn (*Zea Mays* L.) was evaluated for those applications. It is concluded that a greater presence of this biostimulant led to greater soil microbiota activity. Beyond that, applying 2% of biomass led to greater basal soil respiration, microbial biomass carbon and enzymatic activity of β -glucosidase, acid phosphatase, arylsulfatase in both soils, when compared to the application of other doses. Copper and Boron are urease inhibitors and may have contributed to reduction of the activity of this enzyme in soil of Horizon A. Considering that plant growth must be in line with changes in soil characteristics, the result that provided the largest plant shoot dry matter mass was by applying 0.55% of the biomass in both soils. Therefore, the application of microalgae biomass produced from food industry effluent treatment proved to promote a biologically active soil and, consequently, more productive and resilient.

Keywords: Organic Fertilization; Bioproducts; Soil Respiration; Soil Carbon Storage; Enzymatic Activity; Effluent Treatment.

4.1. Introduction

The use of microalgae biomass produced from effluents treatment is of increasing interest, since microalgae contribute to effluents polishing while assimilating nutrients such as

nitrogen and phosphorus during their growth (KONG et al., 2021). In this context, the recovery of this biomass has characteristics that allow the obtaining of by-products with potential for application in several areas, such as agriculture, bioenergy, animal supplementation, among others (COÊLHO et al., 2019). The recovery of microalgae biomass for subsequent use in agriculture is strategic in terms of circular economy, as there is the effluent treatment concomitant with the production of biomass that, in agricultural use, enhances the growth of culture used for purposes such as food (LORENTZ et al., 2020).

Regarding the application of microalgae biomass in the soil, studies show the potential effects on plant growth through the increase and modification of the soil microbial community and effects on nutrient mineralization. These actions define a biostimulant, this being one of the main modes of action of biofertilizers based on microalgae (CHIAIESE et al., 2018; JARDIN, 2015).

Many studies have sought to evaluate the biomass of microalgae produced from the effluent treatment applied to the soil (CASTRO et al., 2017, 2020a; MARKS et al., 2017; MARKS; MONTERO; RAD, 2019; PEREIRA et al., 2021; SULEIMAN et al., 2020). Regarding the biomass produced in domestic effluent treatment, studies show that when applied to the soil, the biomass provides nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K), as well as other macro and micronutrients for the plant (MARKS et al., 2017). Beyond that, biomass helps to increase soil organic matter, structure, microbial growth stimulation and enzymatic activities (SARMA et al., 2017), even in short term (SULEIMAN et al., 2020). However, there are gaps in relation to the effect of a biomass produced from the treatment of other types of effluent, such as that of the food industry. Thus, it is necessary to evaluate, in addition to the effect on crop productivity, the type and amount of biomass as a biostimulant, in order to determine how they influence the biochemical properties of the soil.

It is noteworthy that, in addition to functions that increase crop production and improve the health of plants and soil, the application of microalgae can also serve to mitigate or sequester atmospheric carbon dioxide. Marks et al. (2017) points out that, although soil microorganisms are not generally considered to have a fundamental role in fixing and sequestering CO₂, they absorb about 4 Pg year⁻¹ of carbon from the atmosphere, which is on a similar scale to the global annual carbon release due to fossil fuel burning and combustion. Therefore, the application of biomass in the soil has the function of potentiating the sequestration of C, together with other microorganisms present in the environment.

Currently, there is little information on how the biological fraction of the soil will respond to the application of microalgae biomass produced from the food industry effluent treatment as a biostimulant. Previous work investigated the response to this application, however with biomass produced in synthetic medium or from the treatment of other types of effluents (MARKS et al., 2017; MARKS; MONTERO; RAD, 2019; SULEIMAN et al., 2020). Suleiman et al. (2020) investigated the effects of the application of microalgae biomass, produced from domestic effluent treatment, in the soil in relation to GHG emissions, plant productivity, grain quality and influence on the soil microbiota. The authors concluded that there is a higher GHG emission when using microalgae biomass compared to chemical fertilizer due to the chemical reactions of soil microorganisms. In addition, the bacterial community showed a tendency of resilience from the beginning of the experiment until the harvest. Plant productivity was similar between treatments using microalgae biomass and chemical fertilizer.

In this context, it is hypothesized that the application of microalgae biomass in the soil as a biostimulant, produced from food industry effluent treatment, contributes to greater microbiota activity and increases plant productivity through soil-plant interaction, even in soils poorer in organic matter. Therefore, this application can effectively increase the organic matter and nutrients in the soil.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the performance, as a biostimulant, of microalgae biomass produced from food industry effluent treatment, when applied to soils with different levels of organic matter. The main innovations of this study are (i) analysis of the biochemical aspects of the soil when applying a biomass produced from food industry effluent treatment, (ii) comparing the performance of different doses of biomass when applied to soils with different contents of organic matter, and (iii) evaluation of the influence of this type of biomass for crop growth (*Zea Mays* L.).

4.2. Materials and methods

4.2.1. Microalgae biomass: Production and characterization

The experiments were carried out at the experimental unit at the Laboratory of Sanitary and Environmental Engineering at the Federal University of Viçosa (LESA-UFV), Minas Gerais, Brazil (coordinates 20°46'09" S, 42°51'29.7" W). It was executed in the winter period, with an average temperature of 17° C according to data collected at the weather station.

Microalgae biomass was cultivated during meat processing industry effluent treatment. The main activities of the industry are the production of sausages and cod. The industrial effluent is generated in several stages of the production process, namely in the disposal of sausage cooking and cooling tanks and cod desiccation tanks, and washing floors and equipment during the production process. As an initial assessment, the characterization of the effluent must be conducted to obtain the appropriate biomass for the desired use. Therefore, in this study, effluent from a primary carbon-rich float was selected, as described by Castro et al. (2017) and Souza et al. (2019).

Each pilot scale HRAPs used for the production of microalgae biomass have the following characteristics: width = 1.28 m, length = 2.86 m, total depth = 0.50 m, useful depth = 0.30 m, surface area = 3.30 m² and useful volume = 1.00 m³. HRAPs are made of fiberglass and stainless steel blades, with six blades. During operation, a 0.5 HP electronic engine operates the blades. The speed is reduced by a reducer coupled to the motor and controlled by a frequency inverter (WEG CFW-08 series), which guarantees a speed between 0.10 m s⁻¹ and 0.15 m s⁻¹. Similar values in different HRAPs surveys ensured the necessary mix (ASSIS et al., 2019; CASTRO et al., 2020b; COSTA et al., 2017; PARK; CRAGGS; SHILTON, 2011; PICOT et al., 1991).

The biomass was produced in batches for 25 days, in 4 HRAPs, between October 18, 2019 and November 12, 2019. In the operation, 10% inoculum was used in relation to the total volume of HRAP, which consists of the biomass previously adapted to effluent conditions.

At the end of operation, analyses of volatile suspended solids (VSS), nitrate (N-NO₃⁻), ammoniacal nitrogen (N-NH₄⁺), total Kjeldahl nitrogen (TKN), chemical oxygen demand (COD), total phosphorus (TP) according to Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Total organic carbon (TOC) determination was carried out on a TOC 5000A carbon analyser - Shimadzu with a normal sensitivity catalyst. The results were VSS = 466.88 mg L⁻¹, NO₃⁻ = 6.18 mg L⁻¹, NH₄⁺ = 11.49 mg L⁻¹, TKN = 68.14 mg L⁻¹, COD = 359.58 mg L⁻¹, TP = 6.61 mg L⁻¹ and TOC = 41.90 mg L⁻¹.

The phytoplankton community was analysed at the end of the operation, in which the main species within each genus were identified based on Parra et al. (1983) and Komarek and Fott (1983), according to Utermöhl (1958); Wetzel and Likens (1991) and APHA (2012). The results are described in Table 4.1.

Table 4.1. Phytoplankton community present in the biomass produced from effluent treatment.

Organisms	Density (org mL⁻¹)	Relative Abundance (%)
Cyanobacteria		
<i>Aphanocapsa sp.</i>	17.735	4%
Chlorophyceae		
<i>Chlorella vulgaris</i>	456.757	96%
<i>Monoraphidium tortile</i>	-	0%
<i>Scenedesmus sp.</i>	-	0%
Criptophyta		
<i>Rhodomonas sp.</i>	3.006	0%
Total	475.243	100%

Chlorophyll-*a* analyses were performed every 3 days during HRAPs operation, according to the Dutch standard (NEDERLANDS NORM, 1982) based on Nush (1981), in order to determine the peak of biomass production, characterizing the moment to stop the operation and collect the biomass. The peak occurred on the 23rd day of operation, with chlorophyll-*a* equal to 4.81 mg L⁻¹.

Then, the biomass was concentrated by chemical flocculation, with the addition of sodium hydroxide solution (NaOH) 50% (m/v) to raise the pH to 12. Then, the effluent in HRAP was manually stirred for 3 minutes to then sedimentation occurs in the HRAP within 24 hours. The biomass concentrated at the bottom of the HRAP was collected. After collection, the pH of the concentrated biomass was neutralized with the addition of a 1:1 (v/v) hydrochloric acid (HCl) solution. Then, the biomass was dried by the lyophilisation process.

Dry biomass was characterized concerning the essential elements for plant growth and development: P, potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), sulphur (S), copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn), manganese (Mn), sodium (Na), boron (B), nickel (Ni), lead (Pb), cadmium (Cd) and chromium (Cr) according to EMBRAPA (2009). The TOC determination was carried out on a TOC 5000A carbon analyser - Shimadzu with a normal sensitivity catalyst. In addition, the carbon, hydrogen, and nitrogen (C, H, and N) contents of the biomass were determined using the elemental analyser Perkin Elmer Series II 2400. The results are described in Table 4.2.

Table 4.2. Chemical characteristics of microalgae biomass.

Nutrient	Unity	Result
P	dag / kg	1.755
K	dag / kg	0.316
Ca	dag / kg	2.746
Mg	dag / kg	1.230
S	dag / kg	0.477
Na	dag / kg	13.983
Cu	mg / kg	11.030
Fe	mg / kg	3,671.965
Zn	mg / kg	517.240
Mn	mg / kg	66.560
B	mg / kg	4.100
Ni	mg / kg	4.000
Pb	mg / kg	0.000
Cd	mg / kg	0.000
Cr	mg / kg	14.960
TOC	mg / kg	262.43
C	%	26.42
H	%	4.94
N	%	3.42

4.2.2. Soils: Collection, characterization, and preparation

Surface (0 - 10 cm) and subsurface (20 - 40 cm) samples of a Red-Yellow Latosol, collected in the region of Viçosa - MG, were used to set up the experiments. The samples were selected in order to evaluate the effect of biomass in soils with different levels of organic matter. The surface sample is described as Soil A, and the subsurface sample is described as Soil B. The material collected was air-dried, broken up, and passed through a 2.0 mm sieve to obtain air-dried fine earth (ADFE) and analyses for the determination of the physical and chemical characteristics of the soil were carried out as Teixeira et al. (2017) and Almeida et al. (2012). The characteristics of each soil are shown in Table 4.3.

Table 4.3. Chemical and physical characteristics of the soils used in the experiment.

Parameter	Unity	Solo A	Solo B
pH (in water)	-	4.82	4.52
P	mg / dm ³	5.00	0.60
K	mg / dm ³	30.00	11.00
Ca	cmol _c / dm ³	0.82	0.12
Mg	cmol _c / dm ³	0.16	0.03
Al	cmol _c / dm ³	1.17	1.07
H + Al	cmol _c / dm ³	10.30	7.70
SB	cmol _c / dm ³	1.06	0.18
t	cmol _c / dm ³	2.23	1.25
T	cmol _c / dm ³	11.36	7.88
V	%	9.30	2.30
M	%	52.50	85.60
OM	dag / kg	5.79	3.29
RP	mg / L	14.10	6.40
S	mg / dm ³	9.50	0.00
B	mg / dm ³	0.56	0.37
Cu	mg / dm ³	0.56	0.40
Mn	mg / dm ³	4.20	2.00
Fe	mg / dm ³	101.70	99.30
Zn	mg / dm ³	4.63	0.37
TOC	g / kg	28.03	16.26
Coarse sand	kg / kg	0.19	0.14
Thin sand	kg / kg	0.10	0.094
Silt	kg / kg	0.057	0.072
Clay	kg / kg	0.65	0.69
Textural classification		Very clayey	Very clayey

Al = Aluminium, SB = Sum of bases, t = Effective cation exchange capacity, T = Cation exchange capacity pH 7, V = Base saturation index, m = Aluminium saturation index, RP = Remnant phosphorus.

Soil samples (2 dm³) were placed in plastic bags for liming, using the Al neutralization method and raising the Ca + Mg levels (ALVAREZ V; RIBEIRO, 1999). Then, the soil

moisture was adjusted to 80% of the field capacity. After 21 days of incubation, the soil was air dried, broken up, and passed through a 2 mm sieve.

4.2.3. *Experiments*

4.2.3.1. *Experimental design*

The experiment carried out to evaluate the influence of microalgae biomass grown in industrial effluent as a soil biostimulant. Corn cultivation, enzymatic activity and TOC was carried in the same pot. MBC analysis were analysed in a different pot, because soil quantity taken from this pot could damage roots if it was conducted in the first pot. BSR analysis was performed in another pot, as it must be kept closed. The pot can only be opened for sample collection for analysis. They were all conducted at the same time. The treatments followed a factorial scheme (4 x 2) + 1 in which the factors under study were: four doses of microalgae biomass (0.25, 0.50, 1 and 2%); soils from two different horizons (A, B), plus a control without application of microalgae biomass. The defined doses are in line with previous studies that showed better soil biochemical characteristics when compared to soils with lower concentrations of OM (NASCENTE; LI; CRUSCIOL, 2015; TAVARES FILHO; BARBOSA; RIBON, 2010; TORRES et al., 2019).

The experiment was arranged in a completely randomized design (CRD), with four replications. The experiment was carried out in a greenhouse in the same region where the production of microalgae biomass occurred, whose climatic conditions were set out in topic 2.1.

4.2.3.2. *Cultivation of corn (Zea mays L.): Conducting and evaluating the culture*

For corn cultivation, pots with a capacity of 2 dm³ were prepared. Six corn seeds (Biomatrix BM709 PR02) were sown at a depth of 2 cm. After 7 days, thinning was carried out, leaving only 3 plants per pot. A multi-nutrient solution was added at 0, 13, and 26 days after sowing according to Novais et al. (1991). Pots' irrigation was performed daily according to the need, keeping the humidity constant for all pots at 80% of the field capacity. The control of weeds, pests, and diseases was carried out when necessary.

At the end of the experiment (40 days), the plants were sectioned about 0.5 cm from the ground, which were packed separately in paper bags and taken to the forced air circulation oven at a temperature of 65 °C, to determine the shoot dry matter mass (SDMM) production. Then, the samples were milled and digested to obtain the levels and macronutrients (P, K, Ca, and Mg) according to Silva et al. (1999). The N content was determined according to Tedesco et al. (1995).

4.2.3.3. *Soil Enzymatic Activity*

Soil enzymatic activity was evaluated at 0, 7, 21, and 36 days. Methodologies proposed by Dick et al. (1996) for β -glucosidase, acid phosphatase, and arylsulfatase enzymes were used. However, an adaptation proposed by Verchot and Borelli (2005), who did not use toluene to inhibit microbial activity in the analysis process, considering that, in that work, no consistent differences were identified between samples in which the microbial inhibitor was used and those in which there was no addition of it. To determine the urease activity, a methodology described by Tedesco et al. (1995) was considered.

The substrate used for the determination of β -glucosidase activity is p -nitrophenyl- β -D-glucoside (PNG 0.05 mol L⁻¹). For each sample, 1 g of soil was used, placed in a 50 ml conical flask, with 4 ml of 4-methylumbelliferone buffer (MUB) pH 6.0 and 1 ml of PNG solution, incubating at 37° C. After 1 hour, in order to avoid the dispersion of clays and to interrupt the activity of the enzyme, 1 ml of calcium chloride (CaCl₂) 0.5 mol L⁻¹ and, 4 ml of the Tris-Hydroxymethyl-Amino-Methane buffer (THAM) 0.1 mol L⁻¹ (pH 12) was added. Then the soil suspension was filtered on a quantitative filter paper with a porosity of 8 μ m. The blank test was produced following the previous steps with a duplicate, but with the addition of the PNG solution after incubation. The reading was done on a spectrophotometer at 410 nm and the p -nitrophenol content was determined through a calibration curve obtained with 0, 10, 20, 30, 40, and 50 μ g p -nitrophenol standards. This curve was obtained by pipetting 1.0 mL of the standard nitrophenol solution in 100 mL of water. Then, 0, 1, 2, 3, 4, and 5 mL aliquots were pipetted and adjusted to 5.0 mL. 1.0 mL of 0.5 mol L⁻¹ CaCl₂ and 4.0 mL of 0.1 mol L⁻¹ THAM buffer pH 12 were then added. Finally, filtration was performed on quantitative filter paper with a porosity of 8 μ m. The activity of this enzyme is expressed in μ g of p -nitrophenol produced per hour per gram of soil (μ g p -nitrophenol h⁻¹ g⁻¹ soil).

For acid phosphatase activity, the substrate for determining the activity of this enzyme is ρ -nitrophenyl phosphate (PNF 0.05 mol L^{-1}). 1.0 g of soil was weighed in a 50 ml conical flask and 4 ml of MUB pH 6.5 and 1 ml of the PNF solution were added and then incubated for 1 hour at 37°C . After this period, identical to the analysis of the enzyme β -glucosidase. The activity of this enzyme is expressed in the same unit as β -glucosidase.

For arylsulfatase activity, the substrate for determining the activity of this enzyme is ρ -nitrophenyl sulphate (PNS 0.05 mol L^{-1}). For each sample, 1.0 g of soil was used, placed in a 50 ml conical flask, 4 ml of acetate buffer, 1 ml of PNS solution, incubating for 1 hour at 37°C . After this period, identical to the analysis of the β -glucosidase enzyme. The activity of this enzyme is expressed in the same unit as β -glucosidase.

Urea 0.2 mol L^{-1} was used as a substrate for the analysis of urease activity. For this analysis, 5.0 g of soil were placed in a centrifuge tube (50 ml), with 9 ml of THAM buffer being added and then 1 ml of 0.2 mol L^{-1} urea solution. The samples were incubated at 37°C for two hours. After this period, 35 ml of potassium chloride - silver sulphate solution ($\text{KCl}\cdot\text{Ag}_2\text{SO}_4$) were added at 4°C . Then, the volume was adjusted to 50 ml, with the addition of the same solution. It was waited 30 minutes for decanting and then a 20 ml aliquot of the suspension was transferred to a 100 ml distillation flask, along with 0.2 g of calcined magnesium oxide (MgO). A 50 mL conical flask containing 5.0 mL of boric acid indicator was placed in the distiller condenser. The distillation was terminated after collecting about 35 to 40 ml of distillate. Titration was performed with standardized sulphuric acid (H_2SO_4) with a molarity of about $0.0025 \text{ mol L}^{-1}$. The same procedure was adopted to obtain three blank tests, using 20 mL of the $\text{KCl}\cdot\text{Ag}_2\text{SO}_4$ solution.

The NH_4^+ concentration was obtained from Equation 4.1:

$$\text{NH}_4^+ (\text{mg kg}^{-1}) = \frac{(\text{H}^+_s - \text{H}^+_b) \times 70 \times 2.5}{5} \quad \text{Equation 4.1}$$

On what:

H^+_s = Amount of acid used in the titration of the sample and the blank (mL);

H^+_b = Amount of acid used in the titration of the blank (mL);

70 = $\mu\text{g N mol H}_2\text{SO}_4^{-1}$;

2.5 = $\text{mol H}_2\text{SO}_4 \text{ mL}^{-1}$;

5 = g of soil per sample.

4.2.3.4. TOC

The TOC determination was carried out on a TOC 5000A carbon analyser - Shimadzu with a normal sensitivity catalyst. This equipment measures the amount of total carbon (TC) and inorganic carbon (IC) in the sample. TC minus IC gives TOC. For the determination of TC, the injected sample is carried to a combustion tube at 900°C containing platinum supported on alumina and undergoes catalytic oxidation to CO₂. For the determination of IC, the injected sample reacts with 25% phosphoric acid, and all inorganic carbon is converted to CO₂. The CO₂ produced, both in catalytic oxidation and from inorganic carbon, is quantified by absorption in the non-dispersive infrared.

4.2.3.5. MBC

For this parameter, each soil sample was kept in a ring made of polyvinyl chloride (PVC) pipe and expanded polystyrene base with 300 g of soil with a predetermined amount of biomass. For the MBC determination, the fumigation-extraction method described by Vance et al. (1987). The analyses were performed at 5, 10, 20, 30, and 40 days after the experiment was set up. 20 g of sample was collected in each analysis. Immediately after weighing the soil sample, 1 ml of ethanol-free chloroform was added to all flasks for fumigation. The bottles were then closed and stored in an oven at 27° C for 24 hours. The next day, the lids of the flasks were removed in an exhaust hood, allowing all the chloroform present to evaporate until complete elimination. The extraction takes place in the fumigated samples, after a fumigation time of 24 hours, followed by the elimination of chloroform residues, and in the non-fumigated ones, carried out immediately after weighing. For this, 50 mL of 0.5 mol L⁻¹ potassium sulphate solution (K₂SO₄) was added, stirred for 30 minutes in an orbital shaker at 220 RPM, waiting for decanting for 30 minutes and transferring the supernatant for a quantitative paper filter with a porosity of 28 µm coupled to a funnel and 50 mL tube, avoiding resuspension and recovery of decanted material. At the end of the filtration, the extract of each sub-sample (fumigated or non-fumigated) was obtained, which was used to quantify the microbial carbon. 8 ml of the filtered extract was transferred to a 250 ml conical flask. 2 ml of 0.066 mol L⁻¹ potassium dichromate solution, 10 ml of sulphuric acid PA, and 5 ml of orthophosphoric acid PA were added in chronological order. After cooling, 70 ml of deionized water was added, expected to cool again, then approximately 4 drops of diphenylamine were added and titrated under

magnetic stirring with a 0.033 mol L⁻¹ solution of ferrous ammonium sulphate. At the end of the titration, the colour of the solution was purple to green.

The determination of carbon in fumigated and non-fumigated soil extracts is done by Equation 4.2:

$$C \text{ (mg C kg}^{-1} \text{ soil)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 0.003 \cdot V_1 \cdot 10^6}{P_s \cdot V_2} \quad \text{Equation 4.2}$$

On what:

V_b (mL) = volume of ferrous ammonia sulphate spent in the titration of the control solution (white);

V_a (mL) = volume of ammoniacal ferrous sulphate spent on sample titration;

M (mol L⁻¹) = molarity of ferrous ammonium sulphate;

V₁ = volume of the extractor (K₂SO₄) used;

V₂ = pipet rate of the extract for titration;

0.003 = milliequivalent of carbon;

P_s (g) = mass of dry soil.

MBC is given by Equation 4.3:

$$\text{MBC (mg microbial C kg}^{-1} \text{ soil)} = \frac{FC}{k_c} \quad \text{Equation 4.3}$$

On what:

FC = Flow obtained from the difference between the amount of C (mg kg⁻¹), in Equation 2, recovered in the fumigated sample extract and that recovered in the non-fumigated sample and k_c is a correction factor = 0.33.

4.2.3.6. BSR

BSR was determined using the methodology described by Jenkinson and Powlson (1976). The analyses were performed every three days. Each soil sample was kept in a ring made of polyvinyl chloride (PVC) pipe and expanded polystyrene base with 300 g of soil with a predetermined amount of biomass. Starting from previously weighed soil samples, 10 mL of 1 mol L⁻¹ NaOH was required for each sample, which was placed inside the PVC ring containing the soil sample. Then, the ring containing the soil sample and the NaOH flask was closed so

that there was no entry of CO₂ from the outside air or leakage of the internally produced CO₂. Rings were kept with only the NaOH flask, which served as a control solution (white). After carrying out all the preparation for the incubation of the samples, the time and date when the incubation started was recorded, so that the BSR could be calculated using these data. After the incubation process, the flask containing NaOH was removed from the PVC ring, the time and date of when the incubation was completed. 2 mL of 10% (w/v) barium chloride (BaCl₂) was added for complete CO₂ precipitation. 2 drops of 1% phenolphthalein (w/v) were added and then titrated under magnetic stirring with 0.5 mol L⁻¹ hydrochloric acid solution. At the end of the titration, the colour of the solution was pink to colourless.

BSR was obtained from Equation 4.4:

$$\text{BSR (mg de C - CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ soil} \cdot \text{hour}^{-1}) = \frac{(\text{Vb-Va}) \cdot \text{M} \cdot 6 \cdot 1000}{\frac{\text{Ps}}{\text{T}}} \quad \text{Equation 4.4}$$

On what:

Vb (mL) = volume of hydrochloric acid spent on the titration of the control solution (white);

Va (mL) = volume spent on sample titration;

M (mol L⁻¹) = molarity of HCl;

Ps (g) = dry soil mass;

T (h) = sample incubation time.

4.2.4. Statistical analysis

The experiment followed a completely randomized design (CRD). The values of BSR, MBC, β-glucosidase, arylsulfatase, acid phosphatase, and urease were adjusted to the equation 4.5 (ANDRADE; MENDONÇA; RIBEIRO, 2013; CASTRO et al., 2017; RIBEIRO et al., 2016) using Curve Expert 1.4 (HYAMS, 1997):

$$Y = \frac{a}{1 + e^{-(b+cx)}} \quad \text{Equation 4.5}$$

On what:

a = coefficient represents the maximum value of the variable, in statistical terms. -b/c = represents the half-life of the response variable (t_{1/2}).

4.3. Results

4.3.1. Temporal Analysis

Temporal analysis considers the results of the variables BSR, MBC, TOC and activity of the enzymes β -glucosidase, acid phosphatase, arylsulfatase, and urease over the 40-day experimental period.

4.3.1.1. BSR

The BSR curve (Fig. 4.1) showed a pattern of a cumulative evolution of CO₂, in which there is rapid growth and, subsequently, a deceleration in the CO₂ emission rate. The total cumulative amounts of CO₂ were, on average, 14% higher in soil A than in soil B for a same treatment. Soil A has, on average, 43% more organic matter than soil B. The presence of a higher content of organic matter in the first one may have influenced the occurrence of higher BSR results. For the different treatments, at the beginning of the experiment, the BSR values were close, in both soils. Over time, the differences related to the amount of CO₂ emitted between treatments became more evident in both soils. A 78% higher BSR was observed in the treatment with 2% biomass when compared to the treatment without biomass for Soil A. For Soil B this difference was 84%.

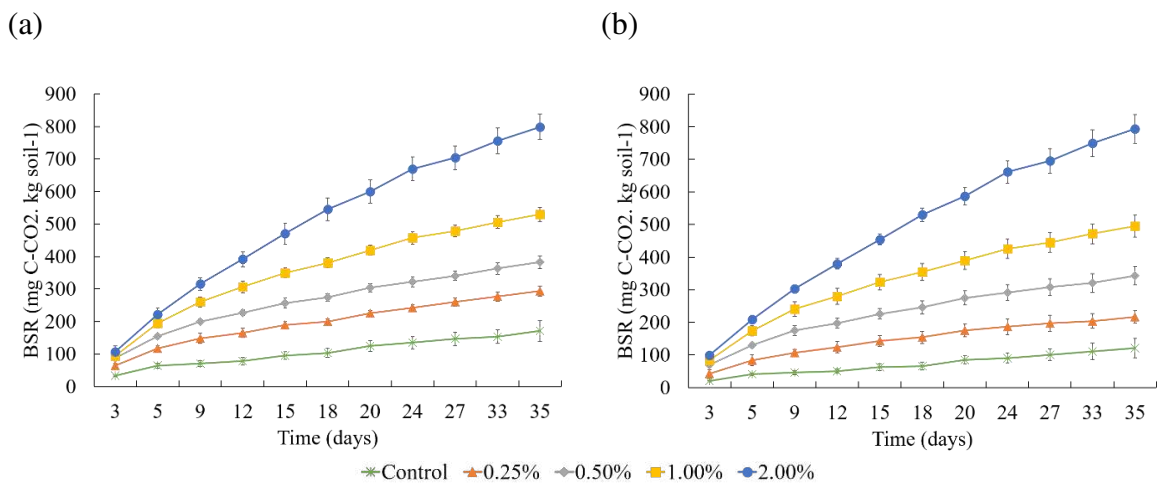


Fig. 4.1. BSR in different types of soil, for the different treatments applied over time. (a) Soil A and (b) Soil B.

4.3.1.2. MBC

Through Fig. 4.2, it is possible to observe that over the study period, MBC increased in all treatments for both soils. The treatment with 2% of biomass applied in soil A showed 41% more MBC at the end of the treatment when compared to the beginning. In addition, this was the treatment with higher MBC values compared to other treatments. When comparing the treatment without biomass, the treatment with the highest dose showed MBC, on average, 50% higher at the end of the experimental period.

Regarding soil B, there was an increase in MBC over time for all treatments in which the treatment with the highest biomass dose, as well as soil A, presented the highest values when compared to the other treatments. In this treatment, MBC was, on average, 54% higher at the end of treatment when compared to the beginning. Thus, although soil A has more MBC when compared to soil B, the increase in this parameter for treatment with 2% biomass over the experimental period was more expressive in soil B, demonstrating the capacity of biomass to assist in increasing the living fraction of the soil.

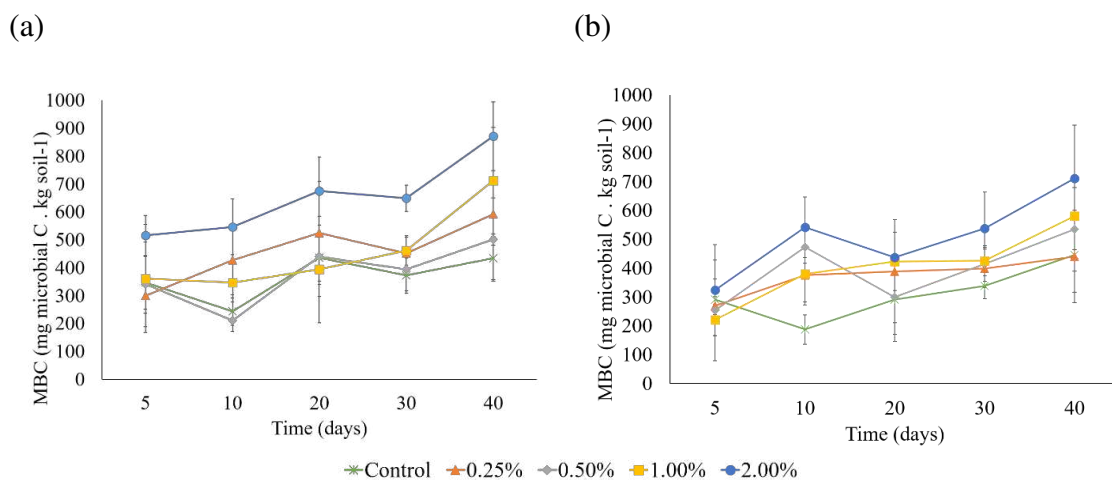


Fig. 4.2. MBC in different types of soil, for the different treatments applied over time. (a) Soil A and (b) Soil B.

4.3.1.3. TOC

The results obtained for the TOC variable in the soil showed a downward trend over time in all treatments (Fig. 4.3). The initial value of each treatment considers the amount of initial TOC of the soil plus the TOC related to the addition of microalgae biomass.

Soil A showed, on average, TOC values 42% higher when compared to soil B. On transplanting date, the control, without biomass treatment, had TOC equal to 28 mg C kg soil⁻¹ and 16 mg C kg soil⁻¹, for soils A and B, respectively. At the end of the experiment (40 DAT), the control for soil A showed 24 mg C kg soil⁻¹, soil B presented 14 mg C kg soil⁻¹. Evidencing TOC consumption throughout the experiment.

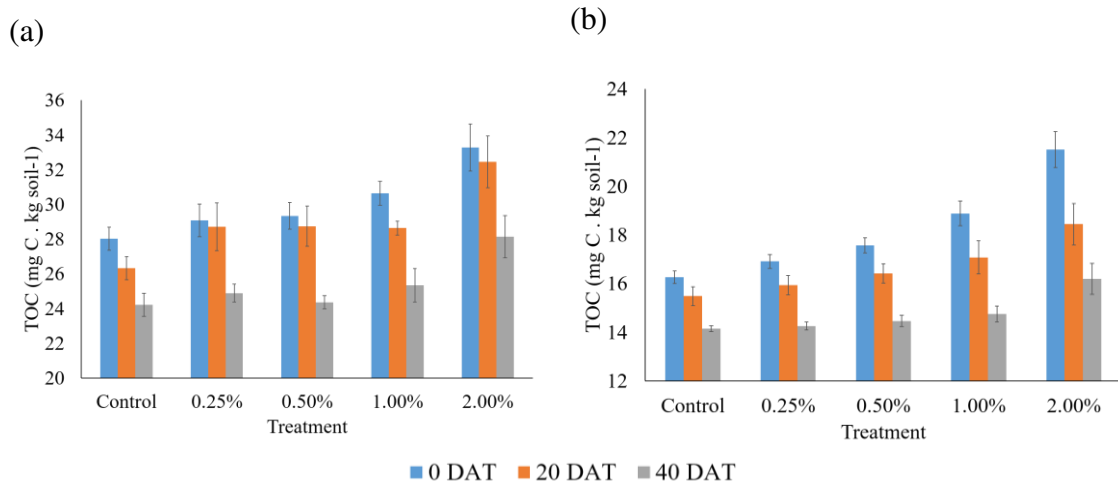


Fig. 4.3. TOC concentration for the different treatments and different types of soil analysed 0 DAT, 20 DAT, and 40 DAT. (a) Soil A (b) Soil B.

At the beginning of the treatment, the TOC values were equal to 32 mg C kg soil⁻¹ and 21 mg C kg soil⁻¹ for the treatment with 2% biomass, for soils A and B, respectively. At the end of the experiment (40 DAT), the TOC results were equal to 28 mg C kg soil⁻¹ and 16 mg C kg soil⁻¹, for this same treatment in soils A and B, respectively. Therefore, although there was an increase in TOC with the increase in biomass, consumption of this form of carbon was observed over time.

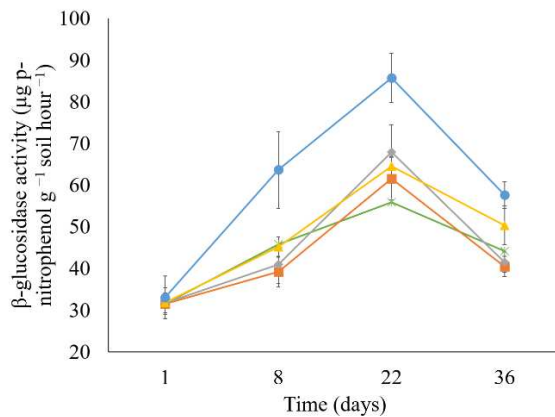
4.3.1.4. Soil enzymatic activity

Throughout the experimental period, the activity of β -glucosidase, acid phosphatase and arylsulfatase enzymes increased with peak activity around the 22nd day, with the exception of acid phosphatase activity in soil B, which peak was closer to the 8th day of the trial period (Fig. 4.4). Analysing the activity of this enzyme at the peak moment, we have that for β -glucosidase, the activity of this enzyme was 35% higher in the treatment with a higher dose of biomass when compared to the treatment without biomass for soil A. For soil B this difference

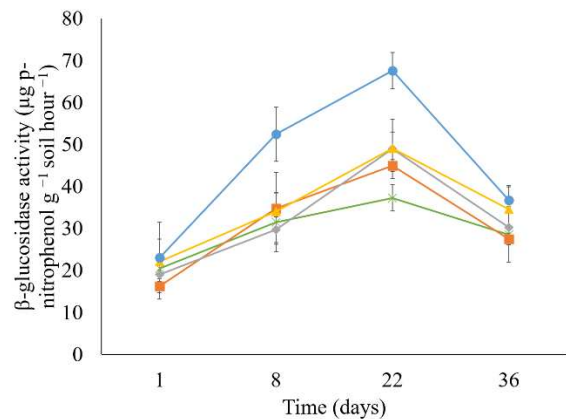
was 45% when comparing treatments with 2% biomass and without biomass. Regarding arylsulfatase, this proportion was 26% for soil A and 22% for soil B. For acid phosphatase, this difference was 30% for soil A and 58% for soil B. In addition, for the same treatment, the activity of these enzymes was higher in soil A.

Regarding urease, there was a tendency for the activity of this enzyme to decrease in all treatments in soil A and an increase trend in all treatments in soil B. Considering all treatments, in soil A, at the end of treatment a urease activity was, on average, 14% less than at the beginning of treatment. For the same treatment in soil B, the activity of this enzyme was 35% at the end of the treatment when compared to the beginning. It can be seen in Fig. 4g and 4h that for urease there was no clear distinction of the treatment that showed the best response for both types of soil.

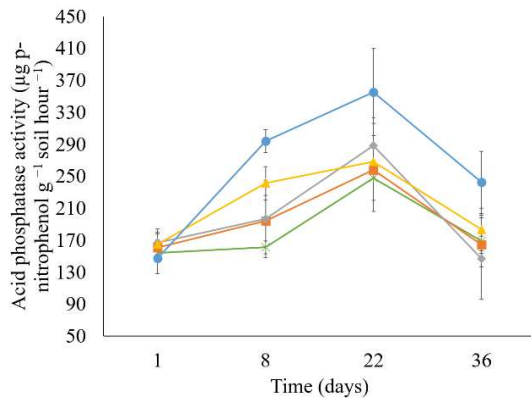
a)



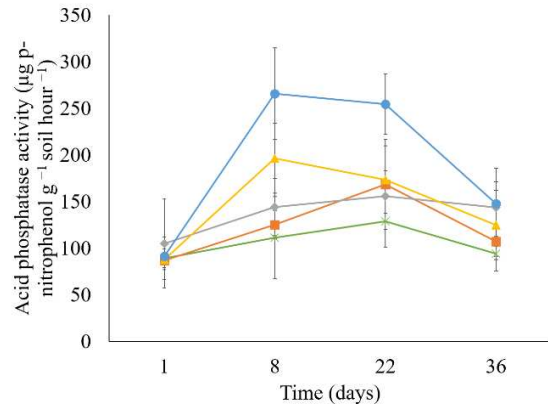
b)



c)



d)



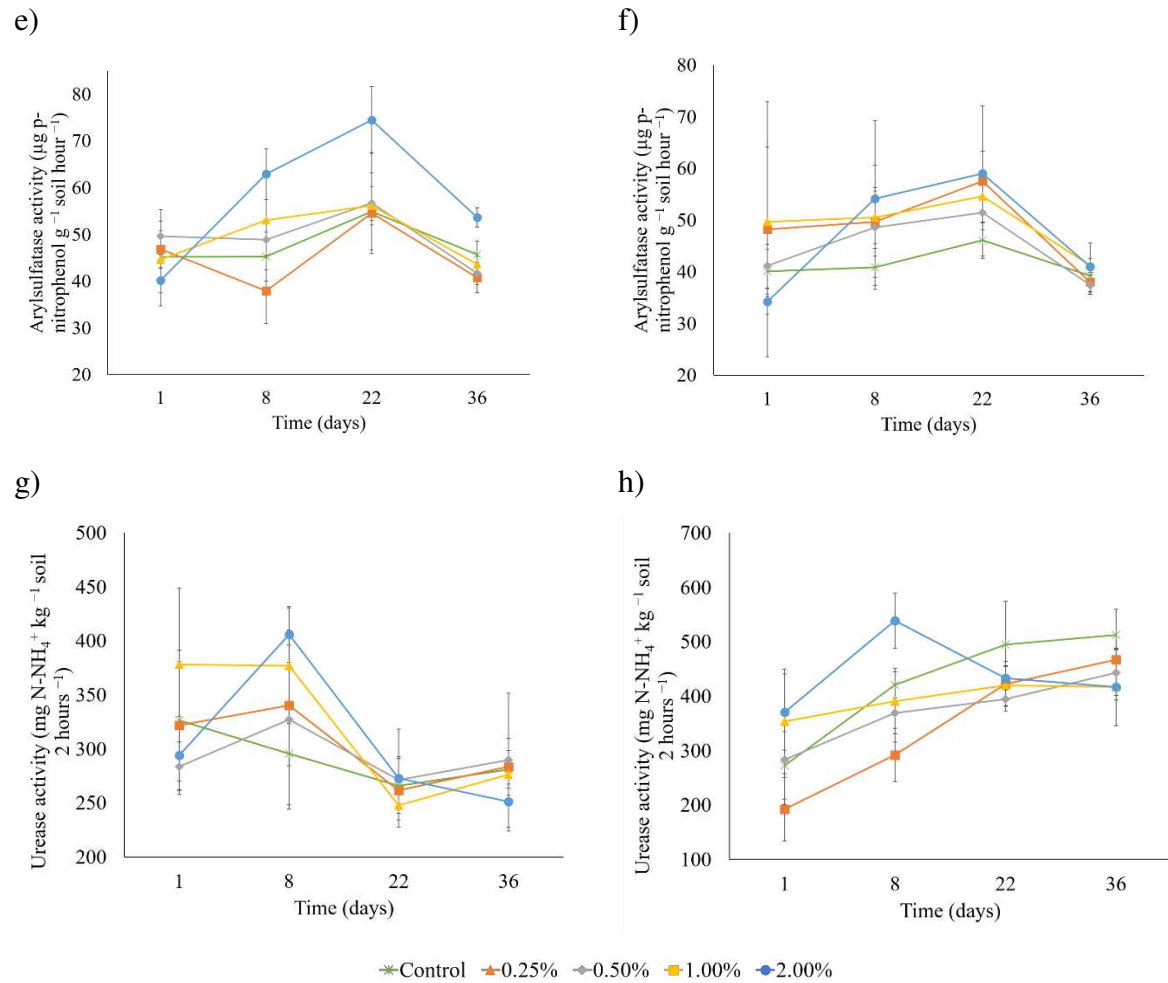


Fig. 4.4. Enzymatic activity in different horizons, for different treatments applied over time. β -glucosidase in (a) soil A, (b) soil B, acid phosphatase in (c) soil A, (d) soil B, arylsulfatase in (e) soil A, (f) in soil B, urease in (g) soil A and (h) soil B.

4.3.2. Effect of microalgae biomass for the maximum values of the analysed variables

4.3.2.1. BSR

Regarding the coefficients of the logistic equation (Table 4.4), in the treatment without addition of microalgae biomass, for soil A, the maximum accumulated emission was equal to $171.93 \text{ mg CO}_2 \text{ kg soil}^{-1}$, with a half-life time equal to 13.17 days. For soil B, the maximum was equal to $128.01 \text{ mg CO}_2 \text{ kg soil}^{-1}$, and the half-life time was 15.57 days, that is, about two days longer than soil A. In other words, the maximum accumulation of CO_2 (coefficient a) by treatment without adding biomass was the lowest, taking the longest time to reach the peak of maximum cumulative production in both types of soil.

The cumulative production for the highest dose of biomass applied in soils A and B was 782.57 and 780.53 mg CO₂ kg soil⁻¹, respectively, requiring, respectively, 12.45 days and 12.90 days to reach half the time needed to reach the peak of BSR. In other words, with the application of microalgae biomass as a mixture, soil B, which has a lower content of organic matter, tends to match soil A in terms of BSR.

Table 4.4. Coefficients of the logistic equation and time required to achieve the CO₂ release half-life time ($t_{1/2} = -b/c$) in 40 days for the different types of soil and treatments applied.

Treatment	Soil A					Soil B				
	a	b	c	t _{1/2}	r	a	b	c	t _{1/2}	r
Control	171.83	-1.73	0.13	13.17	0.98	128.01	-1.87	0.12	15.57	0.98
0.25%	284.01	-1.58	0.15	10.33	0.97	208.21	-1.73	0.17	9.98	0.98
0.50%	363.81	-1.59	0.17	9.39	0.98	326.07	-1.70	0.17	9.75	0.98
1.00%	509.51	-1.78	0.18	10.15	0.98	476.53	-1.82	0.17	10.40	0.98
2.00%	782.57	-2.08	0.17	12.45	0.99	780.53	-2.13	0.17	12.90	0.99

The correlation of the logistic equation, for all variables, was greater than or equal to 0.98. This result shows that, regardless of the treatment, the accumulated CO₂ presents the pattern of the logistic model. It was observed that the more biomass is applied, the higher the BSR. Still, the application of biomass contributed to increasing BSR even in the soil with lower levels of OM, tending in the highest proportions of applied biomass, to provide equality in the BSR among the soils.

4.3.2.2. *MBC*

The amount of MBC was always higher in the treatment with a higher dose of biomass for both soils (A and B), being, on average, 46% higher than the average of other treatments. In addition, it showed a slightly increasing trend over time. MBC was influenced by different treatments and soil types. For the treatment with an application of 2% of biomass, the highest statistical result, defined by the coefficient “a”, for soils A and B, were, respectively, 686.95 mg microbial C kg soil⁻¹ and 558.29 mg microbial C kg soil⁻¹. For the treatment without biomass, the peak was equal to 371.81 mg microbial C kg soil⁻¹ and 315.57 mg microbial C kg soil⁻¹, respectively for soils A and B (Table 4.5). The half-life time ($t_{1/2}$) was, in general, less

than the date of the first analysis, performed 5 days after transplanting (DAT). That is, biomass may have provided labile substrates since its application.

Table 4.5. Coefficients of the logistic equation and time required to reach half of the maximum cumulative production of MBC ($t_{1/2} = -b/c$) in 40 days for the different types of soil and the different treatments applied.

Treatment	Soil A					Soil B				
	a	b	c	$t_{1/2}$	r	a	b	c	$t_{1/2}$	r
Control	371.81	-6.32	1.79	3.53	0.91	315.57	-5.80	1.65	3.51	0.84
0.25%	508.47	-2.48	0.53	4.66	0.97	401.44	-4.16	0.97	4.27	0.99
0.50%	452.98	-1.24	0.19	6.57	0.85	430.52	-28.68	5.81	4.94	0.92
1.00%	480.71	-3.26	0.86	3.80	0.84	474.00	-2.38	0.41	5.86	0.95
2.00%	686.95	-3.67	0.95	3.87	0.93	558.29	-4.40	0.94	4.67	0.93

The correlation of the logistic equation, for all variables, was greater than 0.84. This result shows that, regardless of treatment, MBC presents the standard of the logistic model. In addition, it is concluded that the more biomass, the greater the MBC. The highest MBC result is related to the application of 2% of biomass applied to soil A.

4.3.2.3. *Enzymatic Activity*

The statistical analysis performed for the variable β -glucosidase (Table 4.6a) presented, for all treatments, a correlation coefficient (r) equal to or greater than 0.90 when using the logistic equation. It is observed that the maximum activity of this enzyme (coefficient a) is greater with the increase in the biomass dose. For both soils, the maximum activity value of β -glucosidase occurred in the treatment with higher biomass dose, $69.04 \mu\text{g } \rho\text{-nitrophenol g soil}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ and $52.24 \mu\text{g } \rho\text{-nitrophenol g soil}^{-1} \text{ hour}^{-1}$, respectively for soils A and B.

For arylsulfatase, the statistical analysis showed a correlation coefficient (r) equal to or greater than 0.95 (Table 4.6b). For soil A, as well as for the enzyme β -glucosidase, the maximum activity value of this enzyme (coefficient "a") was higher in the treatment with 2% biomass ($63.68 \mu\text{g } \rho\text{-nitrophenol g soil}^{-1} \text{ hour}^{-1}$) and for the other treatments, the activity values of this enzyme varied between 48.63 and $50.96 \mu\text{g } \rho\text{-nitrophenol g soil}^{-1} \text{ hour}^{-1}$. For soil B, the lowest coefficient "a" was found in the treatment without biomass ($42.09 \mu\text{g } \rho\text{-nitrophenol g}$

soil⁻¹ hour⁻¹) and the highest coefficient *a* in the treatment with the highest biomass dose, 51.38 µg ρ-nitrophenol g soil⁻¹ hour⁻¹.

For acid phosphatase, the correlation coefficient was equal to or greater than 0.87 (Table 4.6c). It is observed that the higher the biomass dose, the higher the coefficient “*a*” of acid phosphatase. For soil A, without the application of biomass, the maximum activity of this enzyme was equal to 192.44 µg ρ-nitrophenol g soil⁻¹ hour⁻¹ and with the highest dose (2%) the maximum activity was 297.12 µg ρ-nitrophenol g soil⁻¹ hour⁻¹. For soil B, these values are equal to 111.33 µg ρ-nitrophenol g soil⁻¹ hour⁻¹ and 222.64 µg ρ-nitrophenol g soil⁻¹ hour⁻¹, respectively, for treatment without application of biomass and with higher applied dose. In short, acid phosphatase was, on average, 33% higher in soil A when compared to soil B. In addition, the greater activity of this enzyme occurred in the treatment with a higher dose of biomass (2%).

The statistical analysis used for urease, adjusted the logistic curve, presented *r* greater than 0.90 for all treatments in both types of soil (Table 4.6d). For soil A, there was a gradual increase in the activity of the urease enzyme by increasing the biomass dose. The lowest coefficient “*a*” occurred in the treatment without biomass, with a value equal to 280.88 NH₄⁺ kg⁻¹ solo 2 h⁻¹ and the highest coefficient “*a*” occurred for the treatment with the highest dose of biomass, with a value equal to 310.04 NH₄⁺ kg⁻¹ solo 2 h⁻¹. For soil B, the treatment with the highest coefficient “*a*” was the treatment without biomass, with a result equal to 476.29 NH₄⁺ kg⁻¹ solo 2 h⁻¹ and the second highest maximum value was for the treatment with the highest dose of biomass, equal to 463.17 NH₄⁺ kg⁻¹ solo 2 h⁻¹.

For the four enzymes analysed, concerning half-life time, in all treatments in both types of soil, *t*_{1/2} was less than or equal to 1. The first analysis was performed on day 1, therefore, it is suggested that the biomass activated the enzymes already present in the soil.

Table 4.6. Coefficients of the logistic equation, the half-life time of β-glucosidase (a), arylsulfatase (b), acid phosphatase (c), and urea (d) (*t*_{1/2} = -*b*/*c*) for 40 days for the different

types of soil and the different treatments applied.

(a) β -glucosidase.

Treatment	Soil A					Soil B				
	a	b	c	t _{1/2}	r	a	b	c	t _{1/2}	r
Control	48.61	-12.46	13.07	0.95	0.98	32.44	-12.10	12.64	0.96	0.98
0.25%	47.08	-12.41	13.11	0.95	0.92	35.72	-12.18	11.99	1.00	0.94
0.50%	50.15	-12.47	13.02	0.96	0.90	36.35	-12.17	12.26	0.99	0.90
1.00%	53.39	-12.55	12.94	0.97	0.96	39.20	-12.24	12.49	0.98	0.94
2.00%	69.04	-12.93	12.85	1.00	0.95	52.24	-12.55	12.32	1.00	0.91

(b) Arylsulfatase.

Treatment	Soil A					Soil B				
	a	b	c	t _{1/2}	r	a	b	c	t _{1/2}	r
Control	48.63	-12.46	15.04	0.83	0.98	42.09	-12.40	15.38	0.81	0.99
0.25%	47.10	-12.43	13.73	0.91	0.97	48.43	-12.33	17.86	0.69	0.95
0.50%	49.36	-12.49	17.19	0.73	0.97	45.84	-12.37	14.54	0.85	0.97
1.00%	50.96	-12.53	14.48	0.87	0.98	48.78	-12.37	16.12	0.77	0.98
2.00%	63.68	-12.47	13.01	0.96	0.97	51.38	-12.37	13.07	0.95	0.96

(c) Acid phosphatase.

Treatment	Soil A					Soil B				
	a	b	c	t _{1/2}	r	a	b	c	t _{1/2}	r
Control	192.44	-13.22	14.61	0.90	0.93	111.33	-13.33	14.73	0.91	0.97
0.25%	205.54	-13.26	14.53	0.91	0.94	133.61	-13.25	13.86	0.96	0.93
0.50%	210.58	-14.18	15.52	0.91	0.87	147.91	-13.44	14.33	0.94	0.99
1.00%	230.95	-13.34	14.25	0.94	0.96	165.00	-13.32	13.45	0.99	0.94
2.00%	297.12	-14.31	14.29	1.00	0.96	222.64	-13.34	12.98	1.00	0.91

(d) Urease.

Treatment	Soil A					Soil B				
	a	b	c	t _{1/2}	r	a	b	c	t _{1/2}	r
Control	476.29	-14.43	14.72	0.98	0.99	280.88	-13.89	17.11	0.81	0.99
0.25%	394.04	-14.28	14.24	1.00	0.94	295.17	-14.55	17.46	0.83	0.98
0.50%	402.50	-14.39	15.26	0.94	0.99	296.04	-14.39	17.51	0.82	0.99
1.00%	409.50	-14.46	16.31	0.89	0.99	300.71	-14.22	16.83	0.85	0.94
2.00%	463.17	-14.34	15.73	0.91	0.97	310.04	-14.28	17.19	0.83	0.92

Therefore, as shown by the results above, the activities of the enzymes β -glucosidase, arylsulfatase, and acid phosphatase, showed higher values for the treatment with a higher dose of biomass (2%) in soil A. The enzyme urease showed different behaviour in soils A and B.

While in the first, there was a tendency to maintain the activity of this enzyme independent of the increase in biomass, in the second there was an increase with the increase in biomass.

4.3.3. *Plant growth*

The absorption of Ca by the plant declines linearly while the biomass dose is increased (Fig. 4.5). In addition, the absorption, for the same treatment, was always greater in soil B. For soil A, the Ca concentration varied from 0.17 dag Ca kg soil⁻¹ to 0.33 dag Ca kg soil⁻¹, being the lowest value for treatment with 2% biomass and the highest value for treatment without the addition of biomass. The same behaviour was observed in soil B and the variation was from 0.23 dag Na kg soil⁻¹ to 0.62 dag Na kg soil⁻¹.

Regarding Zn, for soil A, in the treatment without biomass, the zinc concentration in the plant is, on average, 25 mg Zn kg soil⁻¹ and for the treatment with 1% biomass, it is 30 mg Zn kg soil⁻¹, jumping to 56 mg Zn kg soil⁻¹ in the treatment with higher biomass dose (2%). For soil B, there is a variation of 10 mg Zn kg soil⁻¹ in the treatment without biomass up to 15 mg Zn kg soil⁻¹ in the treatment with 0.5% biomass. For the treatment with 1% biomass, the concentration was 22 mg Zn kg soil⁻¹ and in the treatment with 2% biomass, the concentration was 33 mg Zn kg soil⁻¹. Therefore, for the same treatment, the zinc concentration in the plant was always higher in soil A than in soil B. In addition, there is a linear behaviour in the relationship between different treatments and the concentration of this nutrient.

Na showed a linear growth in the ratio of biomass dose and concentration of this nutrient, in which for both soils (A and B), the Na concentration started from around 0 g Na kg soil⁻¹ for the treatment without biomass to 10 g Na kg soil⁻¹ for treatment with 2% biomass.

In relation to B, linear growth is also observed when the dose of biomass is related to the concentration of this nutrient in the plant. For the same dose of biomass, the concentration of B was, on average, 42% higher in the plant grown in soil A when compared to soil B. For soil A, for treatment without application of biomass, the concentration of B was, on average, 6.4 mg B kg soil⁻¹, while for the treatment with a higher dose of biomass the concentration was 16.5 mg B kg soil⁻¹. For soil B, the lowest concentration of B in the plant was in the treatment with 0.25% biomass, around 3 mg B kg soil⁻¹. For the treatment without biomass in soil B, the concentration of the nutrient was, on average, equal to 5 mg B kg soil⁻¹. The highest concentration of B in soil B was found in the treatment with 2% biomass, being, on average, equal to 11 mg B kg soil⁻¹.

Fe, as well as Ca, showed, for both soils, a decrease in absorption by the plant when increasing the biomass dose, with a difference of 71% and 89%, for soils A and B, respectively, when compared to the treatment without biomass and treatment with 2% biomass. Polynomial regression was used to determine the relationship between biomass dose and Fe concentration in both soils. In soil A, an average of 500 mg Fe kg soil⁻¹ is observed for treatment without biomass up to 120 mg Fe kg soil⁻¹ for treatments with 1% and 2% biomass. For soil B, the absorption of iron was considerably higher in the treatment without biomass, reaching 1100 mg Fe kg soil⁻¹, with a sharp drop resulting, on average, equal to 100 mg Fe kg soil⁻¹ for all treatments in that biomass was applied.

Therefore, the Ca concentration is higher in soil B, regardless of the treatment. The concentration of Zn and B is higher in soil A regardless of the treatment. The concentration of Ca and Fe in the plant tends to decrease by increasing the dose of biomass applied to the soil. The concentration of Zn, Na, and B tends to increase by increasing the applied biomass dose.

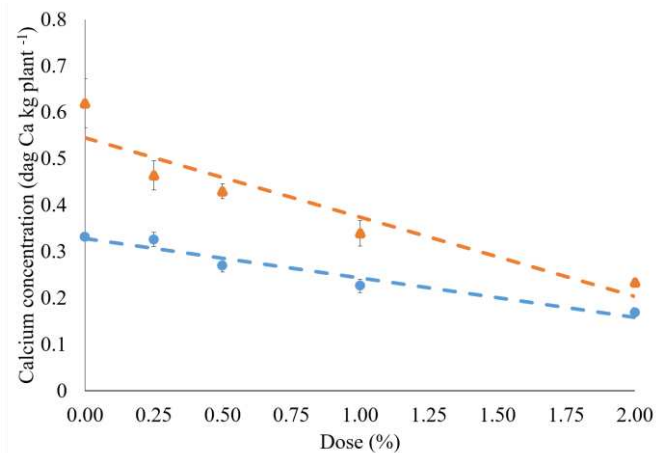
(a)

$$\text{Ca (Soil A)} = 0.32801 * - 0.08495 * \text{dose}$$

$$R^2 = 0.91$$

$$\text{Ca (Soil B)} = 0.5453 * - 0.1709 * \text{dose}$$

$$R^2 = 0.83$$



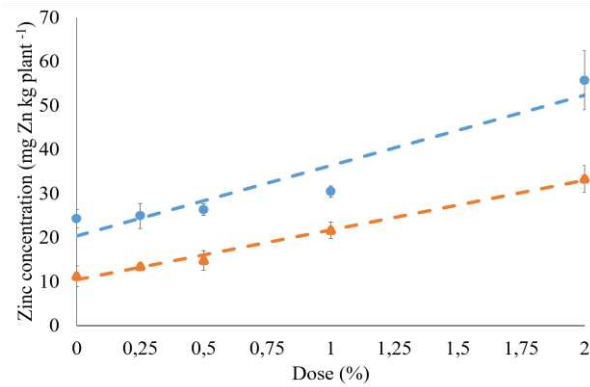
(b)

$$\text{Zn (Soil A)} = 20.32 * + 16.01 * \text{dose}$$

$$R^2 = 0.84$$

$$\text{Zn (Soil B)} = 10.41 * + 11.30 * \text{dose}$$

$$R^2 = 0.94$$



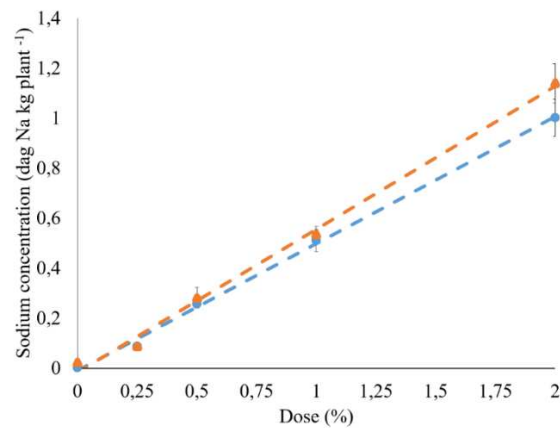
(c)

$$\text{Na (Soil A)} = 0.0093 ** + 0.5079 ** \text{dose}$$

$$R^2 = 0.99$$

$$\text{Na (Soil B)} = 0.0154 ** + 0.5712 ** \text{dose}$$

$$R^2 = 0.94$$



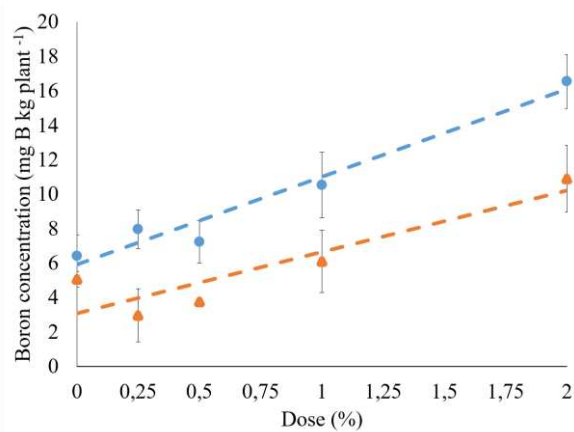
(d)

$$\text{B (Soil A)} = 5.919 * + 5.088 * \text{dose}$$

$$R^2 = 0.99$$

$$\text{B (Soil B)} = 3.066 * + 3.574 * \text{dose}$$

$$R^2 = 0.94$$



(e)		
Fe (Soil A) = 395.2 * - 296.1 * dose + 70.4 * dose ²		R ² = 0.80
Fe (Soil B) = 845.0 * - 1614.0 * dose + 630 * dose ²		R ² = 0.94

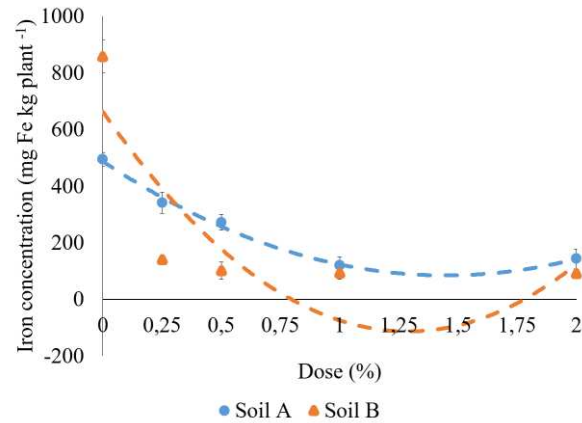


Fig. 4.5. Concentration of (a) calcium, (b) zinc, (c) sodium, (d) boron and (e) iron for each treatment and each soil. * Significant at 5% probability. ** Significant at 1% probability.

To determine the biomass dose that provides the highest SDMM, it was used the polynomial regression curve for both soils (Fig. 4.6). The growth analysis of the plant revealed that for both soils this dose of biomass is approximately 0.55%. It is noteworthy that, applying this dose in both soils, the plant's SDMM cultivated in soil A is 5.76 g and applying the same dose in soil B, the result is 4.37 g. Therefore, for the same biomass dose, the growth of the crop is 24% higher in soil A when compared to soil B.

SDMM (Soil A) = -1.545 ** dose ² + 1.670 ** dose + 5.311 **	R ² = 0.95
SDMM (Soil B) = -1,456 * dose ² + 1.650 * dose + 3.909 *	R ² = 0.81

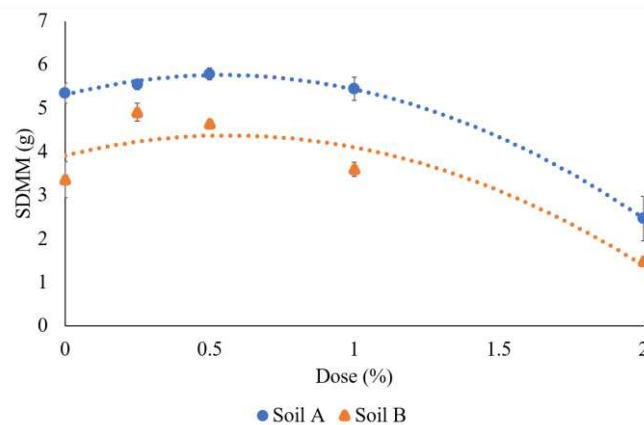


Fig. 4.6. Relationship between biomass dose and SDMM for soils A and B. * Significant at 5% probability. ** Significant at 1% probability.

In terms of biomass application, the ideal scenario is one in which the greatest amount of biomass is used while providing the greatest accumulation of SDMM. The results found demonstrate that the treatments with biomass applied in soil A showed better results for the growth of the plant when compared to soil B. For the characteristics related to the soil, the maximum dose (2%) applied in soil A presented better results of BSR, MBC, TOC, and enzymatic activity. However, in a short-term analysis, the quality of the soil must be in line with the development of the plant, with that the result that presents greater SDMM, considering planting immediately after the application of microalgae biomass, is related to the dose of 0.55 % applied as a mixture in soil A.

4.4. Discussion

In the present study, the introduction of an OM source, through microalgae biomass, induced an increase in CO₂ emissions, which is related to an increase in soil respiration and C content. It should be noted that soil respiration is directly proportional to microbial activity. Therefore, it is suggested that biomass, in the form of a mixture, drives the increase in microbial activity. As the results show, the highest values of soil respiration occurred in the treatment with 2% of biomass applied in the soil with a high content of OM. However, for Soil B, the four treatments considering the application of biomass, BSR presented higher results when compared to soil without biomass. Demonstrating that, even with less OM availability in the soil, biomass positively interferes in the activity of the soil microbiota.

Castro et al. (2017) registered higher values of CO₂ flow when applying biomass of microalgae in the form of biofilm with live cells. In this work, microalgae biomass was applied dry. Marks et al. (2019) show that, while the dry microalgae biomass undergoes decomposition and release of nutrients like many biofertilizers, live biomass provides stabilization of nutrients in the soil and prolongation of the activity of heterotrophic bacteria.

There are few studies that evaluate the basal respiration of the soil through the application of microalgae biomass produced from effluent treatment. Among the works found, a Table 4.7 presents a synthesis of studies that applied microalgae biomass to the soil. It is observed that this application influenced the breathing of the soil, corroborating the hypothesis that the biomass produced from effluent treatment has a positive effect as a biostimulant of the soil. In this work, the application of 2% biomass provided about 781 mg CO₂ kg⁻¹ soil. Castro et al. (2017) achieved a RBS of 600 mg CO₂ kg⁻¹ soil when applying biomass as biofilm in soil.

When applying microalgae as biofilm in a microcosm, Marks et al. (2019) achieved a RBS of 372 mg CO₂ kg⁻¹ soil. The results suggests that the application of dry biomass in the form of a mixture boosted the greater soil biostimulation. However, it must be considered that the preliminary characteristics of the soil are determinant to define the response to the application of biomass.

Table 4.7. Basal soil respiration in different works.

Treatment	Applied TOC (mg kg ⁻¹ soil)	Experiment period (days)	BSR (mg CO ₂ kg ⁻¹ soil)	Reference
	Without Biomass		171.83	
Application in the form of a mixture in soil of horizon A (0-20cm)	0.25% biomass		284.01	
	0.50% of biomass		363.81	
	1.00% of biomass		509.51	
	2.00% of biomass		782.57	
	Without Biomass	40	128.01	This work
Application in the form of mixture in soil of horizon B (20-40cm)	0.25% biomass		208.21	
	0.50% of biomass		326.07	
	1.00% of biomass		476.53	
	2.00% of biomass		780.53	
Application in the form of biofilm as a nitrogen source	No addition of nitrogen source		407.20	Castro et al. [6]
	Biofilm	60	600.16	
	Urea		326.85	
Microcosm incubation	Bacteria + algae + fungi		372.00	Marks et al. [9]
	Bacteria + fungi	65	332.00	
	No microorganisms		320.00	

BSR provides information about the activity of microorganisms present in the soil, however it is not possible to say whether the amount of microorganisms increases with the presence of microalgae biomass. This information can be provided through the MBC. The results show that the MBC for the treatment with 2% of biomass was equal to 687 mg microbial C kg soil⁻¹ and 558 mg microbial C kg soil⁻¹, for Soil A and Soil B, respectively. These results are greater than those found by other studies in which other sources of OM for soil were used. Kayikcioglu (2012) evaluated irrigation in predominantly clayey soil with water and treated effluent from advanced biological treatment. Among the results, the author notes that MBC was slightly higher in soil irrigated with water (maximum equal 383.2 mg microbial C kg soil⁻¹) when compared to soil irrigated with treated effluent (maximum equal 361.3 mg microbial C kg soil⁻¹). The authors suggest that the availability of OM in the soil causes the microbial activity, expressed by BSR, to increase and the MBC to decrease. With the increase in microbial activity, carbon is incorporated into the humification process, characterized by the microbial decomposition of animals and plants, transforming it into new compounds (nutrients). These results are closer to the control treatment of this study, obtaining 371.8 mg microbial C kg soil⁻¹, and 315.6 mg microbial C kg soil⁻¹.

Throughout the experimental period, there was consumption of TOC, suggesting that the balance in the soil and in the production of biomass that is incorporated into the soil had not yet occurred. This phenomenon can be compared to the study carried out by Boeira and Souza (2007), in which the authors applied sludge from sewage treatment to the soil. The authors observed a significant increase in the stocks of organic C through the application of this source of OM. However, there was a significant consumption of OM in the soil until there was a balance in the C: N ratio. Jin et al. (2020) investigated the characteristics of the soil, such as consumption of organic carbon, aggregation, and microbiota from the application of biochar for an experimental period of six years. The authors observed that there was a rapid increase in the consumption of organic carbon until the 23rd day and, subsequently, a less significant consumption. The authors also associate the phenomenon with the stabilization of the C:N ratio and the stabilization of the mineralization of organic carbon that is expressed by BSR. Therefore, the consumption of TOC over the studied period may be associated with an imbalance in the C:N ratio and the activation of the microbiota through the application of biomass, measured through BSR.

It was also observed an increase in the activity of the enzyme β -glucosidase when increasing the dose of biomass applied in the soil. Kayikcioglu (2012) shows that this enzyme is sensitive to excess nutrients such as K, Pb, Cu, B, Na, and Zn. However, in the present study, there was an increase in nutrients such as B, Na, and Zn when increasing the biomass dose, however, this increase did not reflect in the decrease in the activity of this enzyme in higher biomass doses. Adetunji et al. (2017) show that the activity of β -glucosidase decreases with the depth of the soil, this is verified in the present study in which soil A, more superficial, presented greater activity. Besides, β -glucosidase depends on the supply of substrates and the microorganisms that produce it are more active in the topsoil. Regarding acid phosphatase, supplementation with OM increases the activity of this enzyme (ADETUNJI et al., 2017), as can be seen, acid phosphatase activities were boosted by increasing the biomass dose, in which for both soils (A and B), the greatest activity was in the treatment with 2% biomass. Previous works (KAYIKCIOGLU, 2012; MOURA et al., 2018) associate the inhibition of the arylsulfatase enzyme with the presence of Mn in the soil. In this work, the Mn concentration remained constant regardless of the treatment, yet the activity of this enzyme did not decrease when the biomass dose was increased. Therefore, the biomass used does not have Mn in concentrations that inhibit arylsulfatase activity. The logistic regression used in the experiment showed that the half-life time for all enzymes coincides with the date of the first analysis carried out, suggesting that these enzymes did not increase in the soil, they were probably activated due to the application of biomass.

The results showed that there is a decay of urease over time in Soil A and an increase in the activity of this enzyme in Soil B. Gomes et al. (2018) points out that nutrients like B can inhibit urease activity. The microalgae biomass contains B and in addition, soil A is richer in B when compared to soil B, so this factor may have contributed to this result. Beyond that, the experiment was carried out in the winter period, with an average temperature of 17° C according to data collected at the weather station. Urease activity may have been influenced by temperature. According to Machuca and Córdova (2015), the hydrolysis of urease is temperature dependent. The authors evaluated the performance of this enzyme by comparing it at 12° C and 34° C, with activity around 55% higher at 34° C. In this context, there may be better results of enzymatic activity for the same experiment carried out in a period with higher temperatures.

Regarding the growth of *Zea Mays* L., a decay of plant SDMM occurred from the application of 0.55% of biomass in both soils. For both soils, the plant, in the treatment in which 2% of biomass was applied, was the least developed. A combination of factors are considered for this less development in the treatment with a higher dose of biomass. As pointed out by Castro et al. (2020a), biomass can form a physical barrier to the nutrients released by plants. Another point is that, excess micronutrients can hinder plant growth (KULKARNI; GOSWAMI, 2019). In the present work, micronutrients like Zn and B increase the concentration in the plant when the biomass dose is increased. These nutrients are inherent to biomass considering the production of microalgae biomass from the effluent treatment in HRAPs. Therefore, the ideal biomass dose should consider the concentration of these nutrients. Beyond that, the biomass separation process in the effluent treatment uses NaOH for the destabilization of the particles, formation of flakes, and decantation. The excess sodium added in this process can prevent the plant from growing.

4.5. Conclusion

It is concluded that biomass influences positively, even in soils with low levels of OM. Therefore, it is a potential material to be applied in the recovery of soil fertility. Despite this positive performance, the characteristics of the soil and the growth of the plant must be in line in short term. The ideal dose of application of biomass in the form of mixture is the one that provides the largest plant SDMM, being equal to 0.55% in both soils. Such dose provided plant SDMM equal to 5.76 g in soil A, and 4.37 g in soil B. It is concluded that biomass quantity is directly proportional to basal soil respiration, that is, a greater presence of this biostimulant leads to greater soil microbiota activity. Beyond that, applying 2% of biomass leads to greater microbial biomass carbon, total organic carbon, and enzymatic activity in both soils, when compared to the other doses evaluated.

These results are important to understand how the reuse of bioproducts, such as microalgae biomass, produced in the effluent treatment influences the quality of the soil. We provide some of the first data related to the beneficial effects of application to the soil in the form of a biomass mixture produced from the food industry effluent treatment through enzymatic activities, microbial biomass carbon, and basal soil respiration. These data can serve as a basis for future studies with other plant types and other experimental conditions.

It is recommended, for future work, to increase the temporal and spatial scale of the experiment to make more precise inferences regarding the use of microalgae biomass as a mixture in the soil. It is recommended to evaluate the interference of micronutrients released by biomass on soil quality and plant growth. It is also recommended to use microalgae biomass that is obtained by separation methods that do not require chemical coagulants.

References

- ADETUNJI, A. T. et al. The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: A review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 794–807, 2017.
- ALMEIDA, B. G. DE et al. Padronização de Métodos para Análise Granulométrica no Brasil. **EMBPARA**, p. 1–11, 2012.
- ALVAREZ V, V. H.; RIBEIRO, A. C. Calagem. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V, V. H. (Eds.). . **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5ª aproximação**. Viçosa: SBCS, 1999. p. 43–60.
- ANDRADE, F. V.; MENDONÇA, E. D. S.; RIBEIRO, I. Organic Acid Adsorption and Mineralization in Oxisoils With Different Textures. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 1, p. 976–985, 2013.
- APHA. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation, 2012.
- ASSIS, L. R. DE et al. Evaluation of the performance of different materials to support the attached growth of algal biomass. **Algal Research**, v. 39, n. September 2018, p. 101440, 2019.
- BOEIRA, R. C.; SOUZA, M. D. DE. Estoques de carbono orgânico e de nitrogênio, pH e densidade de um Latossolo após três aplicações de lodos de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 3, p. 581–590, 2007.
- CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae biofilm in soil: Greenhouse gas emissions, ammonia volatilization and plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 574, p. 1640–1648, 2017.
- CASTRO, J. DE S. et al. Algal biomass from wastewater: soil phosphorus bioavailability and plants productivity. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 1–9, 2020a.
- CASTRO, J. DE S. et al. Algal biomass from wastewater: soil phosphorus bioavailability and plants productivity. **Science of The Total Environment**, v. 711, p. 135088, abr. 2020b.

- CHIAIESE, P. et al. Renewable sources of plant biostimulation: Microalgae as a sustainable means to improve crop performance. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. December, p. 1–6, 2018.
- COÊLHO, D. DE F. et al. Microalgae: Cultivation Aspects and Bioactive Compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.
- COSTA, T. DE O. et al. Energetic potential of algal biomass from high-rate algal ponds for the production of solid biofuels. **Environmental technology**, v. 38, n. 15, p. 1926–1936, ago. 2017.
- DICK, R. P.; BREACKWELL, D. P.; TURCO, R. . Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. (Eds.). . **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 247–271.
- EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.
- GOMES, M. P. et al. Urease activity according to the different inhibitors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3685–3692, dez. 2018.
- HYAMS, D. G. **CurveExpert 1.3: a comprehensive curve fitting system for Windows**.
- JARDIN, P. Plant biostimulants : Definition , concept , main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015.
- JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-IV. The decomposition of fumigated organisms in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 203–208, 1976.
- JIN, Z.; PING, L.; WONG, M. Systematic relationship between soil properties and organic carbon mineralization based on structural equation modeling analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 277, p. 123338, 2020.
- KAYIKCIOGLU, H. H. Short-term effects of irrigation with treated domestic wastewater on microbiological activity of a Vertic xero fl uvent soil under Mediterranean conditions. **Journal of Environmental Management**, v. 102, p. 108–114, 2012.
- KOMAREK, J.; FOTT, B. **Das Phytoplankton im Susswasser Chlorophyceae (Grunanlagen) Ordnung: Chlorococcales: Bd 7 1**. [s.l.] Schweizerbart'sche, E., 1983.
- KONG, W. et al. Review on carbon dioxide fixation coupled with nutrients removal from wastewater by microalgae. **Journal of Cleaner Production**, v. 292, p. 125975, abr. 2021.
- KULKARNI, S.; GOSWAMI, A. Effect of Excess Fertilizers and Nutrients: A Review on

Impact on Plants and Human Population. **SSRN Electronic Journal**, 2019.

LORENTZ, J. F. et al. Microalgal biomass as a biofertilizer for pasture cultivation: Plant productivity and chemical composition. **Journal of Cleaner Production**, v. 276, p. 124130, dez. 2020.

MACHUCA, A.; CÓRDOVA, C. Enzymes in the rhizosphere of plants growing in the vicinity of the Polish Arctowski Antarctic Station. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 833–838, 2015.

MARKS, E. A. N. et al. Application of a microalgal slurry to soil stimulates heterotrophic activity and promotes bacterial growth. **Science of the Total Environment**, v. 605–606, p. 610–617, 2017.

MARKS, E. A. N.; MONTERO, O.; RAD, C. The biostimulating effects of viable microalgal cells applied to a calcareous soil : Increases in bacterial biomass , phosphorus scavenging , and precipitation of carbonates. **Science of the Total Environment**, v. 692, p. 784–790, 2019.

MOURA, A. DOS S. et al. Does cassava wastewater with a short incubation time affect soil organic carbon, microbial community and enzymatic activities? **CATENA**, v. 163, p. 354–360, abr. 2018.

NASCENTE, A. S.; LI, Y.; CRUSCIOL, C. A. C. Soil Aggregation, Organic Carbon Concentration, and Soil Bulk Density As Affected by Cover Crop Species in a No-Tillage System. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 3, p. 871–879, jun. 2015.

NEDERLANDS NORM. NEN 6520. Spectrophotometric determination of chlorophyll a content. . 1982.

NOVAIS, R. .; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J. et al. (Eds.). . **Método de pesquisa em fertilidade de solos**. Brasília-DF: EMBRAPA-SEA, 1991. p. 189–253.

NUSH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaepigment. **Arch. Hydrobiolol. Bech. Stuttgart**, v. 14, p. 14–36, 1981.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6637–6649, 2011.

PARRA, O.; GONZALEZ, M.; DELLAROSSA, V. Manual Taxonómico del Fitoplancton de Aguas Continentales. V. Chlorophyceae. n. January, 1983.

PEREIRA, A. S. A. DE P. et al. Organomineral fertilizers pastilles from microalgae grown in

- wastewater: Ammonia volatilization and plant growth. **Science of The Total Environment**, v. 779, p. 146205, jul. 2021.
- PICOT, B. et al. Nutrient removal by high rate pond system in a Mediterranean climate (France). **Water Science and Technology**, v. 23, n. 7–9, p. 1535–1541, 1991.
- RIBEIRO, V. J. et al. Volatilization of ammonia in stabilized slow-release nitrogen fertilizer under controlled conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 6, p. 793–798, 2016.
- SARMA, B. et al. Organic amendments: Effect on carbon mineralization and crop productivity in acidic soil. **Journal of Cleaner Production**, v. 152, p. 157–166, maio 2017.
- SILVA, J. T. A.; BORGES, A. L.; MALBURG, J. L. Solos, Adubação e Nutrição da Bananeira. **Informe Agropecuário**, v. 20, n. 196, p. 21–36, 1999.
- SOUZA, M. H. B. DE et al. Soil application of microalgae for nitrogen recovery: A life-cycle approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 342–349, 2019.
- SULEIMAN, A. K. A. et al. From toilet to agriculture: Fertilization with microalgal biomass from wastewater impacts the soil and rhizosphere active microbiomes, greenhouse gas emissions and plant growth. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 161, p. 104924, out. 2020.
- TAVARES FILHO, J.; BARBOSA, G. M. DE C.; RIBON, A. A. Physical properties of dystrophic Red Latosol (Oxisol) under different agricultural uses. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 925–933, jun. 2010.
- TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS, 1995.
- TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. 3° ed. Brasília: Embrapa, 2017.
- TORRES, J. L. R. et al. Soil physical attributes and organic matter accumulation under no-tillage systems in the Cerrado. **Soil Research**, v. 57, n. 7, p. 712, 2019.
- UTERMÖHL, H. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. **Mitteilung Internationale Vereinigung fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie**, v. 9, p. 1–38, 1958.
- VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, 1987.
- VERCHOT, L. V.; BORELLI, T. Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in

degraded tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 625–633, 2005.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Limnological analysis**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1991.

5. CAPÍTULO II: BENEFÍCIOS AMBIENTAIS DO USO DE BIOESTIMULANTE DE MICROALGAS NO CRESCIMENTO DE MILHO (*ZEA MAYS L.*)

Resumo: A produção de biomassa de microalgas em efluentes é uma biotecnologia que vem sendo amplamente difundida em função da sua principal vantagem que é a utilização em diversas rotas de aproveitamento. No presente estudo investigou-se a rota de aplicação da biomassa no solo para atuar como bioestimulante e contribuir para o crescimento de plantas. Por meio da avaliação do ciclo de vida, foram investigados os impactos ambientais do cultivo de milho (*Zea Mays L.*) mediante aplicação de biomassa de microalgas produzida em lagoas de alta taxa (LATs) a partir do tratamento de efluente de indústria de alimentos em solo de Horizonte A (0-20 cm de profundidade) e solo de Horizonte B (20-40 cm de profundidade). A unidade funcional da análise foi 1 kg de planta. Quatro cenários foram analisados, nos quais, para cada tipo de solo, avaliou-se opções na etapa de colheita da biomassa, sendo coagulação química e sedimentação gravitacional. O inventário realizado mostrou que houve, em média, 20% mais gasto de energia e insumos para o solo de Horizonte B em relação ao solo de Horizonte A. Além disso, é necessário aplicar, em média, 18% mais biomassa nesse solo para ter a mesma eficiência de produtividade de planta quando comparado ao solo de Horizonte A. Por outro lado, produzir mais biomassa implicou no aumento médio de 20% no volume de efluente tratado e, conseqüentemente, aumentou a geração de produtos evitados. Os resultados da pegada de carbono mostraram que, apesar de haver fatores contribuintes que apresentaram carga positiva de pegada de carbono, todos os cenários avaliados tiveram economia de pegada de carbono. Nos cenários SC1 e SC2, o hidróxido de sódio (NaOH), utilizado como coagulante químico na etapa de separação de biomassa, contribuiu em mais de 50% dos impactos nas categorias analisadas. Na ausência de NaOH, expressa em SC3 e SC4, a eletricidade, para rotação das pás das LATs e secagem da biomassa, é o principal fator para os impactos relativos a acidificação terrestre e depleção fóssil. O fósforo aparece como principal fator nas demais categorias. Pela análise de Monte Carlo, as principais incertezas observadas no presente estudo são relativas à depleção fóssil e mudanças climáticas nos cenários que utilizam NaOH.

Palavras-chave: Impacto ambiental; Biomassa algal; Recuperação de recursos; Tratamento de efluente; Emissão de gases de efeito estufa.

5.1. Introdução

À medida que a população global cresce e o consumo de recursos per capita aumenta, a humanidade enfrenta desafios relacionados à água, alimentos, energia e sustentabilidade ambiental (DILEKLI; CAZCARRO, 2019). Dentre os objetivos do desenvolvimento sustentável (ODS), as metas do objetivo 6 visam alcançar o acesso universal e equitativo a água potável segura e acessível, saneamento e higiene até 2030 (WHO; UNICEF, 2019). Nesse contexto, o tratamento de águas residuárias, contribui para alcançar este objetivo, por ser uma forma de mitigar problemas de saneamento e poluição de corpos hídricos. Ademais, o tratamento de efluentes gera resíduos que podem ser convertidos em bioprodutos e bioenergia por meio de diversas rotas de aproveitamento (OLIVARES et al., 2020). A gestão desses resíduos é uma etapa crucial e uma oportunidade para recuperar recursos (LEE et al., 2018). Dentre esses recursos, temos a biomassa rica em microalgas que vem atraindo atenção (ASSIS et al., 2020; CASTRO et al., 2020b; CHOUDHARY et al., 2020; COUTO; CALIJURI; ASSEMANY, 2020), pois além de contribuir com o polimento das águas residuárias, a formação de sua biomassa consiste na recuperação de nutrientes, como nitrogênio e fósforo (COUTO et al., 2015; LI et al., 2019).

A biomassa de microalgas proporciona diversas rotas de aproveitamento como aplicação no solo, substrato para biocombustíveis, suplemento para ração animal e produção de pigmentos (ASSEMANY et al., 2018; CASTRO et al., 2020b; CHOUDHARY et al., 2020). Em relação à rota de aplicação no solo, estudos mostram que a biomassa de microalgas tem potencial para aumentar o aporte de nutrientes, a matéria orgânica do solo e capturar CO₂ da atmosfera (CASTRO et al., 2017; MARKS et al., 2017), contribuindo para redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE).

Para implementar tecnologias relativas a insumos aplicados no solo mais sustentáveis é essencial investigar a viabilidade em termos técnicos, econômicos, sociais e ambientais. Do ponto de vista ambiental, deve-se avaliar se as alternativas à base de microalgas causam menos impactos ambientais em comparação com o respectivo produto convencional (AMANN et al., 2018; CASTRO et al., 2020a). Diante disso, a avaliação do ciclo de vida (ACV) pode ser uma ferramenta eficiente, uma vez que a metodologia avalia aspectos ambientais e potenciais impactos de um bem ou serviço. A ACV é baseada na coleta e quantificação de materiais e energia necessários em seus processos produtivos, bem como resíduos e emissões lançadas no meio ambiente (CASTRO et al., 2020a; ISO, 2006a; SOUZA et al., 2019).

Dentre as formas de avaliar os impactos ambientais, a utilização da categoria de impacto da ACV relativa à emissão de gases de efeito estufa permite examinar a pegada de carbono de um processo (DELRE; TEN HOEVE; SCHEUTZ, 2019). Logo, a pegada de carbono é uma ferramenta capaz de auxiliar na definição dos processos da aplicação de biomassa de microalgas que contribuem para a emissão de gases de efeito estufa e, conseqüentemente, estudar propostas para mitigar essa emissão (CLABEAUX et al., 2020).

Embora existam relatos da avaliação dos impactos ambientais da aplicação da biomassa de microalgas no solo (CASTRO et al., 2020a; SOUZA et al., 2019), não há informações sobre essas análises sendo realizadas em solos com diferentes teores de matéria orgânica e sua aplicação com a biomassa seca na forma de mistura. Além disso, não há uma abordagem relacionada ao balanço e pegada de carbono sendo realizadas junto a essas análises. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os impactos ambientais do cultivo de uma planta (milho) em solos que receberam biomassa de microalgas como bioestimulante. As principais inovações deste estudo são (i) avaliação dos impactos ambientais do cultivo de milho mediante aplicação de biomassa de microalgas produzida em tratamento de efluente de indústria de alimentos em solos de diferentes profundidades, (ii) análise do balanço e pegada de carbono dessa forma de aplicação de biomassa e (iii) a projeção de um cenário ambiental otimizado para aplicação dessa biomassa no solo.

5.2. Materiais e Métodos

Os dados utilizados na ACV foram obtidos a partir dos experimentos de produção de biomassa a partir do tratamento de efluente e aplicação seca no solo e em forma de mistura. Os experimentos foram realizados em escala piloto, sendo complementados, quando necessário, por dados secundários.

A ACV foi conduzida seguindo os padrões internacionais (ISO, 2006a, 2006b, 2006c), que estabelecem a composição de quatro etapas: definição do objetivo e do escopo, análise do inventário, avaliação do impacto e interpretação. Na primeira etapa, o objetivo do estudo e sua unidade funcional foram definidos, assim como as fronteiras do sistema e quais suposições e limitações o estudo adotou. Na etapa de análise do inventário, foram levantadas as entradas, saídas e produtos evitados dos processos e realizados os cálculos para compor o inventário. Na etapa de avaliação de impacto foram modelados os impactos ambientais do estudo, e por fim, a etapa de interpretação ocorreu, não só ao final, mas paralelamente a todas as etapas

anteriormente mencionadas. Foi realizado uma avaliação de ciclo de vida alocacional. Esse tipo de análise permite identificar onde melhorias podem ser feitas em um sistema (GOGLIO et al., 2020).

O desempenho técnico dos cenários foi investigado previamente, onde quatro doses de bioestimulantes a base de microalgas foram aplicadas contra um tratamento controle em um solo do horizonte A (0-20 cm de profundidade) com 57,90 g MO kg⁻¹ solo e em um solo do horizonte B (20-40 cm de profundidade) com 32,80 g MO kg⁻¹ solo. As doses foram definidas com base nas características bioquímicas do solo de outros trabalhos (NASCENTE; LI; CRUSCIOL, 2015; TAVARES FILHO; BARBOSA; RIBON, 2010; TORRES et al., 2019). Optou-se por investigar solos com maior e menor concentração de matéria orgânica a fim de analisar o benefício que esse material incorporado ao solo poderia trazer para solos com diferentes condições. Verificou-se, por meio da análise técnica experimental, que para alcançar maior produtividade de planta com um bioestimulante a base de biomassa microalgal, ele deve ser aplicado em uma proporção de 0,5% (m/v) em relação a cada um dos tipos de solo.

5.2.1. Objetivo e unidade funcional

O estudo investigou o desempenho ambiental da aplicação de biomassa para o crescimento de milho (*Zea Mays* L.). A unidade funcional adotada foi de 1 kg de planta. Ressalta-se que a unidade funcional foi limitada com base no período experimental do qual coletou-se os dados.

5.2.2. Configuração experimental e obtenção de dados primários

Apresenta-se a metodologia utilizada para a produção de biomassa de microalgas, crescimento da planta e quantificação da emissão de CO₂.

5.2.2.1. Produção de biomassa

A biomassa foi produzida na área experimental de tratamento de efluentes e produção de biomassa do Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°46'09"S, 42°51'29,7"O). O município de Viçosa tem uma altitude média de 648 m acima do nível do mar, é caracterizado por regime anual de chuva de

aproximadamente 1.221 mm e uma temperatura média anual entre 19°C e 20 °C. A umidade relativa do ar é de, em média, 81%. O clima local, de acordo com a classificação Köppen, é Cwa tipo tropical de altitude com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos (ROCHA et al., 2012).

Para o cultivo da biomassa, foram utilizadas quatro lagoas de alta taxa (LATs), operadas (paralelamente durante 8 dias) em modo batelada e alimentadas com efluente primário (após flotador físico-químico) de efluente de uma indústria de processamento de carne. As principais atividades da indústria são a produção de embutidos e produção de bacalhau. O efluente de origem industrial é gerado em várias fases do processo produtivo, nomeadamente no descarte de tanques de cozimento e resfriamento de embutidos e dos tanques de dessecamento de bacalhau e na lavagem de pavimentos e equipamentos durante o processo produtivo.

As LATs (escala piloto) feitas de fibra de vidro e pás de aço inoxidável (seis lâminas) possuem as seguintes características: largura = 1,28 m, comprimento = 2,86 m, profundidade total = 0,50 m, profundidade útil = 0,30 m, área superficial = 3,30 m² e volume útil = 1,00 m³. Durante a operação, as pás foram operadas por motor elétrico de 0,5 cv. A rotação foi reduzida por um redutor acoplado ao motor e controlado por um inversor de frequência (série WEG CFW-08), o que garantiu uma velocidade entre 0,10 m s⁻¹ e 0,15 m s⁻¹. A biomassa produzida é composta por microalgas (a espécie predominante foi *Chlorella vulgaris*), bactérias e fungos e foi quantificada indiretamente por meio da análise de sólidos suspensos voláteis pelo método 2540E (APHA, 2012).

A biomassa foi colhida com a adição de 50 % (m/v) de hidróxido de sódio na LAT, promovendo o aumento de pH para 12. Após a homogeneização do líquido em uma mistura rápida por aproximadamente 15 minutos, promoveu-se uma mistura lenta com as próprias pás por 1 h. O efluente foi deixado 24 horas em repouso na LAT para propiciar a sedimentação da biomassa. Por fim, a biomassa foi seca em estufa.

Para composição do inventário, os dados secundários utilizados relativos ao gasto energético por unidade de área para rotação das pás do motor da LAT (Albarelli et al., 2018) e energia gasta para secagem (Soares et al., 2019) foram considerados pois o experimento foi realizado em escala piloto e a utilização de dados primários seriam superdimensionados e o presente trabalho visa avaliar os impactos em escala real. Com relação à eficiência de recuperação de biomassa por decantação (Ferreira et al., 2020) e teor de umidade na biomassa

colhida por decantação (Assis et al., 2020), os dados secundários são considerados pois não foi realizada decantação e deseja-se comparar os impactos dos métodos de separação por coagulação química com NaOH e por sedimentação gravitacional. Na Tabela 5.1 apresenta-se os dados primários e secundários utilizados para elaboração do inventário.

Tabela 5.1. Dados primários e secundários utilizados como entrada na ACV.

Produção da biomassa	Quantidade	Descrição
Nitrogênio total	101,38 mg L ⁻¹	Concentração de nitrogênio no meio de cultivo
Fósforo	4,3 mg L ⁻¹	Concentração de fósforo no meio de cultivo
Coagulante NaOH	4 kg	Quantidade de coagulante para quatro operação
Pás do motor	2,7 kw ha ⁻¹	Energia para operar a LAT
Biomassa cultivada	1867,52 g	Valor quantificado experimentalmente por meio da operação de 4 LATs
Biomassa colhida	1240,00 g	Valor quantificado experimentalmente por meio da operação de 4 LATs
Tempo de operação	8 dias	-
Energia de secagem	0,46 kwh m ⁻³	Energia para operação de secador linear com corrente de ar quente e ciclone.
Eficiência de recuperação de biomassa por decantação	87,44 %	-
Teor de umidade na biomassa colhida por decantação	91,84 %	-
Produção de planta	Quantidade	Descrição
Quantidade de solo por vaso	2 kg	-
Porcentagem de biomassa por vaso	0,5%	-
Valor médio de mMSPA - solo de Horizonte A	5,79 g	Obtido por meio da média de 4 plantas
Valor médio de mMSPA - solo de Horizonte B	4,64 g	Obtido por meio da média de 4 plantas
F ₂ SO ₄	17,00 kg ha ⁻¹	Fertilização do solo
KOH	724,93 kg ha ⁻¹	Fertilização do solo
P ₂ O ₅	917, 51 kg ha ⁻¹	Fertilização do solo
(NH ₄) ₂ SO ₄	471,71 kg ha ⁻¹	Fertilização do solo
H ₃ BO ₃	11,49 kg ha ⁻¹	Fertilização do solo
ZnSO ₄	40,97 kg ha ⁻¹	Fertilização do solo
CuSO ₄	10,47 kg ha ⁻¹	Fertilização do solo
MnSO ₄	27,69 kg ha ⁻¹	Fertilização do solo
Emissão de CO ₂ no solo de Horizonte A	383,25 kg ha ⁻¹	Obtido por meio da média de 4 repetições
Emissão de CO ₂ no solo de Horizonte B	343,00 kg ha ⁻¹	Obtido por meio da média de 4 repetições

5.2.2.2. *Crescimento da planta*

Para cultivo do milho (*Zea Mays* L.) preparou-se vasos com capacidade de 2 dm³ em dois tipos de solo, um solo do horizonte A com 57,90 g matéria orgânica (MO) kg⁻¹ solo e outro do horizonte B com 32,80 g MO kg⁻¹ solo. Em quatro repetições para cada tipo de solo, foram semeadas seis sementes de milho (Biomatrix BM709 PR02) a 2 cm de profundidade. Após 7 dias realizou-se os desbastes deixando apenas 3 plantas em cada unidade experimental. Uma solução multi-nutriente foi adicionada aos 0, 13 e 26 dias após a semeadura de acordo com Novais et al. (1991). A irrigação dos vasos foi realizada diariamente em função da necessidade, mantendo a umidade constante para todos os vasos a 80% da capacidade de campo. O controle de plantas daninhas, pragas e doenças foi realizado quando necessário.

Ao final do experimento (40 dias), as plantas foram seccionadas a cerca de 0,5 cm do solo, as quais foram acondicionadas separadamente em sacos de papel e levados à estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 65 °C, para posterior determinação da produção de massa de matéria seca da parte aérea (mMSPA).

5.2.2.3. *Quantificações de carbono*

O carbono do efluente bruto, efluente tratado, da biomassa e dos solos de Horizonte A e B foram determinados de acordo com o equipamento analisador de C TOC 5000A - Shimadzu com catalisador de sensibilidade normal. O equipamento determina as concentrações de carbono orgânica, inorgânico e total. O carbono de efluente bruto é igual a 265 mg C L⁻¹ efluente. Para o efluente tratado o C é igual a 60 mg C L⁻¹ efluente, ou seja, uma eficiência de remoção de 77%. O carbono da biomassa de microalgas é igual a 262 g C kg⁻¹ biomassa. Para os solos de Horizonte A e Horizonte B, tem-se 28,03 g C kg⁻¹ solo e 16,26 g C kg⁻¹ solo, respectivamente.

A emissão de CO₂ pelo solo foi determinada com metodologia descrita por Jenkinson and Powlson (1976). As análises foram realizadas a cada três dias. Cada amostra de solo foi mantida em anel feito de cano de policloreto de vinila (PVC) e base de isopor com 300 g de solo com quantidade de biomassa pré-determinada. Partindo das amostras de solo previamente pesadas, necessitou-se, para cada amostra, 10 mL de NaOH 1 mol L⁻¹, que foi acondicionado no interior do anel de PVC contendo a amostra de solo. Em seguida, o anel contendo a amostra de solo e o frasco de NaOH foi fechado para que não houvesse entrada de CO₂ do ar externo

ou fuga do CO₂ internamente produzido. Foram mantidos anéis com apenas o frasco com NaOH sem a presença de solo, afim de determinar a captura de CO₂ que não fosse proveniente da respiração do solo. Após realizar todo o preparo para a incubação das amostras, registrou-se a hora e a data de quando se iniciou a incubação, para que fosse calculada, por meio destes dados, a concentração de CO₂ emitido. Após o processo de incubação, foi retirado do anel de PVC o frasco contendo NaOH e novamente a hora e a data de quando se finalizou a incubação foi registrada. Adicionou-se 2 mL de cloreto de bário (BaCl₂) 10% (m/v) para a completa precipitação do CO₂. Adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína 1% (m/v) e, em seguida, titulou-se sob agitação magnética com solução 0,5 mol L⁻¹ de ácido clorídrico. Ao final da titulação a coloração da solução foi de rosa a incolor. As emissões de CO₂ é igual a 383 mg CO₂ kg⁻¹ solo para o solo de Horizonte A e 343 mg CO₂ kg⁻¹ solo para o solo de Horizonte B.

5.2.3. Definição do escopo da ACV: Descrição dos cenários, fronteiras do Sistema e suposições consideradas

O estudo foi conduzido com uma abordagem “cradle-to-field”, no qual as fronteiras do sistema incluem os processos cultivo, colheita e secagem da biomassa e produção de plantas (Fig. 5.1). Os processos paralelos de produção de energia, do NaOH, gradagem e fertilização do solo também foram considerados. A colheita com uso de NaOH não é muito comum. Trata-se de uma técnica mais utilizada em nível experimental. Os cenários 1 e 2 (SC1 e SC2) foram modelados porque tanto os resultados técnicos quanto a eficiência de colheita, obtida nos experimentos, são influenciadas pela sua aplicação. Por outro lado, a sedimentação gravitacional é um método mais comum, em larga escala, para colheita e também no contexto de águas residuárias. Por isso, foram modelados os cenários 3 e 4 (SC3 e SC4), que consideram a colheita por decantação. SC1 e SC3 se referem ao solo com maior teor de matéria orgânica e SC2 e SC4 se referem ao solo com menor teor de matéria orgânica. Como a literatura não apresenta dados de eficiência de recuperação e teor de umidade da biomassa colhida cultivada em águas residuárias de indústria de carne, foram utilizados dados referentes ao uso de esgoto doméstico (ASSIS et al., 2020; FERREIRA et al., 2020). Tais trabalhos apresentam condições ambientais próximos, mesma escala experimental e os resultados experimentais mostraram dominância das mesmas espécies da comunidade fitoplânctonica.

A modelagem do inventário foi realizada depois de concluir-se todos os balanços de massa e energia, considerando a unidade funcional adotada. Foram considerados como entrada

a produção dos componentes químicos e energia necessários para realização dos processos. Foram desconsiderados os impactos de infraestrutura, ou seja, da construção de instalações e equipamentos, inclusive, os referentes a produção de biomassa, uma vez que eles possuem uma vida útil longa (CASTRO et al., 2020a; FERREIRA et al., 2020; SOUZA et al., 2019). Na etapa de cultivo, foram consideradas as quantidades de nitrogênio total, fósforo total e água evitados devido ao uso de águas residuárias como meio de cultivo. Essa abordagem já foi utilizada em outros estudos (CASTRO et al., 2020a; FERREIRA et al., 2020; SOUZA et al., 2019) e contextualiza tanto as vantagens quanto as desvantagens desse meio de cultivo quando comparado ao meio sintético. Apesar do emprego de águas residuárias evitar os impactos causados pelos fertilizantes convencionais, suas características (presença de bactérias e algas que competem com as microalgas, presença de sólidos suspensos reduzindo a incidência solar na coluna d'água e nutrientes desbalanceados retardam) limitam sua produtividade. O maior tempo de cultivo para obtenção da mesma quantidade de biomassa leva ao maior consumo energético no cultivo em águas residuárias (SCHNEIDER et al., 2018). Ressalta-se que não foram consideradas perdas no processo de secagem. As fronteiras do sistema da ACV são apresentadas na Fig. 5.1.

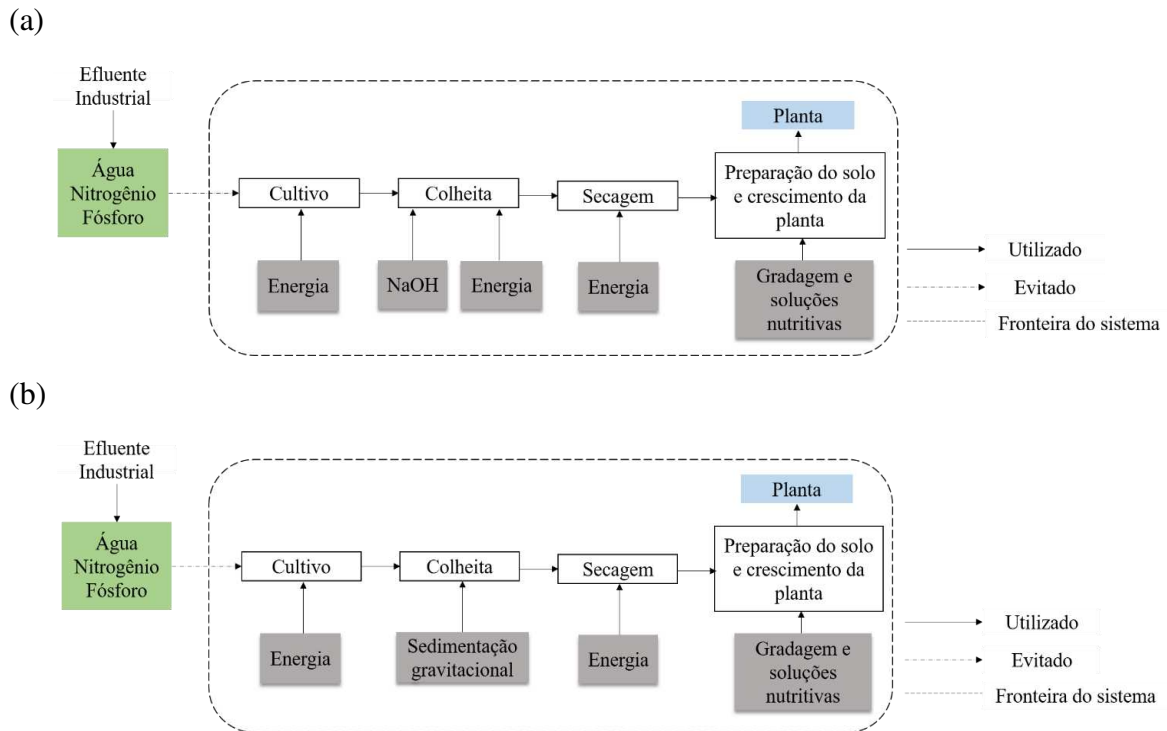


Fig. 5.1. Fronteiras do sistema de ACV (a) para SC1 e SC2 e (b) para SC3 e SC4.

Como o experimento da produção de plantas foi monitorado durante 40 dias, a ACV foi limitada a esse período. Ainda, como limitação da análise tem-se que, apesar do crescimento da planta e as emissões de CO₂ não terem sido monitoradas em um mesmo experimento, com vistas a manter um padrão experimental, assumiu-se na modelagem que emissões medidas ocorreram durante o desenvolvimento da planta.

5.2.4. Avaliação de ciclo de vida: metodologia, categorias de impacto e base de dados

O software SimaPro® (© PRé Sustainable B.V., Version 8.2.3.0) foi utilizado para quantificar os impactos ambientais dos cenários investigados. A metodologia adotada foi a ReCiPe midpoint (H) V1.12 / World Recipe H, que é representativa em escala global (SCHADE; MEIER, 2019) e apresenta resultados com menores incertezas contra a abordagem endpoint (PRÉ, 2020). O ReCiPe inclui 18 categorias de impacto ambiental, contudo, o estudo focou nas categorias que mais contextualizam os impactos associados a aplicação de resíduos no solo e ao cultivo e que foram utilizadas em outros trabalhos (BATUECAS et al., 2019; CASTRO et al., 2020a; MUÑOZ et al., 2017; NAUJOKIENĖ et al., 2019; SOUZA et al., 2019), são elas: mudanças climáticas, ecotoxicidade de água doce, acidificação terrestre, eutrofização de água doce, formação de material particulado, ecotoxicidade terrestre e depleção fóssil. Os resultados dos impactos ambientais foram discutidos de modo a identificar os principais *hotspots* ambientais e propor estratégias de melhorias.

O banco de dados selecionado foi o Ecoinvent – Allocation, default (Alloc Def) - version 3 (ECOINVENT, 2014). Escolheu-se o mix energético dos Estados Unidos por ser mais representativo em escala global por utilizar, principalmente, combustíveis fósseis para geração de energia. Nos demais foram usados dados do ‘resto do mundo’ (RoW), que eram os mais próximos e adequados.

Realizou-se normalização para comparar todos os impactos ambientais na mesma escala. Isso fornece informações sobre a significância relativa dos resultados do indicador, permitindo uma comparação justa entre os impactos estimados para cada cenário (ISO, 2006a). Neste estudo, foram utilizados os fatores de normalização europeus (Europe ReCiPe H) (ARASHIRO et al., 2018).

5.2.5. Pegada de carbono

Para estimar a pegada de carbono, foi utilizada a abordagem hierárquica da metodologia ReCiPe midpoint (H) V1.12 / World Recipe H. Na categoria de impacto relativa às mudanças climáticas, expressa em pegada de carbono, a abordagem hierárquica considera as emissões acumuladas de GEE durante um período de 100 anos de acordo com o IPCC (2013) (PRÉ, 2020). A modelagem foi feita utilizando o software SimaPro 8.2.3.0.

5.2.6. Análise de incerteza

A modelagem dos cenários foi realizada considerando o valor médio de matéria seca da parte aérea da planta de quatro repetições realizadas no experimento. Para estimar a incerteza desse parâmetro, foi realizada uma análise de Monte Carlo com os valores mínimos (5,63 g para o solo A e 4,54 g para o solo B) e máximos (5,97 g para o solo A e 4,74 g para o solo B) medidos dentre as quatro repetições de cada tratamento. A análise foi conduzida de acordo com Cherubini et al., (2015) e no software SimaPro ® (versão 8.2.3.0). O método ReCiPe Midpoint (H) V1.12 / World Recipe H foi utilizado, com intervalo de confiança de 95% e assumindo que os dados possuem uma distribuição uniforme. Essa simulação permite a propagação da incerteza sobre todos os parâmetros com 1.000 simulações independentes.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Inventário de ciclo de vida

Os dados levantados foram normalizados a fim de avaliar os impactos ambientais da produção de 1 kg de planta. Na Tabela 5.2 apresenta-se o inventário de ciclo de vida para os 4 cenários modelados. Parte dos resultados da biomassa de microalgas foram oriundos de experimentos e, portanto, representam dados primários, com exceção dos dados relativos a sedimentação gravitacional e secagem da biomassa. Os estudos realizados com resultados primários são muito importantes devido à escassez de dados nesses sistemas, principalmente no Brasil (SOUZA et al., 2019). Por outro lado, o uso de dados secundários pode contribuir para alcançar resultados mais consistentes, principalmente quando o dado primário é advindo

de fonte que não representa a realidade, podendo superestimar ou subestimar dado resultado quando aplicado em escala real.

Tabela 5.2. Inventários de ciclo de vida.

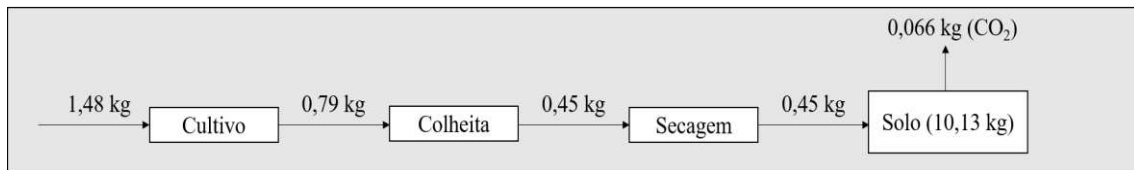
Etapa		Unidade	SC1	SC2	SC3	SC4	
Produção de biomassa	Entrada	Efluente agro-industrial	m ³	5571,34	6952,17	5571,34	6952,17
		Energia elétrica	kWh	0,96	1,20	0,96	1,20
	Produtos evitados	Água	m ³	5571,34	6952,17	5571,34	6952,17
		Nitrogênio	g	564,82	704,81	564,82	704,81
		Fósforo	g	23,96	29,89	23,96	29,89
	Saída	Efluente tratado + biomassa produzida	g	5571,34	6952,17	5571,34	6952,17
Colheita de biomassa	Entrada	Coagulante (NaOH)	kg	5,57	6,95	-	-
	Saída	Biomassa úmida	Kg	20,8925	26,0706	24,2058	30,2052
Secagem de biomassa	Entrada	Energia elétrica	kWh	0,0096	0,012	0,011134	0,013894
	Saída	Biomassa seca	g	1757,12	2155,17	1757,12	2155,17
Preparação do solo e crescimento de planta	Entrada	Biomassa seca	g	1757,12	2155,17	1757,12	2155,17
		F ₂ SO ₄	g	31,27	38,92	31,27	38,92
		KOH	g	1333,87	1660,09	1333,87	1660,09
		P ₂ O ₅	g	1688,21	2101,09	1688,21	2101,09
		(NH ₄) ₂ SO ₄	g	867,94	1080,20	867,94	1080,20
		H ₃ BO ₃	g	21,14	26,31	21,14	26,31
		ZnSO ₄	g	75,38	93,81	75,38	93,81
	Saídas	CuSO ₄	g	19,26	23,98	19,26	23,98
		MnSO ₄	g	50,95	63,41	50,95	63,41
	Emissões para o ar	Gradagem	ha	0,000173	0,000216	0,000173	0,000216
	Saídas	CO ₂	g	66,19	73,92	66,19	73,92
Saídas	Planta	kg	1	1	1	1	

Por meio da Tabela 5.2, observa-se que, no geral, há 20% mais gasto energético e de insumos para o solo de Horizonte B, para equalizar a eficiência da produtividade da planta no solo de Horizonte A. Com relação às diferentes formas de colheita de biomassa, o volume a ser seco é, em média, 20% maior nos cenários SC3 e SC4, conseqüentemente há maior gasto energético nesses tratamentos. Aplicou-se mais biomassa nos cenários com solo de Horizonte B, logo, nesses cenários ocorreram, em média, 10% mais emissões de CO₂. Os resultados experimentais mostraram que a respiração do solo é diretamente proporcional à quantidade de biomassa aplicada, sugerindo que o fornecimento de biomassa estimula os microrganismos do meio, elevando as emissões de CO₂.

5.3.2. *Balanço de carbono*

Na Fig. 5.2 apresenta-se o balanço de massa de carbono. O balanço de massa de carbono considera, inicialmente, o carbono total presente no efluente bruto. Há um decaimento no carbono presente no efluente tratado devido ao consumo pelos microrganismos presentes, que sob condições ambientais favoráveis crescem e degradam a matéria orgânica proveniente do meio, transformando esse carbono para a forma gasosa, liberada para a atmosfera. O decaimento do carbono na biomassa úmida, ou seja, após a colheita da biomassa ocorre devido ao carbono que permanece no efluente tratado, não fixando na biomassa nesse processo de separação. Considerou-se uma perda insignificante no processo de secagem (SOARES; MARTINS; GONÇALVES, 2019). O solo já possui carbono, portanto há um aumento considerável do seu conteúdo somado ao carbono da biomassa. Além disso, houve liberação de CO₂ proveniente da respiração basal do solo. Ressalta-se que o carbono permanece no sistema e a longo prazo contribui para a melhoria da qualidade físico química e biológica do solo. O balanço de carbono mostra a capacidade da biomassa em atuar no crescimento da planta, pois, mesmo em solo com menor conteúdo de carbono, a aplicação de biomassa de microalgas permite uma maior produtividade de planta. Logo, a biomassa tem atuação positiva em ambos os tipos de solo. Para o balanço de carbono não foi considerada a influência da fotossíntese, pois, como apontado por Murchie et al. (2009), esse processo compreende um grande número de reações e processos integrados complexos, os quais não foram mensurados neste trabalho.

(a) Experimento com o solo de Horizonte A.



(b) Experimento com o solo de Horizonte B.

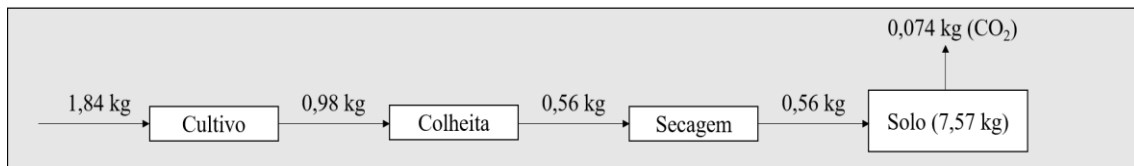


Fig. 5.2. Balanço de massa de carbono.

5.3.3. Pegada de carbono

A pegada de carbono é dada pelo potencial de aquecimento global, que representa a quantidade de emissões combinadas de gases de efeito estufa, expresso como CO₂ eq acumulado em um determinado período de tempo (HUIJBREGTS et al., 2017). No presente trabalho, esse período é de 100 anos de acordo com a abordagem hierárquica da metodologia ReCiPe utilizada. Na Fig. 5.3 apresenta-se a pegada de carbono dos 4 cenários e os fatores contribuintes usando a unidade funcional de 1 kg de planta, ou seja, a pegada de carbono (kg CO₂ eq) foi expressa em kg de planta produzida.

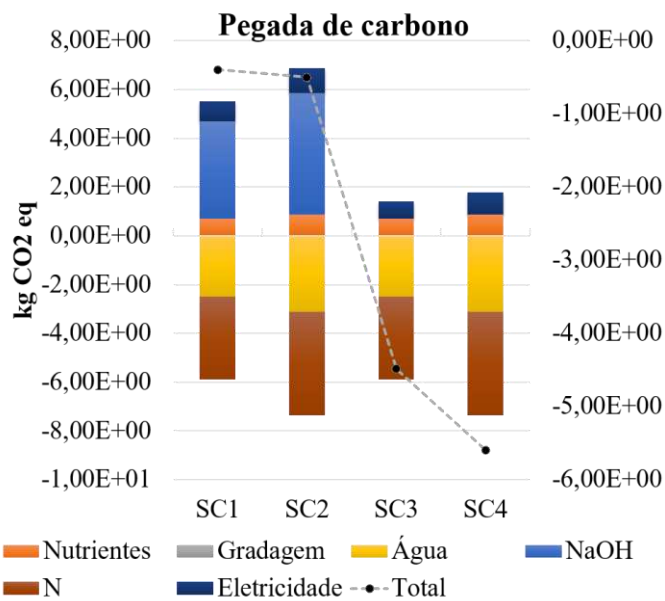


Fig. 5.3. Pegada de carbono (total e por fator de impacto) nos 4 cenários avaliados.

Para todos os cenários, obteve-se valores líquidos negativos da pegada de carbono. Tal resultado mostra que os produtos evitados no tratamento de efluente industrial é uma forma de mitigação da pegada de carbono. Nos 4 cenários os micronutrientes provenientes das soluções nutritivas e eletricidade foram os principais contribuintes da pegada de carbono. Entretanto, os cenários SC1 e SC2 tiveram os menores valores líquidos negativos devido ao NaOH (-0,40 kg CO_{2 eq} kg⁻¹ planta e -0,50 kg CO_{2 eq} kg⁻¹ planta, respectivamente para SC1 e SC2). Por outro lado, os cenários ao substituir a forma de colheita da biomassa, há uma mitigação de emissão de gases de efeito estufa de -4,48 kg CO_{2 eq} kg⁻¹ planta para SC3 e -5,59 kg CO_{2 eq} kg⁻¹ planta para SC4. Logo, apesar de haver fatores contribuintes que apresentaram carga positiva de pegada de carbono, no geral, todos os cenários apresentaram economia de pegada de carbono.

Observa-se, entretanto, que a fase de separação e colheita da biomassa tem impacto relevante na emissão de GEE. Na substituição da coagulação química por sedimentação gravitacional, a economia do SC3 é 91% maior do que a economia do SC1, o mesmo valor foi verificado entre os cenários SC2 e SC4. Essa economia é devido à água e os nutrientes como produtos evitados. Ademais, a comparação percentual entre os impactos positivos demonstra que os principais fatores que contribuem para a pegada de carbono são NaOH, equivalente a 73% dos impactos ambientais positivos em SC1 e SC2. Nos cenários SC3 e SC4, a eletricidade foi o fator que mais contribuiu para o aumento da pegada de carbono, representado 50% dos impactos gerados.

Trabalhos anteriores (CASTRO et al., 2020a; SOUZA et al., 2019) demonstram que as etapas de produção de biomassa e aplicação no solo podem ser otimizadas, com isso a pegada de carbono pode ser reduzida. Castro et al. (2020a) investigaram, através de ACV, o potencial de uso de painel fotovoltaico durante a operação da LAT e da secagem natural da biomassa para reduzir os impactos ambientais de um biofertilizante (superfosfato triplo enriquecido com microalgas), que se mostrou mais impactante que o fertilizante convencional. Os autores observaram diminuição significativa no potencial de mudanças climáticas ao realizar essa otimização. Quando se utilizou energia elétrica e secagem em estufa, o impacto relativo às mudanças climáticas foi 75,28% maior para a produção de biofertilizante quando comparado ao superfosfato triplo. Após as otimizações, o impacto para a produção de biofertilizante foi cerca de 15% maior com relação ao superfosfato triplo, conseqüentemente, infere-se que houve diminuição na pegada de carbono.

No geral, os resultados apontam que a pegada de carbono da produção e aplicação da biomassa de microalgas no solo pode ser reduzida substancialmente se ações de mitigação de GEE, como a substituição da coagulação química por sedimentação gravitacional na etapa de colheita da biomassa, forem adotadas. Além disso, outras alternativas podem ser consideradas como a utilização de fontes de energia renovável.

5.3.4. *Categorias de impactos ambientais*

Os impactos ambientais associados a cada categoria são apresentados na Fig. 5.4. Comparando o cenário SC1 a SC3 e o cenário SC2 a SC4, SC3 e SC4 são alternativas menos impactantes ambientalmente. Esse resultado está relacionado à alta quantidade de energia térmica necessária para a concentração de NaOH (ECOINVENT, 2014). Devido a isso, o NaOH foi o principal fator responsável por causar impacto negativo em todas as categorias consideradas. Em contrapartida, todos os cenários apresentaram impacto ambiental negativo quando analisado o processo de cultivo, devido a entrada de produtos evitados, sendo eles água, nitrogênio e fósforo. Como apontado por Ferreira et al. (2020) a adoção de água, nitrogênio e fósforo como produtos evitados ajuda a garantir que o contexto do tratamento de águas residuais, seus benefícios e limitações sejam representados. Com isso, os altos impactos ambientais relativos aos fertilizantes nitrogenados são evitados. Por outro lado, devido à aplicação no solo de solução nutritiva, os impactos ambientais gerados relativos ao P são maiores do que os ganhos desse nutriente como produto evitado no tratamento de efluente. A eficiência do tratamento do efluente não depende da etapa de colheita de biomassa, logo os produtos evitados são iguais quando comparados SC1 e SC3 e quando comparados SC2 e SC4 (Tabela 5.2). Observa-se que se evita mais água, nitrogênio e fósforo para o tratamento relativo ao solo com menor quantidade de matéria orgânica, pois para esse solo é necessário produzir mais biomassa para se obter a mesma eficiência de crescimento da planta quando comparado ao solo com maior teor de matéria orgânica. Ao produzir mais biomassa, é necessário tratar maior volume de efluente, aumentando a quantidade de água, nitrogênio e fósforo como produtos evitados.

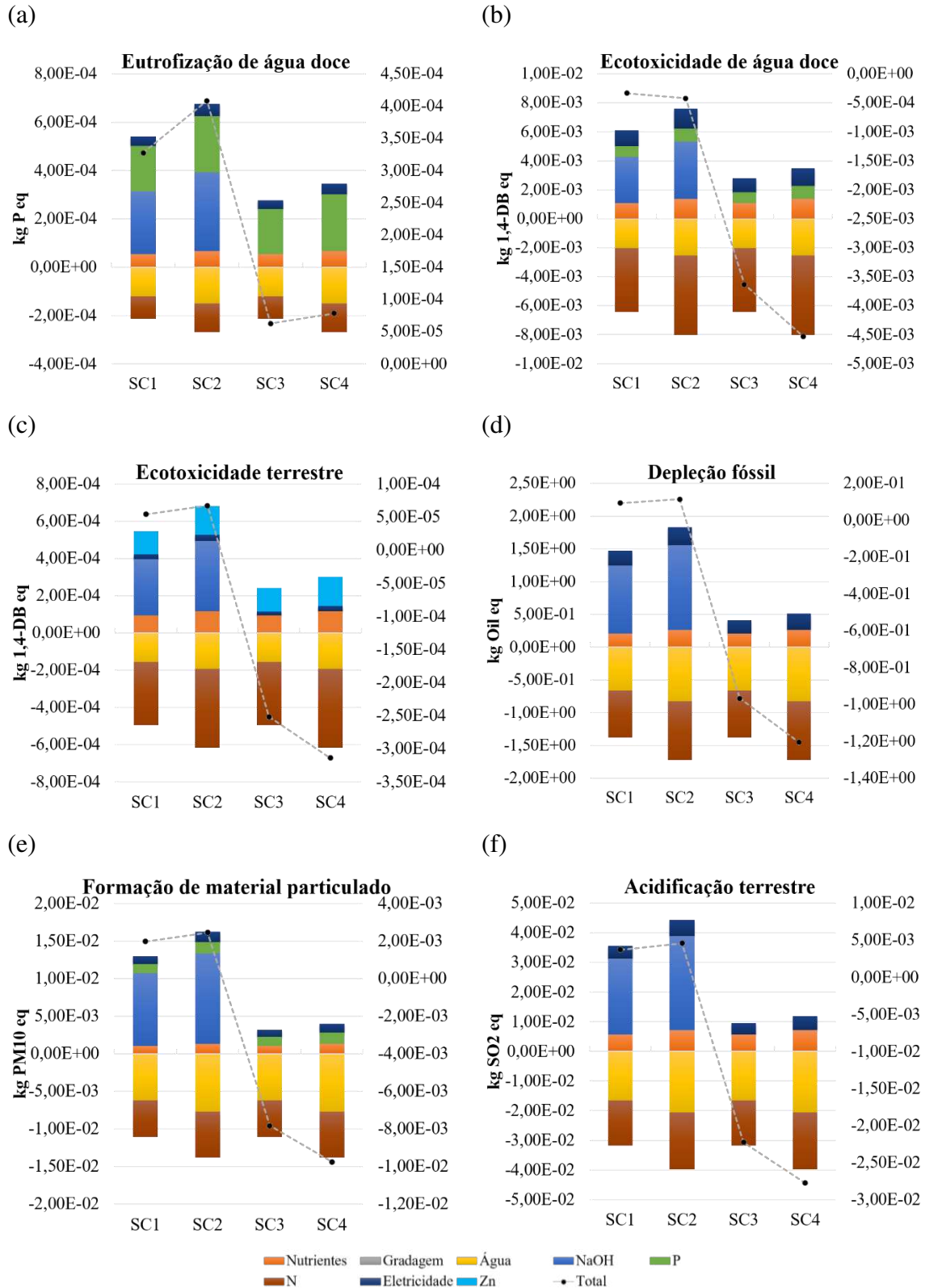


Fig. 5.4. Categorias de impacto para os 4 cenários avaliados: (a) eutrofização de água doce, (b) ecotoxicidade de água doce, (c) ecotoxicidade terrestre, (d) depleção fóssil, (e) formação de material particulado e (f) acidificação terrestre.

Na Tabela 5.3 apresenta-se um resumo percentual dos principais fatores que causaram impactos ambientais positivos. Em geral, em SC1 e SC2 o NaOH contribuiu mais de 50% dos impactos gerados em todas as categorias analisadas. Na ausência de NaOH, expressa em SC3 e SC4, eletricidade surge como principal fator para os impactos relativos a acidificação terrestre e depleção fóssil. O P aparece como principal fator para a eutrofização e ecotoxicidade de água doce e formação de material particulado. Ressalta-se que, apesar de o P ser um dos produtos evitados, junto à água e nitrogênio, também houve aplicação desse nutriente no solo e no balanço entre o que se aplicou no solo e o que foi evitado, o que resultou na geração de impactos associados a esse nutriente. P e Zn são exibidos separadamente por apresentarem impactos mais relevantes em relação ao total de nutrientes aplicados.

Tabela 5.3. Resumo percentual dos principais fatores de impacto para cada categoria

Categoria de impacto	Fator	%			
		SC1	SC2	SC3	SC4
Ecotoxicidade de água doce	NaOH	52	52	0	0
	P	12	12	26	26
Acidificação terrestre	NaOH	72	72	0	0
	Eletricidade	12	12	40	40
Eutrofização de água doce	NaOH	51	51	0	0
	P	35	35	68	68
Formação de material particulado	NaOH	74	74	0	0
	P	9	9	37	37
Ecotoxicidade terrestre	NaOH	55	55	0	0
	Zn	23	23	52	52
Depleção fóssil	NaOH	66	66	0	0
	Eletricidade	14	14	48	48

As contribuições dos processos para as diferentes categorias de impacto são:

5.3.4.1. Eutrofização

A eutrofização ocorre devido à liberação de nutrientes nos corpos d'água. O potencial de eutrofização de água doce é expresso em kg P eq. Nos 4 cenários avaliados (Fig. 5.4a), a principal contribuição para esta categoria foi a liberação de fósforo (P) por possíveis perdas na

aplicação no solo como solução nutritiva (Tabela 5.2). Os cenários SC1 e SC2 apresentaram maiores impactos ambientais, 0,00033 kg P eq e 0,00041 kg P eq, respectivamente, em decorrência da etapa de colheita. Entretanto, observa-se um impacto ligeiramente maior no solo de Horizonte B. Isso se deve ao fato da necessidade de se aplicar maiores doses de solução nutritiva nesse tipo de solo para se obter a mesma produtividade da planta que o solo de Horizonte A.

Herrera et al. (2020) aponta que, ao aplicar a biomassa no solo como bioestimulante, o uso de eletricidade e o descarte de P como resíduo durante as etapas de produção de soluções fosfatadas contribuem para o aumento dos impactos ambientais relativos a eutrofização. De forma geral, todos os cenários apresentaram impacto ambiental positivo, mesmo em SC3 e SC4 em que o impacto total nessa categoria foi 0,000063 kg P eq em SC3 e 0,000078 kg P eq. em SC4. Logo, os resultados mostram o alto potencial de eutrofização ao aplicar soluções fosfatadas no solo.

5.3.4.2. *Ecotoxicidade*

As emissões de equivalentes de 1,4-diclorobenzeno (1,4-DB eq) são usadas como o fator de caracterização da ecotoxicidade em ecossistemas como terrestre e aquático (HUIJBREGTS et al., 2017). Os principais fatores que afetaram a ecotoxicidade em ambos os ecossistemas foram, além da coagulação química para SC1 e SC2, a liberação de nutrientes como o P (Fig. 5.4b e Fig. 5.4c). Ademais na ecotoxicidade terrestre, houve contribuição de Zn para o aumento dos impactos ambientais. Como apontado por Owsianiak et al. (2014) e Sydow et al. (2020), apenas alguns metais, como zinco, cobre e alumínio, são utilizados para representar os metais pesados em metodologias para modelagem de avaliação de ciclo de vida como a utilizada no presente trabalho (Recipe). Logo, os metais pesados provenientes da aplicação das soluções nutritivas (Tabela 5.2) influenciam nesse resultado.

Com relação à ecotoxicidade de água doce, os produtos evitados se sobressaíram, acarretando em impacto ambiental total com valor negativo em todos os cenários. Destaca-se que a fonte nitrogenada evitada foi importante para esse resultado, pois esse nutriente tem grande potencial de impactos desfavoráveis nos ecossistemas terrestre e aquático. Portanto, ao evitá-lo, garante-se a mitigação dos impactos gerados. Embora, os impactos nessa categoria tenham valores negativos em todos os cenários, essa mitigação de impacto foi menos expressiva em SC1 e SC2 em decorrência da etapa de colheita da biomassa (-0,00033 kg 1,4-DB eq e -

0,00042 kg 1,4-DB eq, respectivamente). O cenário SC4 protagoniza o melhor cenário em termos de mitigação de impacto em ecotoxicidade de água doce. Isso se deve à maior geração de produtos evitados quando se trata mais efluente para produzir mais biomassa para que a produtividade de planta no solo de Horizonte B seja igualada ao plantio em solo de Horizonte A. O impacto evitado nessa categoria foi de -0,0045 kg 1,4-DB eq. O cenário SC3 se configura como o segundo melhor cenário nessa categoria de impacto em que se teve um ganho relativo a -0,0036 kg 1,4-DB eq.

5.3.4.3. *Depleção fóssil*

A depleção fóssil, quantificada em kg de óleo eq, é explicada pelo uso de eletricidade proveniente de combustíveis fósseis. De forma geral, os produtos evitados foram importantes para os valores negativos nos cenários SC3 e SC4 (-0,97 kg óleo eq e -1,20 kg de óleo eq, respectivamente) (Fig 5.4d). Isso demonstra a resposta ao baixo consumo de energia elétrica nesses dois cenários.

Herrera et al. (2020) aponta que a principal contribuição para o aumento dos impactos relacionados à depleção fóssil é associada ao uso de energia elétrica e aquecimento. Como discutido anteriormente, a produção de NaOH tem alto consumo de energia térmica, contribuindo para que os cenários SC1 e SC2 apresentassem impacto ambiental com valor positivo, 0,093 kg de óleo eq e 0,11 kg óleo eq, respectivamente.

5.3.4.4. *Formação de material particulado*

A categoria de impacto ambiental relativa à formação de material particulado com diâmetro igual ou inferior a 10 µm (PM10) também demonstra que a etapa de colheita é a que tem maior impacto ambiental quando se realiza a separação com NaOH. Além disso, todos os cenários apresentaram impacto ambiental negativo considerável com relação à água e aos nutrientes como produtos evitados (Fig. 5.4e). Nessa categoria de impacto ambiental, SC1 e SC2 apresentaram impacto ambiental positivo, 0,0020 kg PM10 eq para SC1 e 0,0024 kg PM10 eq para SC2. Em contrapartida, os SC3 e SC4 apresentaram impacto ambiental total negativo, -0,0078 kg PM10 eq e -0,0097 kg de PM10 eq, respectivamente. Estudos anteriores apontam que a contribuição para o aumento do impacto nessa categoria está associado à volatilização do NH₃ no processo de tratamento de efluente e produção de biomassa (ARASHIRO et al., 2018;

SOUZA et al., 2019). Ademais, o processo de produção de NaOH contribui para a emissão para o ar de materiais particulados devido ao consumo de energia térmica.

5.3.4.5. *Acidificação terrestre*

A acidificação terrestre está ligada à deposição atmosférica de sulfatos, nitratos e fosfatos que causam alteração na acidez dos solos (IRVINE et al., 2017). Os valores mais elevados estão associados à etapa de colheita nos cenários SC1 e SC2, 0,0037 kg ácido sulfúrico (SO₂) eq e 0,0046 kg SO₂ eq, respectivamente (Fig. 5.4f). Em contrapartida, a água e os nutrientes enquanto produtos evitados, foram importantes para o balanço líquido na acidificação terrestre. Devido a isso, SC3 e SC4 têm impacto total negativo, -0,022 kg SO₂ eq e -0,028 kg SO₂ eq, respectivamente. Herrera et al. (2020), ao analisar a ACV de aplicação no solo de biomassa de microalgas produzida a partir do tratamento de efluentes, observou que uma fonte de substâncias acidificantes é o uso de eletricidade, ou seja, a queima de combustível e a correspondente produção de óxidos de nitrogênio (NO_x). Portanto, no presente trabalho, atribui-se à eletricidade o principal fator para aumento dos impactos ambientais nessa categoria (Tabela 5.3). Isso se verifica mesmo nos cenários SC1 e SC2 em que o NaOH aparece como a principal fator impactante para a acidificação terrestre, pois, como discutido anteriormente, o principal impacto associado ao NaOH é relativo ao consumo energético.

5.3.5. *Normalização*

As contribuições relativas de cada uma das categorias de impacto para os 4 cenários são mostradas na Fig. 5.5. Esses valores expressam a importância relativa de cada categoria de impacto em um único valor (pontuação única, expressa em Eco-pontos, Pt), para facilitar a comparação dos diferentes estudos de caso (FERREIRA et al., 2020). Em todas as categorias de impacto, os valores normalizados estão entre 1 e -1, ou seja, os impactos foram menores do que os valores de referência. Ainda assim, tais resultados mostram que a eutrofização de água doce é a categoria de impacto mais significativa para todos os cenários considerados. Com relação às demais categorias, mudanças climáticas, representada no presente trabalho como pegada de carbono, e ecotoxicidade de água doce apresentaram impacto negativo em todos os cenários avaliados. Em todas as categorias restantes, os cenários em que se utilizou NaOH apresentaram impacto ambiental positivo e o respectivo cenário em que se utilizou

sedimentação gravitacional resultaram em impactos ambientais negativos. Logo, nessas categorias de impacto, SC3 e SC4 se mostraram as alternativas mais ecologicamente corretas.

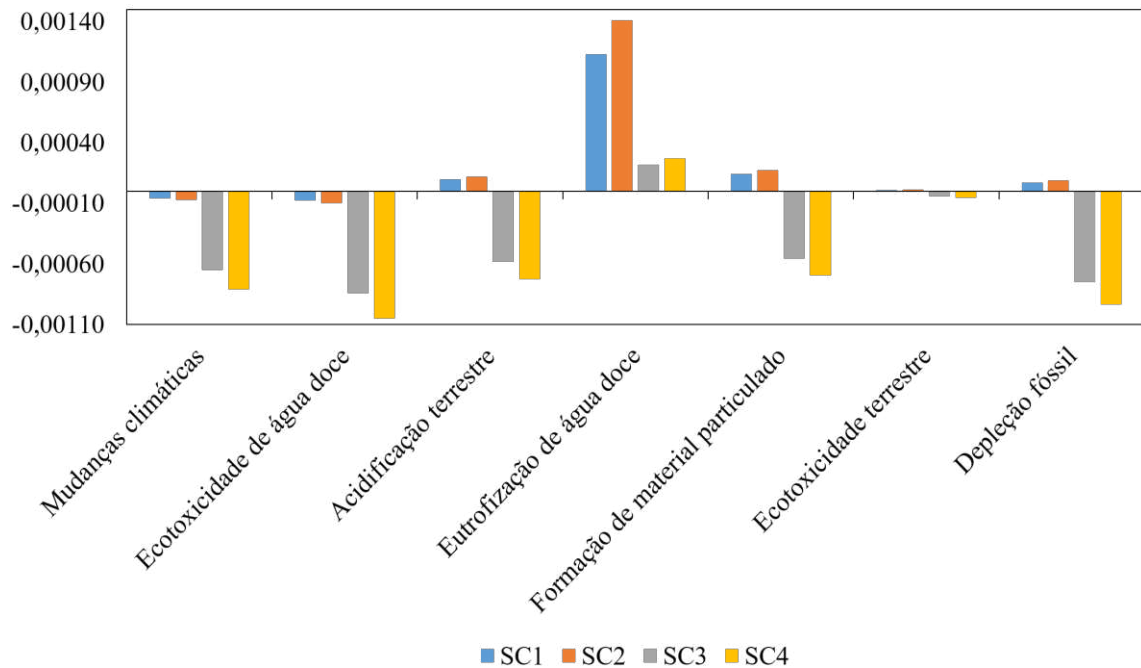


Fig. 5.5. Normalização dos impactos ambientais para os 4 cenários avaliados.

5.3.6. Análise de Incerteza

Na Tabela 5.4 são apresentados os resultados da simulação de Monte Carlo para as categorias de impacto de interesse. As principais incertezas foram observadas para depleção fóssil e mudanças climáticas em SC1 e SC2. Para a primeira categoria de impacto, o coeficiente de variação (CV) foi de 24,26% em SC1 e 18,28% em SC2, para a segunda categoria de impacto, CV foi, respectivamente para SC1 e SC2, 26,44% e 19,72%. De forma geral, houveram mais variações em SC1 e SC2. Nos cenários SC3 e SC4, o CV ficou abaixo de 3% com exceção da eutrofização de água doce que apresentou CV igual a 4,41% e 3,18%, respectivamente, para SC3 e SC4. Infere-se que essa maior incerteza para a eutrofização de água doce está relacionada à perda P das soluções fosfatadas na aplicação de solução nutritiva, pois é o processo mais impactante nessa categoria, aumentado a probabilidade de variações.

Os resultados indicam que as maiores incertezas estão associadas aos cenários com utilização de NaOH. Considerou-se, para a simulação de Monte Carlo, uma variação em torno de 5% do uso desse insumo entre os tratamentos. Nesse contexto, uma pequena variação na

quantidade utilizada desse coagulante, pode acarretar em grandes variações de impacto ambiental, principalmente em relação ao consumo de combustíveis fósseis e à emissão de GEE.

Comparando os cenários do sistema alternativo de separação da biomassa de microalgas, substituindo o NaOH pela decantação gravitacional por meio da simulação de Monte Carlo, é possível afirmar que os cenários SC3 e SC4, em 100% dos casos, têm impactos ambientais menores do que os cenários com coagulação química (SC1 e SC2) em relação a todas as categorias de impacto analisadas (Tabela 5.5).

Tabela 5.4. Resultados da simulação de Monte Carlo para as categorias de impacto diretamente afetadas pelas emissões relacionadas à aplicação de biomassa de microalgas no solo.

		Mudanças climáticas (kg CO ₂ eq)	Ecotoxicidade de água doce (kg 1,4-DB eq)	Acidificação terrestre (kg SO ₂ eq)	Eutrofização de água doce (kg P eq)	Formação de material particulado (kg PM10 eq)	Ecotoxicidade terrestre (kg 1,4-DB eq)	Depleção fóssil (kg óleo eq)
SC1	Média	-0,40384	0,02013	0,00368	0,00120	0,00198	0,00006	0,09070
	Intervalo	-0,59882 – -0,21494	0,01742 – 0,02272	0,00254 – 0,00478	0,00113 – 0,00125	0,00156 – 0,00238	0,00004 – 0,00007	0,04278 – 0,13683
	CV	24,26%	6,82%	15,57%	2,67%	10,63%	15,40%	26,44%
SC2	Média	-0,50231	0,02520	0,00462	0,00149	0,00248	0,00007	0,11390
	Intervalo	-0,67137 – -0,32743	0,02283 – 0,027537	0,00360 – 0,005615	0,00144 – 0,001551	0,00211 – 0,002834	0,00006 – 0,00009	0,07213 – 0,15627
	CV	18,28%	5,06%	11,61%	1,98%	7,90%	11,35%	19,72%
SC3	Média	-4,48112	-0,04505	-0,02225	-0,00043	-0,00782	-0,00025	-0,96530
	Intervalo	-4,62688 – -4,34446	-0,04683 – -0,04343	-0,02305 – -0,02150	-0,00047 – -0,00040	-0,00810 – -0,00757	-0,00027 – -0,00024	-1,00012 – -0,93292
	CV	1,63%	1,97%	1,79%	4,41%	1,79%	2,70%	1,78%
SC4	Média	-5,60681	-0,05640	-0,02784	-0,00054	-0,00979	-0,00032	-1,20779
	Intervalo	-5,73182 – -5,47560	-0,05790 – -0,05486	-0,02853 – -0,02712	-0,00057 – -0,00051	-0,01003 – -0,00955	-0,00033 – -0,00031	-1,23727 – -1,17694
	CV	1,18%	1,42%	1,29%	3,18%	1,29%	1,96%	1,29%

Como apontado por Fortier et al. (2014) os resultados que descrevem a gama de possíveis impactos ambientais são informativos, relacionado às incertezas envolvidas no projeto. Nesse contexto, os resultados das análises de Monte Carlo para os quatro cenários avaliados, sugerem que, a sedimentação gravitacional, por apresentar menos incertezas, deve ser considerada em relação à coagulação química para que a aplicação no solo de biomassa de microalgas resulte em menores valores de pegada de carbono e outros impactos ambientais.

5.4. Conclusão

A principal contribuição deste estudo foi a avaliação dos impactos ambientais da aplicação de biomassa de microalgas produzida a partir do tratamento de efluente da indústria de processamento de carne em solos com diferentes teores de matéria orgânica. Dentre os resultados encontrados, o valor líquido da pegada de carbono dos quatro cenários avaliados foi negativo, mostrando que os produtos evitados no tratamento de efluente da indústria de alimentos é uma forma de mitigação da pegada de carbono. Com isso, apesar de haver fatores contribuintes que apresentaram carga positiva, houve crédito de carbono no balanço final.

Com relação às demais categorias de impacto avaliadas, a coagulação química contribuiu em mais de 50% em relação aos outros processos em todas as categorias. Nos cenários em que se utiliza a sedimentação gravitacional, os maiores valores de impacto ambiental são relativos à eutrofização de água doce, ecotoxicidade terrestre e depleção fóssil. Na eutrofização de água doce, o P proveniente da aplicação de solução nutritiva contribui 68% em relação aos demais processos. Na ecotoxicidade terrestre, o Zn contribui 52% nessa categoria de impacto, representando os metais pesados aplicados nos solos nas soluções nutritivas. Com relação à depleção fóssil, a eletricidade requerida na maioria dos processos contribui 48% para o aumento dos impactos nessa categoria.

Pela análise de Monte Carlo, as principais incertezas observadas no presente estudo são relativas à depleção fóssil e mudanças climáticas nos cenários que utilizam coagulação química. Os resultados indicam que uma variação de 5% no uso de coagulante químico acarreta em incerteza de 24,26% para SC1 e 18,28% para SC2 para a depleção fóssil. Para as mudanças climáticas, a incerteza foi, respectivamente, 26,44% e 19,72%.

Em conclusão, em termos de impacto ambiental, a aplicação no solo de biomassa de microalgas produzida a partir do tratamento de efluente da indústria de alimentos é uma opção sustentável para tratamento de águas residuais associado à produção de um bioestimulante.

Embora este estudo forneça informações do ciclo de vida da aplicação de biomassa em solos com diferentes teores de matéria orgânica, outros estudos devem avaliar outras formas de aplicação e outras formas de colheita da biomassa, considerando que essa etapa foi determinante para os resultados de impactos ambientais.

Referências

- ALBARELLI, J. Q. et al. Comparison of extraction techniques for product diversification in a supercritical water gasification-based sugarcane-wet microalgae biorefinery: Thermoeconomic and environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 201, p. 697–705, 2018.
- AMANN, A. et al. Environmental impacts of phosphorus recovery from municipal wastewater. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 130, n. October 2017, p. 127–139, 2018.
- APHA. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation, 2012.
- ARASHIRO, L. T. et al. Life cycle assessment of high rate algal ponds for wastewater treatment and resource recovery. **Science of the Total Environment**, v. 622–623, p. 1118–1130, 2018.
- ASSEMANY, P. P. et al. Energy recovery in high rate algal pond used for domestic wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 78, n. 1, p. 12–19, 2018.
- ASSIS, L. R. DE et al. Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, v. 274, p. 111183, nov. 2020.
- BATUECAS, E. et al. Life Cycle Assessment of waste disposal from olive oil production: Anaerobic digestion and conventional disposal on soil. **Journal of Environmental Management**, v. 237, n. January, p. 94–102, 2019.
- CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae biofilm in soil: Greenhouse gas emissions, ammonia volatilization and plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 574, p. 1640–1648, 2017.
- CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. **Science of the Total Environment**, v. 724, 2020a.
- CASTRO, J. DE S. et al. Algal biomass from wastewater: soil phosphorus bioavailability and plants productivity. **Science of The Total Environment**, v. 711, p. 135088, abr. 2020b.
- CHERUBINI, E. et al. Life cycle assessment of swine production in Brazil: A comparison of four manure management systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 87, n. C, p. 68–77,

2015.

CHOUDHARY, P. et al. A review of biochemical and thermochemical energy conversion routes of wastewater grown algal biomass. **Science of the Total Environment**, v. 726, n. 271, p. 137961, 2020.

CLABEAUX, R. et al. Assessing the carbon footprint of a university campus using a life cycle assessment approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 273, p. 122600, 2020.

COUTO, E. DE A. DO et al. Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. **Ecological Engineering**, v. 81, p. 140–145, ago. 2015.

COUTO, E.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. Biomass production in high rate ponds and hydrothermal liquefaction: Wastewater treatment and bioenergy integration. **Science of the Total Environment**, v. 724, 2020.

DELRE, A.; TEN HOEVE, M.; SCHEUTZ, C. Site-specific carbon footprints of Scandinavian wastewater treatment plants, using the life cycle assessment approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1001–1014, 2019.

DILEKLI, N.; CAZCARRO, I. Testing the SDG targets on water and sanitation using the world trade model with a waste, wastewater, and recycling framework. **Ecological Economics**, v. 165, n. July, p. 106376, 2019.

ECOINVENT. **Data v3. Copyright Swiss Centre for Life Cycle Inventories**Ecoinvent Professional database, , 2014.

FERREIRA, J. et al. Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 140939, 2020.

FORTIER, M. O. P. et al. Life cycle assessment of bio-jet fuel from hydrothermal liquefaction of microalgae. **Applied Energy**, v. 122, n. July 2011, p. 73–82, 2014.

GOGLIO, P. et al. Advances and challenges of life cycle assessment (LCA) of greenhouse gas removal technologies to fight climate changes. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, 2020.

HERRERA, A. et al. Sustainable production of microalgae in raceways: Nutrients and water management as key factors influencing environmental impacts. **Journal of Cleaner Production**, v. 287, n. xxxx, p. 125005, mar. 2021.

HUIJBREGTS, M. A. J. et al. ReCiPe2016: a harmonised life cycle impact assessment method at midpoint and endpoint level. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 22, n. 2, p. 138–147, 12 fev. 2017.

IPCC. **Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Cambridge, United Kingdom and

New York, NY, USA: Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 2013.

IRVINE, I. C. et al. Terrestrial acidification and ecosystem services: effects of acid rain on bunnies, baseball, and Christmas trees. **Ecosphere**, v. 8, n. 6, 22 jun. 2017.

ISO. **ISO 14040 - Environmental Management-Life Cycle Assessment–Principles and Framework**. [s.l: s.n.].

ISO. **ISO 14044 – Environmental Management-Life Cycle Assessment–Requires and Guidelines**. [s.l: s.n.].

ISO. **ISO 14041 - Environmental Management-Life Cycle Assessment–Goal and Scope Definition and Inventory Analysis**. [s.l: s.n.].

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-IV. The decomposition of fumigated organisms in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 203–208, 1976.

LEE, L. H. et al. Sustainable approach to biotransform industrial sludge into organic fertilizer via vermicomposting: a mini-review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 925–935, abr. 2018.

LI, K. et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121934, nov. 2019.

MARKS, E. A. N. et al. Application of a microalgal slurry to soil stimulates heterotrophic activity and promotes bacterial growth. **Science of the Total Environment**, v. 605–606, p. 610–617, 2017.

MUÑOZ, E. et al. Environmental hotspots in the life cycle of a biochar-soil system. **Journal of Cleaner Production**, v. 158, p. 1–7, 2017.

MURCHIE, E. H.; PINTO, M.; HORTON, P. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. **New Phytologist**, v. 181, n. 3, p. 532–552, 18 fev. 2009.

NASCENTE, A. S.; LI, Y.; CRUSCIOL, C. A. C. Soil Aggregation, Organic Carbon Concentration, and Soil Bulk Density As Affected by Cover Crop Species in a No-Tillage System. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 3, p. 871–879, jun. 2015.

NAUJOKIENĖ, V. et al. Soil biotreatment effectiveness for reducing global warming potential from main polluting tillage operations in life cycle assessment phase. **Science of the Total Environment**, v. 671, p. 805–817, 2019.

NOVAIS, R. .; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA,

- A. J. et al. (Eds.). . **Método de pesquisa em fertilidade de solos**. Brasília-DF: EMBRAPA-SEA, 1991. p. 189–253.
- OLIVARES, J. A. et al. **Wastewater Treatment Residues as Resources for Biorefinery Products and Biofuels**. [s.l.] Elsevier, 2020.
- OWSIANIAK, M. et al. IMPACT 2002+, ReCiPe 2008 and ILCD's recommended practice for characterization modelling in life cycle impact assessment: a case study-based comparison. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 19, n. 5, p. 1007–1021, 8 maio 2014.
- PRÉ. **Various authors. SimaPro database manual – methods library**. Disponível em: <<https://simapro.com/wp-content/uploads/2020/10/DatabaseManualMethods.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- ROCHA, E. O. et al. The Contribution of Conservation Practices in Reducing Runoff, Soil Loss, and Transport of Nutrients at the Watershed Level. **Water Resources Management**, v. 26, n. 13, p. 3831–3852, 2012.
- SCHADE, S.; MEIER, T. A comparative analysis of the environmental impacts of cultivating microalgae in different production systems and climatic zones: A systematic review and meta-analysis. **Algal Research**, v. 40, p. 101485, jun. 2019.
- SCHNEIDER, R. DE C. DE S. et al. Life cycle assessment of microalgae production in a raceway pond with alternative culture media. **Algal Research**, v. 32, p. 280–292, jun. 2018.
- SOARES, R. B.; MARTINS, M. F.; GONÇALVES, R. F. A conceptual scenario for the use of microalgae biomass for microgeneration in wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Management**, v. 252, p. 109639, dez. 2019.
- SOUZA, M. H. B. DE et al. Soil application of microalgae for nitrogen recovery: A life-cycle approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 342–349, 2019.
- SYDOW, M. et al. Influence of metal speciation on soil ecotoxicity impacts in life cycle assessment. **Journal of Environmental Management**, v. 266, p. 110611, jul. 2020.
- TAVARES FILHO, J.; BARBOSA, G. M. DE C.; RIBON, A. A. Physical properties of dystrophic Red Latosol (Oxisol) under different agricultural uses. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 925–933, jun. 2010.
- TORRES, J. L. R. et al. Soil physical attributes and organic matter accumulation under no-tillage systems in the Cerrado. **Soil Research**, v. 57, n. 7, p. 712, 2019.
- WHO; UNICEF. **Progress on household drinking water , sanitation and hygiene (2000-2017) - Special focus on inequalities**. New York: WHO / UNICEF, 2019.

6. CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que a biomassa influencia positivamente, mesmo em solos com baixos teores de MO. Portanto, é um material em potencial para ser aplicado como bioestimulante do solo. Ademais, a aplicação no solo de biomassa de microalgas na forma de mistura proporcionou aumento nos resultados relativos à respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana, atividade das enzimas β -glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e urease. Esses resultados são importantes para entender como o reaproveitamento de bioprodutos, como a biomassa de microalgas, produzida no tratamento de efluente influencia na qualidade do solo. Fornecemos alguns dos primeiros dados relacionados aos efeitos benéficos da aplicação no solo na forma de mistura de biomassa produzida a partir do tratamento de efluente de indústria alimentícia através de atividades enzimáticas, carbono da biomassa microbiana e respiração basal do solo. Esses dados podem servir de base para futuros estudos com outros tipos plantas e outras condições experimentais.

Com relação à avaliação de ciclo de vida do estudo, embora os impactos ambientais da aplicação de biomassa de microalgas sejam menores em solo de Horizonte A, essa prática possibilita a mitigação de impactos quando se aplica em solo de Horizonte B. Além disso, o valor líquido da pegada de carbono dos cenários avaliados foi negativo, mostrando que os produtos evitados no tratamento de efluente da indústria de alimentos é uma forma de mitigação da pegada de carbono. Com isso, apesar de haver fatores contribuintes que apresentaram carga positiva de pegada de carbono, o balanço final foi negativo, ou seja, crédito de carbono. Com relação às demais categorias de impacto, a coagulação química contribuiu em mais de 50% em relação aos outros processos em todas as categorias. Nos cenários em que se utiliza a sedimentação gravitacional, os maiores valores de impacto ambiental são relativos à eutrofização de água doce, ecotoxicidade terrestre e depleção fóssil. Na eutrofização de água doce, o P proveniente da aplicação de solução nutritiva contribui 68% em relação aos demais processos. Pela análise de Monte Carlo, as principais incertezas observadas no presente estudo são relativas à depleção fóssil e mudanças climáticas nos cenários que utilizam coagulação química.

Fornecemos alguns dos primeiros dados relacionados aos efeitos benéficos da aplicação no solo na forma de mistura de biomassa produzida a partir do tratamento de efluente de indústria alimentícia através de atividades enzimáticas, carbono da biomassa microbiana e

respiração basal do solo. Esses dados podem servir de base para futuros estudos com outros tipos plantas e outras condições experimentais. Em termos de impacto ambiental, a aplicação no solo de biomassa de microalgas produzida a partir do tratamento de efluente da indústria de alimentos é uma opção sustentável e econômica para tratamento de águas residuais associado à produção de um bioestimulante. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para otimizar essa forma de aproveitamento, como o realizado nesse presente estudo, em que se avaliou a substituição de coagulação química por sedimentação gravitacional.

REFERÊNCIAS

- AMANN, A. et al. Environmental impacts of phosphorus recovery from municipal wastewater. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 130, n. October 2017, p. 127–139, 2018.
- ARASHIRO, L. T. et al. Life cycle assessment of high rate algal ponds for wastewater treatment and resource recovery. **Science of the Total Environment**, v. 622–623, p. 1118–1130, 2018.
- ASSEMANY, P. P. et al. Energy recovery in high rate algal pond used for domestic wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 78, n. 1, p. 12–19, 2018.
- ASSIS, L. R. DE et al. Evaluation of the performance of different materials to support the attached growth of algal biomass. **Algal Research**, v. 39, n. September 2018, p. 101440, 2019a.
- ASSIS, T. C. DE et al. Using atmospheric emissions as CO₂ source in the cultivation of microalgae: Productivity and economic viability. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 1160–1169, abr. 2019b.
- CARDOSO, E. J. B. N. et al. Soil health: Looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? **Scientia Agricola**, v. 70, n. 4, p. 274–289, 2013.
- CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. **Science of the Total Environment**, v. 724, 2020a.
- CASTRO, J. DE S. et al. Algal biomass from wastewater: soil phosphorus bioavailability and plants productivity. **Science of The Total Environment**, v. 711, p. 135088, abr. 2020b.
- CLABEAUX, R. et al. Assessing the carbon footprint of a university campus using a life cycle assessment approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 273, p. 122600, 2020.
- COUTO, E. A. et al. Hydrothermal liquefaction of biomass produced from domestic sewage treatment in high-rate ponds. **Renewable Energy**, v. 118, p. 644–653, 2018.
- DELRE, A.; TEN HOEVE, M.; SCHEUTZ, C. Site-specific carbon footprints of Scandinavian wastewater treatment plants, using the life cycle assessment approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1001–1014, 2019.
- HERRERA, A. et al. Sustainable production of microalgae in raceways: Nutrients and water management as key factors influencing environmental impacts. **Journal of Cleaner Production**, v. 287, n. xxxx, p. 125005, mar. 2021.
- HUSSAIN, F. et al. Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review. **Renewable and**

Sustainable Energy Reviews, v. 137, n. December 2020, p. 110603, 2021.

MARKS, E. A. N. et al. Application of a microalgal slurry to soil stimulates heterotrophic activity and promotes bacterial growth. **Science of the Total Environment**, v. 605–606, p. 610–617, 2017.

SOUZA, M. H. B. DE et al. Soil application of microalgae for nitrogen recovery: A life-cycle approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 342–349, 2019.

TOUHAMI, D. et al. Long-term atmospheric carbon dioxide enrichment decreases soil phosphorus availability in a grazed temperate pasture. **Geoderma**, v. 378, p. 114621, nov. 2020.

VASCONCELOS, A. C. F. DE; CHAVES, L. H. G. Biostimulants and Their Role in Improving Plant Growth under Abiotic Stresses. In: **Biostimulants in Plant Science**. [s.l.] IntechOpen, 2020.

YAKHIN, O. I. et al. Biostimulants in plant science: A global perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. January, 2017.