

Resumo

A população mundial está continuamente a crescer e a ocupar áreas anteriormente utilizadas para a agricultura, levando assim a uma diminuição da terra arável disponível. De modo a alimentar esta população em contínuo crescimento é imperativo aumentar o rendimento das culturas e o uso de fertilizantes químicos é de forma geral a opção escolhida pelos agricultores. No entanto, o uso destes produtos químicos provoca diversos problemas ambientais (e.g. salinização e contaminação do solo, perda de biodiversidade) e de saúde pública (e.g. contaminação de alimentos com resíduos de fertilizantes). Os biofertilizantes baseados em microrganismos do solo oferecem um meio alternativo, sustentável e de baixo custo, aos fertilizantes químicos potencialmente perigosos e ecologicamente perturbadores. As cianobactérias e microalgas presentes no solo podem ser usadas para aumentar o crescimento das plantas, atenuar o *stress* causado pelo sal e recuperar mais terras para a agricultura.

Este trabalho visa identificar cianobactérias e microalgas nativas portuguesas adequadas para fins de biofertilização em solos nacionais. As espécies de cianobactérias e de microalgas isoladas de solos de diferentes regiões de Portugal, foram identificadas com base em métodos moleculares e caracterização fenotípica e foram avaliadas tendo em conta a sua capacidade de promover o crescimento vegetal, a melhoria nas propriedades do solo e o efeito protetor contra o *stress* causado pelo excesso de sal. Foram recolhidas diversas amostras de solo contendo cianobactérias e microalgas e as diferentes culturas microbianas foram testadas quanto ao seu efeito no crescimento de plantas em ensaios de pequena escala em placas de Petri e os resultados foram confirmados em culturas hidropónicas, utilizando plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) como modelo. Também foram realizados estudos para avaliar o efeito de espécies selecionadas no crescimento das plantas em condições de *stress* salino. Foi ainda avaliado o efeito de diferentes cianobactérias e microalgas isoladas de amostras de solo na fertilidade e estrutura do solo em ensaios laboratoriais de microcosmos. Foi selecionada uma cultura de microalgas capaz de aumentar o peso fresco das plantas em quase 200%, tanto nos ensaios em placa como no sistema de hidroponia. A espécie *Micractinium inermum* parece ser responsável pelo efeito promotor do crescimento, no entanto, mais estudos são necessários para confirmar esses resultados. Uma cianobactéria identificada como pertencente ao género *Oculatella* parece ter um efeito protetor no crescimento das plantas sob *stress* salino. Em relação ao efeito na estrutura do solo, uma amostra de solo enriquecida em algas filamentosas do género *Klebsormidium* foi capaz de melhorar as características físicas, químicas e biológicas da matriz. O presente trabalho é importante para a agricultura portuguesa ao revelar um conjunto de microrganismos nativos do solo com potencial para melhorar a qualidade dos solos, podendo assim ser uma importante ferramenta em práticas de gestão agrícola sustentável de baixo custo e ecologicamente corretas.

Palavras-chave: cianobactérias, microalgas do solo; melhoramento do crescimento vegetal; condicionadores de solo; resistência à salinidade

Abstract

World population is exponentially growing, occupying land once used for agriculture, leading to a decrease of the arable land. In order to continue to feed population it is imperative to increase crop yields and, the use of chemical fertilizers is the present option, nevertheless raising environmental (e.g. salinization, soil contamination and loss of biodiversity) and health problems (e.g. contamination of food with pesticide residues). Biofertilizers based on soil microorganisms offer a sustainable and low cost agricultural alternative mean to the life- threatening and ecologically disturbing chemical compounds. Cyanobacteria and microalgae present on soil can be used to enhance plant growth, attenuate the stress caused by salt and restore more land to agriculture.

This work aims to identify Portuguese native cyanobacteria and microalgae suitable for biofertilization purposes in national soils. Cyanobacteria and microalgae strains isolated from soils from different regions of Portugal were identified based on molecular methods and phenotypic characterization and the plant growth promoter ability, the increment in soil properties and the salt stress protective effect was assessed. Portuguese soil samples containing cyanobacteria and microalgae were collected and tested for their effect on plant growth in a small scale petri dishes based experiment and confirmed in hydroponic cultures using lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). Furthermore, the protective role of the microorganisms on plants under salt stress conditions was pursued. The contribution of different soil cyanobacteria and microalgae to the soil's fertility and structure was evaluated in laboratory microcosm studies. Concerning the plant growth promoter effect, a microalgae soil sample was selected capable of increasing in almost 200% the fresh weight of lettuce plants both on plates and in hydroponic culture. A species, *Micractinium inermum*, seems to be responsible for the growth promoter effect; however more studies are needed to confirm these results. A cyanobacterium identified as belonging to the *Oculatella* genus seemed some ability to have a protective effect on plant growth under saline stress. Regarding the effect on soil structure a soil sample enriched in a filamentous algae of the genus *Klebsormidium* displayed an enhancement in organic matter content, in water retention capacity as well as in the soil metabolic activity. The current work is important for the Portuguese agriculture as it unveiled a set of native soil microorganisms with potential for improving soil fertility and environmental quality in low-cost and eco-friendly sustainable agricultural management practices.

Keywords: cyanobacteria, Soil microalgae; Plant growth promotion; soil conditioners, resistance to salinity

Índice

Resumo	I
Abstract	II
Lista de tabelas	V
Lista de figuras	VI
Lista de abreviaturas e siglas	VIII
Introdução	1
1.1 O crescimento populacional e os desafios atuais para a agricultura	1
1.2. Biofertilizantes numa agricultura sustentável	3
1.3. Crostas biológicas e recuperação de solos degradados	6
Material e métodos	8
2.1. Isolamento e cultivo de cianobactérias e microalgas terrestres	8
2.1.1. Condições de crescimento	8
2.1.2. Isolamento	9
2.1.3. Quantificação de clorofilas das culturas	9
2.2. Determinação do efeito das cianobactérias e microalgas no crescimento das plantas e na sua tolerância à salinidade	10
2.2.1 Ensaio de crescimento em placa.....	10
2.2.2 Ensaio de crescimento em hidroponia	10
2.2.3 Ensaio de tolerância à salinidade em substrato	11
2.2.4 Quantificação de clorofilas do substrato	11
2.3. Avaliação de parâmetros bioquímicos nas plantas	12
2.3.1. Determinação da atividade enzimática da Glutamina Sintetase (GS)	12
2.3.2. Quantificação da Prolina.....	13
2.3.3. Avaliação da peroxidação lipídica	13
2.3.4. Quantificação do conteúdo em clorofilas dos tecidos vegetais.....	14
2.3.5. Determinação do conteúdo total de proteína.....	14
2.3.6. Trocas gasosas e eficiência do fotossistema II.....	14
2.4. Avaliação do papel dos isolados de microrganismos do solo nas propriedades físico-químicas e bioquímicas da matriz	15
2.4.1. Inoculação dos solos	15
2.4.2. Análise de parâmetros físico-químicos do solo	16
2.4.3. Análise de parâmetros bioquímicos do solo.....	17
2.5. Caracterização genética dos isolados das CBS	23
2.5.1. Extração de DNA genómico	23
2.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	23
2.5.3. Eletroforese em gel de agarose	24
2.5.4. Extração, purificação e quantificação dos produtos de PCR e sequenciação	24
2.5.5. Análise filogenética.....	25
2.6. Caracterização morfológica dos isolados das CBS	25
2.6.1. Microscopia ótica (MO)	25
2.6.2. Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)	25
2.7. Análise estatística	26
Resultados e discussão	27

3.1. Rastreio de cianobactérias e microalgas nativas de solos portugueses como potenciadores do crescimento de plantas.....	27
3.2. Verificação do efeito potenciador do crescimento de plantas em hidroponia.....	31
3.3. Isolamento e caracterização da cultura 4.3 selecionada	35
3.4. Avaliação do efeito protetor das cianobactérias e microalgas selecionadas contra o stress salino.....	40
3.5. Avaliação do papel dos isolados de microrganismos do solo nas propriedades físico-químicas e bioquímicas da matriz	47
3.5.1. Parâmetros físico-químicos do solo.....	47
3.5.2 Parâmetros bioquímicos do solo	49
Conclusão	52
Referências Bibliográficas.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1 – Coordenadas e pontos de recolha de amostras de solo.

Tabela 2 - Programa de PCR e respetivas especificidades da reação.

Tabela 3 – Gene/sequência alvo e respetivos oligonucleótidos utilizados para amplificação por PCR.

Tabela 4 – Resultados da ANOVA de uma via efetuada para avaliar o efeito dos isolados nos parâmetros físico-químicos do solo agrícola.

Tabela 5- Resultados da ANOVA de uma via efetuada para avaliar o efeito dos isolados nos parâmetros bioquímicos do solo agrícola.

Lista de figuras

Figura 1 - Observação ao microscópio ótico das diferentes culturas de algas e cianobactérias utilizadas no rastreio de microrganismos potenciadores do crescimento de plantas.

Figura 2 - Peso fresco médio (expresso em percentagem de aumento relativamente ao controlo) +/- desvio padrão das plântulas crescidas em meio suplementado com exsudados das culturas selecionadas.

Figura 3 - Peso seco médio (expresso em percentagem de aumento relativamente ao controlo) +/- desvio padrão das plântulas crescidas em meio suplementado com exsudados das culturas selecionadas.

Figura 4 - Plantas de alface crescidas durante 30 dias em solução de Hoagland em sistema de hidroponia, suplementadas com exsudados da cultura 4.3 ou apenas com meio BG₁₁ (controlo).

Figura 5 - Efeito dos exsudados da amostra 4.3 nas plantas de alface em sistema de hidroponia

Figura 6 - Observações da cultura 4.3 ao microscópio ótico (A e B) e ao microscópio electrónico de transmissão (C)

Figura 7 - Esquema de hibridação dos oligonucleótidos iniciadores à região codificante do gene 18sRNA/ITS e tamanhos previstos dos fragmentos obtidos na amplificação

Figura 8 - Resultados da análise BLAST das várias sequências obtidas por sequenciação utilizando os diferentes oligonucleotideos iniciadores, NS1, 1132r, LR1850 e NS7m para a cultura 4.3.1

Figura 9 - Resultados da análise BLAST das várias sequências obtidas por sequenciação utilizando os diferentes oligonucleotideos iniciadores, NS1, 1132r, LR1850 e NS7m para a cultura 4.3.2.

Figura 10 - Efeito dos exsudados das culturas algais nas plântulas de alface (*L. sativa*)

Figura 11 - Alfaces crescidas em co-cultura com algas e cianobactérias na ausência (0mM) ou presença (100mM) de NaCl – Aspecto final das plantas

Figura 12 - Avaliação do efeito protetor dos isolados selecionados na situação de ausência (0mM) ou presença (100mM) de NaCl - Biometria

Figura 13 - Avaliação do efeito protetor dos isolados selecionados na situação de ausência (0mM) e presença (100mM) de NaCl. – *Stress* e Produtividade

Figura 14 - Avaliação do efeito protetor dos isolados selecionados na situação de ausência (0mM) e presença (100mM) de NaCl - Fotossíntese

Figura 15 - Solo inoculado com espécies selecionadas

Figura 16 – Variação média das propriedades físico-químicas do solo agrícola nos controlos (à luz e com obscuridade) e nos tratamentos com os três isolados de microrganismos do solo estudados

Figura 17 - Valores médios de atividade enzimática do solo nos controlos à luz e na obscuridade e diferentes tratamentos com inóculos

Lista de abreviaturas e siglas

BSA - sêrum de albumina de bovino

CBS – Crostas biológicas do solo

CCE – Comissão das Comunidades Europeias

Ci - Concentração intercelular de CO₂

DTT – Ditiotreitól

E - Taxa de transpiração

FAO – Food and agriculture Organization of the United Nations

gs - Condutância estomática

MDA - malondialdeído

PN - Taxa fotossintética líquida

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

TBA - ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloacético

TTC -Cloro de 2,3,5- trifeniltetrazólio

ΦPSII – Eficiência do fotossistema II

Introdução

1.1 O crescimento populacional e os desafios atuais para a agricultura

A população mundial tem crescido exponencialmente nos últimos séculos, tendo aumentado 400% durante o século XX, passando de 1,5 para mais de 6 mil milhões de pessoas. Apesar de um ligeiro abrandamento no início do século, estima-se que continue a aumentar atingindo um total de 11 mil milhões de pessoas no final do século XXI (Gerland *et al.*, 2014). De forma a suprir as necessidades alimentares da população em constante crescimento, a produção agrícola terá de aumentar cerca de 70 %. No caso concreto dos cereais, isso significará um aumento de 0,9 milhões de toneladas por ano, passando da atual produção de 2,1 milhões de toneladas para 3 milhões de toneladas (FAO, 2009). Apenas uma pequena parte do aumento de produção necessária para alimentar a população no futuro resultará da expansão da área arável. A maioria desse aumento será conseguida através do aumento da produtividade e da intensidade da produção. No passado, a “Revolução Verde” evitou um período de fome, anteriormente previsto, através do aparecimento de variedades modernas com elevado desempenho agrícola e associadas à utilização de fitofármacos. Contudo, e apesar do sucesso inicial, o investimento na agricultura sofreu um enorme corte no início do milénio (Herdt, 2010). Assim, torna-se mais difícil promover ganhos na produtividade, em virtude das adaptações que agora serão necessárias para fazer face às alterações climáticas (Pingali, 2012).

Nas últimas décadas, tem-se verificado um declínio da produção das principais culturas, causado pelo aumento de temperatura, imprevisibilidade da precipitação e aumento da concentração de CO₂ na atmosfera (Karl *et al.*, 2009). A temperatura ideal de crescimento e respostas a diferentes temperaturas varia conforme a espécie e o seu ciclo de vida. A exposição a temperaturas ligeiramente mais elevadas favorece um desenvolvimento mais rápido tendo, no entanto, um impacto negativo devido ao encurtamento do ciclo de vida. A fase reprodutiva é a mais suscetível a temperaturas elevadas pois estas podem comprometer a viabilidade do pólen, a fertilização e a formação de frutos e sementes, provocando um enorme impacto negativo na produção (Schlenker e Roberts, 2009). A precipitação excessiva, durante a sementeira de primavera, pode também por em risco a produtividade e rendimento das culturas (Rosenzweig *et al.*, 2002). O excesso de precipitação nos estados de desenvolvimento mais precoces, pode causar problemas como aumento da suscetibilidade das raízes a

doenças, compactação do solo (devido à circulação dos veículos agrícolas sobre o solo húmido) e lixiviação de nutrientes e fitofármacos para zonas mais profundas do solo podendo atingir as águas subterrâneas. Alterações na distribuição das chuvas, nomeadamente na sua frequência e concentração em determinado período do ano, pode levar a problemas relacionados com escassez de água (Hatfield e Prueger, 2004). A queda de chuvas fortes, associadas a tempestades e ventos fortes, pode por em causa a instalação da cultura. Na produção agrícola, a radiação solar é também uma variável importantíssima, uma vez que vários estudos indicam que a produtividade pode diminuir devido ao vapor de água e ao aparecimento de nuvens que diminuem a incidência de radiação solar (Stanhill e Cohen, 2001).

O dióxido de carbono presente na atmosfera resulta de diversas atividades humanas e, nos últimos 50 anos os níveis de dióxido de carbono têm aumentado de forma significativa e é esperado que continuem a aumentar (Karl *et al.*, 2009). Com o aumento do CO₂, verifica-se um aumento do crescimento das plantas, no entanto, as espécies vegetais com um ciclo de fixação de carbono C₄, não apresentam um acréscimo tão elevado tal como as que possuem o ciclo C₃ (Karl *et al.*, 2009). Com estas condicionantes, o verdadeiro desafio atual na agricultura é, reverter o declínio da produção e voltar a atingir os níveis de produtividade registados no início da “Revolução Verde”. Assim sendo, o investimento em investigação e desenvolvimento em agronomia é muito importante e trará retornos na ordem dos 30 a 70% do capital investido, sendo, no entanto, ainda negligenciado nos países emergentes (FAO, 2009).

A agricultura, para além do propósito da produção de alimentos, para alimentação humana e animal, produz também outros produtos de interesse como por exemplo óleos e fibras, também com um grande impacto na economia (Pretty *et al.*, 2001). Atualmente, a necessidade de produtos agrícolas está a aumentar rapidamente tal como os impactos ecológicos causados pela agricultura (Tilman *et al.*, 2011). Um dos problemas fundamentais da produção agrícola atual é a degradação dos solos. O aumento da população durante o século passado, provocou um aumento do risco da degradação do solo (Richards, 1991). A degradação é causada por diversas atividades humanas como más práticas agrícolas, atividades industriais e crescimento de áreas urbanas. Estas atividades resultam num impacto negativo no solo, causando a perda de fertilidade, a libertação de carbono para a atmosfera, e a perda da biodiversidade. Estas atividades interrompem também os ciclos biogeoquímicos dos nutrientes, bem como reduzem a capacidade natural de mineralização da matéria orgânica e de degradação de contaminantes (CCE, 2006). A erosão do solo, é um processo natural que molda as

paisagens e que em certos casos, pode ajudar a tornar os solos férteis, no entanto, com a influência humana, este processo tem sido acelerado causando impactos severos no ambiente. Assim, a erosão do solo, torna-se outra consequência grave da produção agrícola atual (Lal, 2001).

A agricultura tem também um impacto enorme a nível ambiental, ao ameaçar a biodiversidade (Dirzo e Raven, 2003), ao libertar cerca de um quarto dos gases responsáveis pelo efeito estufa (Burney *et al.*, 2010) e ao por também em risco os ecossistemas aquáticos através do uso excessivo de fertilizantes e pesticidas (Vitousek *et al.*, 1997).

Ao optar por práticas agrícolas mais sustentáveis, espera-se tornar possível a satisfação da crescente necessidade de alimento sem comprometer o ambiente (Mason, 2004). Essa filosofia torna também os agrossistemas mais resilientes e auto-reguláveis mantendo assim, a produtividade e os lucros (Singh *et al.*, 2016). O uso de biofertilizantes com a utilização de microrganismos vivos, usados para melhorar as características físico-químicas do solo, é uma estratégia que pode contribuir para uma agricultura mais sustentável.

1.2. Biofertilizantes numa agricultura sustentável

A diversidade de microrganismos existente nos solos é enorme. Estima-se que existam dezenas de milhares de espécies de microrganismos capazes de interagirem com as plantas. As relações entre os microrganismos e as raízes das plantas são cruciais para a saúde das plantas (Berendsen *et al.*, 2012) e o uso de espécies nativas de microrganismos parece ser uma alternativa ao uso tradicional de fertilizantes químicos (Vaishampayan *et al.*, 2002; Choudhury e Kennedy, 2004). Os biofertilizantes à base de microrganismos contêm apenas extratos ou substâncias resultantes do metabolismo dos microrganismos, ou ainda células vivas ou latentes capazes de colonizar a rizosfera das plantas, aumentar a disponibilidade de nutrientes e ainda de estimular o crescimento das plantas (Bhardwaj *et al.*, 2014). Os biofertilizantes são um complemento a outras práticas agrícolas que visam restabelecer a fertilidade do solo, controlar pragas e aumentar a produção agrícola (Sahoo *et al.*, 2013). Os microrganismos capazes de fixar azoto e solubilizar fosfatos são os mais utilizados como biofertilizantes (Mohammadi e Sohrabi, 2012). Alguns microrganismos do solo como *Rhizobacteria*, fungos capazes de estabelecer micorrizas, e outras bactérias fixadoras de azoto, têm-se mostrado eficazes como biofertilizantes. Os fungos micorrízicos são considerados biofertilizantes porque fornecem às plantas água,

nutrientes e proteção contra agentes patogénicos (Berruti *et al.*, 2016). As estirpes de *Rhizobium*, que formam nódulos radiculares em leguminosas, fixam o azoto atmosférico promovendo o crescimento das plantas e a absorção de nutrientes (Flores-Félix *et al.*, 2013). O uso de *Anabaena* também é conhecido, em particular nos campos de arroz, onde a *Azolla* (uma pteridófita capaz de simbiose com cianobactérias fixadoras de N₂) é incorporada ao solo para servir como fonte de azoto para o arroz (Bocchi e Malgioglio, 2010). Além de *Anabaena*, existem outras cianobactérias que mostram efeitos similares, podendo ser utilizadas como fertilizantes (Choudhury e Kennedy, 2004).

As substâncias promotoras do crescimento e as vitaminas libertadas pelas algas, aumentam o crescimento das raízes e a produtividade das plantas de arroz (Bhardwaj *et al.*, 2014). Estudos realizados em alface, mostraram que o tratamento com a alga *Chlorella vulgaris*, favorece o crescimento das plantas e o aumento do peso fresco e seco das plântulas, mas associado a uma redução de hidratos de carbono solúveis, proteínas solúveis e de aminoácidos livres (Faheed, 2008). A aplicação desta mesma alga em campos de milho e trigo aumenta o número total de bactérias presentes na rizosfera, e a sua aplicação na cultura do feijão, pode aumentar a quantidade de fungos na rizosfera (Jafari *et al.*, 2016). Os polissacarídeos resultantes do metabolismo das microalgas, são capazes de estimular o crescimento das plantas, sugerindo-se que estes possam ser utilizados como bioestimulantes.

As cianobactérias são um grupo morfológica e filogeneticamente diverso de organismos foto-autotróficos, com baixos requisitos nutricionais, capazes de colonizar uma ampla gama de diversos ambientes, incluindo vários habitats extremos. A contribuição das cianobactérias para manter a fertilidade do solo, melhorar o crescimento das plantas e o rendimento das culturas tem sido bastante estudada nas culturas de arroz. O arroz é uma das culturas fundamentais para alimentar a população. Segundo a FAO, anualmente são produzidas $7,6 \times 10^7$ toneladas de arroz (FAO, 2018) tradicionalmente em campos alagados. Esta prática, tem um efeito adverso sobre o ecossistema, levando a uma enorme perda de água por percolação e impactos negativos sobre o crescimento das colheitas seguintes. Nos países do sudeste asiático, já se isolaram diversas estirpes de cianobactérias fixadoras de azoto para serem utilizadas como biofertilizante. As cianobactérias predominantes nos campos de arroz são fixadoras de azoto, o que permite compreender que o arroz seja cultivado de forma ininterrupta sem a adição de fertilizantes (Watanabe *et al.*, 1977a; Watanabe *et al.*, 1977b). Nos campos de arroz, as cianobactérias estão pouco representadas, contudo podem contribuir com cerca de 20 a 30 kg N /ha/estação. De todo o azoto fixado, apenas 2 a 10% fica imediatamente disponível para a cultura. O restante é libertado durante o

processo de mineralização da matéria orgânica. Na cultura do arroz, a inoculação com cianobactérias proporciona um acréscimo de rendimento na ordem dos 5 a 25% além de que também melhora a estrutura do solo e da interface solo-água (Prasanna *et al.*, 2013).

O trigo é outra cultura importante para a alimentação mundial. Para o cultivo das cultivares modernas são necessárias altas doses de fertilizantes. Analogamente ao caso do arroz, na cultura de trigo, também já se realizaram estudos sobre a utilização de cianobactérias como biofertilizantes. O resultado da aplicação de um concentrado de culturas de cianobactérias, previamente isoladas da rizosfera de trigo (var. HD 2687), incluindo espécies como *Calothrix ghosei*, *Westiellopsis* sp., *Hapalosiphon intricatus* e *Nostoc* sp., demonstraram que as cianobactérias contribuíram para aumentar a taxa de germinação das sementes de trigo e promover o crescimento da radícula e dos coleóptilos. Numa análise de cromatografia em camada fina desse mesmo filtrado verificou-se a existência de diversos aminoácidos e compostos semelhantes a auxinas (Karthikeyan *et al.*, 2009), substâncias capazes de promover o crescimento das plantas. Diversas outras espécies vegetais com importância agrícola, tais como beterraba sacarina, alface e tomate, demonstram beneficiar de um co-cultivo com estirpes de cianobactérias isoladas do solo, através do aumento da produtividade ou do crescimento (Jafari e Đurić, 2003; Faheed, 2008; Oancea *et al.*, 2013; Barone *et al.*, 2017). As plantas que crescem em co-cultura com cianobactérias, também demonstraram produzir mais clorofila (Karthikeyan *et al.*, 2009).

A utilização de biofertilizantes promove uma reciclagem de nutrientes para as plantas de uma forma sustentável. A formulação dos biofertilizantes existentes é diversificada e de uma forma geral contém misturas de diferentes organismos capazes de mobilizarem nutrientes do solo, metabolizá-los através de processos biológicos, de modo a que possam ser utilizados pelas plantas e favorecer o reaparecimento da microflora e melhorar a estrutura e condição geral do solo (Ismail *et al.*, 2014). Assim, os biofertilizantes podem ser uma alternativa aos fertilizantes de síntese química, utilizados atualmente, mas com a vantagem de um menor impacto ambiental.

1.3. Crostas biológicas e recuperação de solos degradados

As cianobactérias, algas e outros microrganismos do solo conseguem crescer e desenvolver-se na camada mais superficial da matriz, fazendo com que se estabeleça uma íntima associação entre as partículas do solo e os organismos, constituindo-se uma matriz polimérica essencial ao estabelecimento de uma comunidade alargada e formando-se assim as chamadas Crostas Biológicas do Solo (CBS) (Belnap *et al.*, 2001). As CBS realizam diferentes funções, como contribuírem para a redução da erosão do solo, para o aumento da capacidade de retenção da água e de nutrientes, para acelerar a emergência de plântulas e para a criação das bases para a sucessão ecológica (Lababpour, 2016). Alguns estudos mostram que processos biológicos como a germinação, emergência e sobrevivência das plantas vasculares, são afetados positivamente pela presença das CBS (Belnap *et al.*, 2001). A presença de CBS altera a microtopografia do solo retendo sementes, partículas finas e de matéria orgânica transportadas pelo vento e ou pela água (Harper, 1977; Harper e St. Clair, 1985; Eckert *et al.*, 1986). A fração silte/argila, também sofre alterações com a presença de CBS quando comparada com os solos no seu redor sem estas estruturas. As partículas finas do solo, quando molhados, aderem à bainha mucilaginosa formada pelos microrganismos (Belnap e Gardner, 1993; Verrecchia *et al.*, 1995) dando origem a agregados e reduzindo a erosão. Estas mesmas partículas finas retêm ainda macronutrientes necessários para as plantas, aumentando assim a fertilidade do solo (Black, 1968). Assim, no caso de solos de desertos ou áridos, o desenvolvimento das CBS promove o aparecimento e desenvolvimento de diferentes plantas superiores, levando à estabilização das dunas (Liu *et al.*, 2008). Os microrganismos existentes no solo, podem também produzir hormonas e outros compostos capazes de estimular o crescimento das plantas (Sergeeva *et al.*, 2002; Prasanna *et al.*, 2010) e alguns fixam azoto atmosférico contribuindo para a nutrição das plantas, tal como foi já descrito na secção anterior (Choudhury e Kennedy, 2004; Osman *et al.*, 2010). Estudos em campo aberto (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2013; Lan *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017; Zaady *et al.*, 2017), e outros em ambientes controlados (Maqubela *et al.*, 2009; Mugnai *et al.*, 2018), mostraram resultados positivos, em paralelo para a estabilidade e a fertilidade do solo, desempenhando assim as CBS funções fundamentais nos ecossistemas (Maestre *et al.*, 2011) afetando processos como disponibilidade de água (Colica *et al.*, 2014; Chamizo *et al.*, 2016), estabilidade do solo e ciclo de nutrientes (Rodríguez-Caballero *et al.*, 2012).

Em solos com elevada pressão química, a membrana das células microbianas é alterada pelos exopolissacarídeos libertados, criando um mosaico entre lípidos, proteínas e hidratos de carbono, criando diversos locais de ligação de metais com diferentes afinidades (Greene e Darnall 1990), reduzindo a disponibilidade de espécies químicas, eletricamente carregadas e potencialmente tóxicas, enquanto, os nutrientes necessários para o crescimento permanecem disponíveis (Lange, 1976; Geesey e Jang 1990). A presença de microrganismos pode também atenuar o *stress* provocado pelo sal (Singh *et al.*, 2016). Estudos demonstram que parte dos efeitos benéficos, resultam também da excreção de substâncias poliméricas extracelulares de elevado peso molecular (Hu *et al.*, 2002). As cianobactérias como produtores primários com baixos requisitos nutricionais, são espécies pioneiras na formação das CBS (Sharma *et al.*, 2011). No solo são uma parte substancial da microflora existente em diferentes agroecossistemas (Prasanna *et al.*, 2008) e são capazes de produzir fito-hormonas como ácido abscísico (ABA), citocinina (CK), etileno (ET) e giberelinas (GAs) (Lu e Xu, 2015), mas também proteínas, vitaminas, hidratos de carbono e aminoácidos, auxiliando nas interações da planta com o ambiente circundante (Mandal *et al.*, 1999; Singh, 2014).

Grande parte dos estudos efetuados sobre o uso de microrganismos autotróficos para melhoramento das propriedades do solo, tem como objeto de estudo as cianobactérias, no entanto, os efeitos benéficos de microalgas também já foram reconhecidos, mas ainda pouco explorados (Ördög *et al.*, 2004; Pulz e Gross, 2004; Odjadjare *et al.*, 2015). Verificou-se que estes organismos possibilitam a recuperação de nutrientes do solo, melhorias na estrutura da matriz e substâncias por si produzidas são também capazes de promover o crescimento da planta (Bond e Harris, 1964).

Tendo por base a contextualização teórica efetuada, o presente trabalho teve como objetivos: i) isolar e identificar cianobactérias e microalgas nativas de solos portugueses; ii) testar o potencial dos isolados como biofertilizantes e/ou na reabilitação de solos degradados e ainda iii) avaliar o potencial destes microrganismos para aliviar as respostas ao *stress* salino de plantas, utilizando a espécie *Lactuca sativa*, como modelo.

Material e métodos

2.1. Isolamento e cultivo de cianobactérias e microalgas terrestres

2.1.1. Condições de crescimento

As amostras de CBS para isolamento de cianobactérias e microalgas foram recolhidas em diferentes pontos do país e anotadas as coordenadas dos respetivos pontos de recolha (Tabela 1). À uma lupa binocular foram selecionadas algumas porções dos solos recolhidos para o efeito, assim como das crostas (cerca de 100-200 mg), que apresentavam cor verde, e colocadas a crescer em matrizes estéreis, com 20 mL de meio de crescimento BG₁₁ contendo 1,5 g L⁻¹ de NaNO₃ (Rippka *et al.*, 1988). Este meio é indicado para crescimento de microrganismos fotoautotróficos, e a cultura foi incubada à temperatura ambiente, com 16 h de luz (40 μmol fotões m² s⁻¹) / 8h obscuridade, e com uma agitação orbital de 100 rpm. A cada dois meses, as culturas foram repicadas.

Tabela 1 – Coordenadas e pontos de recolha de amostras de solo.

Amostras	Coordenadas de recolha	Locais de Recolha
1	40°26'37.15"N 8°26'33.03"W	Anadia
2	40°26'37.15"N 8°26'33.03"W	Anadia
3	40°26'37.15"N 8°26'33.03"W	Anadia
4	40°26'37.15"N 8°26'33.03"W	Anadia
5	40°26'37.15"N 8°26'33.03"W	Anadia
6	40°26'37.15"N 8°26'33.03"W	Anadia
7	40°26'37.15"N 8°26'33.03"W	Anadia
8	37°12'89 N, 8°33'10 W	Algarve
9	41°25'99.01" N; 8°40'16.55" W	Paços de Ferreira
10	41°25'99.01" N; 8°40'16.55" W	Paços de Ferreira
11	41°26'01.22" N; 8°40'31.04" W	Paços de Ferreira
12	41°26'01.22" N; 8°40'31.04" W	Paços de Ferreira
13	39°62'78.35" N, 8.67'72.56" W	Leiria
14	39°62'78.35" N, 8.67'72.56" W	Leiria

2.1.2. Isolamento

Para o isolamento das diferentes espécies presentes nas amostras recolhidas, foram feitos plaqueamentos e diluições sucessivas, seleção de colónias a partir de riscados, seguidas de transferência para novo meio líquido ou sólido (Temraleeva et., 2016). Para o plaqueamento de sub-amostras, maioritariamente constituídas por espécies unicelulares, foram retirados para um microtubo estéril, 10 μ L da cultura aos quais se adicionou 1 mL meio BG₁₁, de modo a obter-se uma diluição 1:100, que foi posteriormente agitada manualmente. De seguida, o conteúdo de cada microtubo foi vertido para uma placa de Petri com meio BG₁₁ sólido (com Agar agar BAC Labkem a 1,5%) e espalhado por toda a placa com o auxílio de um espalhador. Após 2-3 semanas, registou-se o aparecimento de pequenas colónias com formas e tipos de crescimentos diferentes. Essas colónias foram retiradas com um palito estéril, colocadas numa lâmina, previamente limpa com álcool e observadas ao microscópio ótico. As colónias com morfologia distinta foram colocadas isoladamente a crescer num matraz com 20 mL de meio BG₁₁ líquido nas condições de agitação orbital, luz e fotoperíodo referidas anteriormente. Para o inóculo constituído por espécies filamentosas, o procedimento foi semelhante, mas em alternativa à diluição, uma pequena parte dos filamentos foi espalhada em meio sólido de forma a permitir a formação de novas colónias.

2.1.3. Quantificação de clorofilas das culturas

Para se ter uma perceção, ainda que indireta, da densidade celular das culturas, foi determinado o conteúdo em clorofilas segundo o método de Meeks e Castenholz, (1971) com adaptações. Para o efeito centrifugou-se 1,5 mL de cada cultura a 14 549 g, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e substituído por 1 mL de água desionizada estéril. Efetuou-se uma nova centrifugação a 14 549 g, durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foram novamente adicionados 100 μ L de água desionizada estéril. Agitou-se no vortéx e foram adicionados 900 μ L de metanol para uma concentração final de 90% v/v. O tubo foi novamente agitado no vortéx e incubado no escuro durante 1 h, com agitações no vortéx a cada 15 minutos. Após o período de incubação, procedeu-se a uma centrifugação a 14 549 g, durante 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido. Para a quantificação de clorofila *a*, foi utilizado um espectrofotómetro e foi feita a leitura da absorvância a 663 nm, utilizando metanol a 90% como branco. A concentração de clorofilas em μ g/mL foi calculada com base na equação 1.

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 12,7 \times \text{Abs. } 663$$

Equação 1

2.2. Determinação do efeito das cianobactérias e microalgas no crescimento das plantas e na sua tolerância à salinidade

2.2.1 Ensaio de crescimento em placa

Sementes de *Lactuca sativa* (variedade maravilha das 4 estações, Vita, Vilmin Jardin, França) foram esterilizadas através de um banho em lixívia a 10% durante 5 minutos e depois lavadas 2 vezes em água desionizada estéril. Após a esterilização, 20 sementes foram colocadas em placas de Petri estéreis contendo solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) sólido com 1,5 % de agar (Agar agar BAC Labkem) suplementadas com 3 mL do sobrenadante resultante da centrifugação do meio das culturas com cerca de 1 mês. Após centrifugação (5 minutos a 16 873 g). Nas placas controlo a solução de Hoagland foi suplementado com 3 mL de meio BG₁₁. As placas foram colocadas na vertical e após 15 dias foram avaliados os parâmetros biométricos nas plântulas, nomeadamente comprimento da parte aérea e da raiz, o peso fresco e posteriormente o peso seco após secagem a 60 °C, durante uma semana. Em cada um dos três ensaios independentes (réplicas biológicas) foram preparadas três placas em cada tratamento.

2.2.2 Ensaio de crescimento em hidroponia

Sementes de *Lactuca sativa* (variedade maravilha das 4 estações, Vita, Vilmin Jardin, França) foram desinfetadas superficialmente com lixívia a 10%, durante 5 minutos, lavadas com água desionizada esterilizada e colocadas a germinar em tabuleiros revestidos com papel humedecido, igualmente com água desionizada esterilizada. Ao fim de 8 dias as plântulas mais vigorosas foram colocadas em suspensão em placas de espuma com pequenas aberturas (cerca de 20 plantas por placa) e as placas colocadas em tabuleiros com 750 mL de solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) a meia força durante um período de 30 dias com um fotoperíodo de 16 h de luz (50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): 8 h obscuridade, à temperatura de 24 °C, com arejamento contínuo. O meio de crescimento das plantas foi suplementado com 250 mL de meio de cultura das microalgas/cianobactérias terrestres (centrifugado

a 8 609 g, durante 20 minutos) e extraído duas vezes durante o período de crescimento dos isolados. O controlo foi suplementado com 250 mL de meio BG₁₁. No final, as plantas foram medidas, pesadas e congeladas a -80 °C para posterior análise bioquímica. A experiência foi repetida em três ensaios independentes (réplicas biológicas).

2.2.3 Ensaio de tolerância à salinidade em substrato

Uma mistura esterilizada de perlite e vermiculite numa proporção de 1:2 foi colocada em tabuleiros com volume de 6 L e inoculada com 100 mL de cada uma das culturas de microalgas/cianobactérias selecionadas e regada com 250 mL de meio BG₁₁. Os tabuleiros foram cobertos com filme transparente perfurado, e a cada 8 dias a mistura foi regada com 250 mL de meio BG₁₁ e revolvida de modo a permitir que os microrganismos colonizassem todo o volume de substrato. Os tabuleiros foram mantidos num fotoperíodo de 16 h de luz (50 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$): 8 h de obscuridade, à temperatura ambiente.

Ao fim de 30 dias de crescimento dos isolados, a mistura de perlite e vermiculite dos tabuleiros foi homogeneizada e dividida por vasos de 400 mL de volume e em cada vaso foram colocadas 10 sementes de *L. sativa* (variedade maravilha das 4 estações, Vita, Vilmin Jardin, França) a germinar e regadas uma vez com 100 mL água desionizada. Após oito dias, vaso foi regado com 100 mL de solução de Hoagland. Após este período e durante 30 dias, os vasos foram regados sempre que necessário com dotações de 100 mL da solução de Hoagland ou da solução de Hoagland suplementada com 100 mM NaCl, respetivamente. Ao fim dos 30 dias as plantas foram retiradas dos vasos, medidas, pesadas e congeladas a -80 °C para posterior análise bioquímica. O ensaio foi repetido 3 vezes (réplicas biológicas).

2.2.4 Quantificação de clorofilas do substrato

Para quantificação das clorofilas dos microrganismos presentes nos substratos inoculados, dos diferentes tratamentos (ver secção 2.2.3), foram pesadas 2 g de substrato (perlite/vermiculite) para um tubo de Falcon de 50 mL. A cada tubo foi adicionado metanol até submergir o substrato (aproximadamente 5 mL por cada grama de substrato), agitou-se a suspensão no vortéx e colocou-se no escuro, à temperatura ambiente, em agitação orbital a uma velocidade de 150 rpm. Os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 1 537 g, durante 20 minutos. De seguida, o

sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL e estes foram novamente centrifugados durante 5 minutos a 16 873 g. A absorvância do sobrenadante foi medida a um comprimento de onda de 663 nm. A concentração de clorofila a $\mu\text{g/mL}$ foi obtida usando a equação 1 e convertida em $\mu\text{g/g}$ de substrato. A determinação foi feita em triplicado para cada tratamento.

2.3. Avaliação de parâmetros bioquímicos nas plantas

2.3.1. Determinação da atividade enzimática da Glutamina Sintetase (GS)

O método utilizado é baseado em Cullimore e Sims (1980) para determinação da atividade de transferase da GS através da medição da formação de glutamilhidroxamato a partir de glutamina e de hidroxilamina. Foram preparados 3 extratos vegetais de cada tratamento de crescimento em substrato. Cada extrato foi preparado a partir de 0,4 g de tecido congelado, homogenizado em 1 mL de tampão de extração (10mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM Na-glutamato; 10mM MgSO_4 ; 1mM DTT; 10% glicerol; 0,05% Triton X-100) num almofariz com um pouco de areia de quartzo e 10% de PVPP (Polivinilpirrolidona).

Após homogeneização, os extratos foram centrifugados a 20 000 g durante 15 minutos, a 4 °C e mantidos em gelo.

Para a determinação da atividade da GS foram preparados tubos de reação com 800 μL de solução de atividade (100mM Tris base; 100 mM L-glutamina; 60 mM Hidroxilamina; 1mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM ADP) e 100 μL de arsenato de sódio a 6,4 %, pH 6,4. A cada tudo, adicionou-se 100 μL de sobrenadante dos extratos ou de água desionizada (no caso do controlo) misturaram-se no vórtex e colocaram-se os tubos em banho-maria a 30°C. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de solução de paragem [3,3% FeCl_3 ; 8% TCA (ácido tricloacético); 2M HCl]. A absorvância foi lida a 500 nm com um espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS. A atividade da GS foi calculada usando a equação 2. A atividade foi convertida para mg de proteína. Para determinação do conteúdo total de proteína dos extratos ver secção 2.3.5. A determinação foi feita em triplicado para cada extrato.

$$\text{Atividade da GS } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{\text{Abs}(500 \text{ nm})}{(0,4 \text{ } (\mu\text{mol}) \cdot \text{volume de extrato} \text{ (mL)} \cdot \text{tempo incubação (min)})}$$

Equação 2

2.3.2. Quantificação da Prolina

O método utilizado para a determinação de prolina baseia-se no método de Bates *et al.*, (1973). Para extração da prolina homogeneizou-se 0,2 g de material vegetal congelado em 2 mL de ácido sulfosalicílico a 3% (p/v), com um pouco de areia de quartzo, posteriormente centrifugado, durante 10 minutos, a 500 g. De seguida, fez-se reagir 200 µL de sobrenadante com 200 µL de ácido acético glacial e 200 µL de ninidrina ácida em microtubos de 2 mL. Os tubos foram colocados durante 1 h, a 96 °C, num bloco de aquecimento. No final, colocaram-se os tubos a arrefecer em gelo e adicionou-se 1 mL de tolueno. Após agitação, durante 15 segundos, deixou-se que as duas fases se separassem e retirou-se a fase superior para tubos de 1 mL. Posteriormente procedeu-se à leitura da absorvância a 520 nm utilizando tolueno como branco num espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS. A concentração de prolina foi determinada com recurso a uma reta de padrão e expressa em µg/ml e convertida por g de tecido. A determinação foi feita em triplicado para cada tratamento.

2.3.3. Avaliação da peroxidação lipídica

Para avaliação da peroxidação lipídica foi quantificada a concentração de malondialdeído (MDA) de acordo com o método de Heath e Packer (1968). Para o efeito foram pesadas 0,4 g de material vegetal, que foram homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloro acético (TCA 0,1%) com areia de quartzo num almofariz. Os homogeneizados foram transferidos para um microtubos e centrifugados a 500 g, durante 5 minutos, sendo posteriormente recolhido o sobrenadante. Para cada extrato foram preparados 3 tubos contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5%) e 250 µL de sobrenadante. Para o branco, misturou-se 1 mL de TBA 0,5% com 250 µL de TCA. Os tubos foram incubados a 95 °C, durante 30 minutos e posteriormente arrefecidos em gelo durante 10 minutos. De seguida, os tubos foram centrifugados a 10 000 g, durante 5 minutos. A absorvância dos sobrenadantes foi lida a 532 nm e a 600 nm. Para a determinação da concentração de malondialdeído (MDA) considerar o coeficiente de extinção molar = 155 mM.cm⁻¹ e calcular, segundo a equação 3, exprimindo os resultados em nmol MDA.g⁻¹ peso fresco. A determinação foi feita em triplicado para cada tratamento.

$$\text{Concentração de MDA (mM)} = [\text{Abs}_{532\text{nm}} - \text{Abs}_{600\text{nm}}] / 155$$

Equação 3

2.3.4. Quantificação do conteúdo em clorofilas dos tecidos vegetais

Para quantificação das clorofilas foram homogeneizados 0,2 g de material vegetal num almofariz com areia de quartzo e 6 mL de acetona a 80%. O homogeneizado foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a 1 537 g, durante 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e o volume, ajustado para 10 mL, e procedeu-se à leitura da absorvância nos comprimentos de onda de 663 nm e de 645 nm. A concentração de clorofila a e b foi calculada em mg/L usando as equações 4 e 5, respetivamente e convertida em mg clorofila por grama de peso fresco (Sims e Gamon, 2002). A determinação foi feita em triplicado para cada tratamento.

$$CI\ a = 12,7 \times Abs_{663\ nm} - 2,69 \times Abs_{645\ nm} \text{ (mg/L)}$$

Equação 4

$$CI\ b = 22,9 \times Abs_{645\ nm} - 4,68 \times Abs_{663\ nm} \text{ (mg/L)}$$

Equação 5

2.3.5. Determinação do conteúdo total de proteína

Para determinação do conteúdo de proteína, utilizou-se o método descrito por Bradford em 1976. Para a determinação utilizou-se o reagente de Bradford da Alfa Aesar. Colocou-se 850 µL de reagente na cuvete e adicionou-se 20 µL de amostra resultante do homogeneizado preparado para a determinação da atividade enzimática da glutamina sintetase. Agitou-se o conteúdo da cuvete e deixou-se a repousar à temperatura ambiente durante 15 minutos. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 595 nm e a concentração proteica determinada (µg/µL) através uma reta padrão obtida usando BSA e convertida em mg de proteína por grama de peso fresco. A determinação foi feita em triplicado para cada tratamento.

2.3.6. Trocas gasosas e eficiência do fotossistema II

As trocas gasosas foram analisadas utilizando o sistema de fotossíntese portátil (LI-COR 6400). As medições ocorreram sob a concentração atmosférica de CO₂ e sob uma PPFd (Densidade Fotossensível de Fluxo Fotossintético) saturante de 200 µmol m⁻² s⁻¹. Parâmetros individuais, como taxa de transpiração (E, mol m⁻² s⁻¹), condutância estomática (gs, mol m⁻² s), taxa fotossintética líquida (PN, µmol m⁻² s⁻¹) e concentração intercelular de CO₂ (C_i, µmol CO₂.mol ar⁻¹) foram determinados de acordo com Machado *et al.*, (2017).

A fluorescência da clorofila *a* foi medida na mesma folha que a troca gasosa com um fluorímetro modulador de amplitude (FluorPen FP 110, Photon Systems Instruments). A fluorescência mínima (F_0) foi medida em folhas adaptadas ao escuro através da aplicação de um pulso de luz e a fluorescência máxima (F_m) foi medida após a aplicação de um pulso de luz de saturação. Após a exposição à luz actínica, foi calculada a média do rendimento de fluorescência em estado estacionário adaptado à luz, seguido pela exposição à luz saturante para estabelecer F_m' . A eficiência máxima do fotossistema II foi determinada por $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$ e a eficiência efetiva do PSII foi calculada por $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$.

As trocas gasosas e os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, foram medidos em 3 folhas de plantas de *Lactuca sativa* (3 plantas por tratamento).

2.4. Avaliação do papel dos isolados de microrganismos do solo nas propriedades físico-químicas e bioquímicas da matriz

2.4.1. Inoculação dos solos

O solo utilizado neste trabalho foi um solo agrícola, recolhido em S. Pedro da Torre, concelho de Valença, Norte de Portugal (41°59'21.95" N, 8°41'5.76" W), num campo usado para cultura de milho. Após a recolha de uma amostra composta de solo, esta foi homogeneizada (limpa de ramos, raízes e folhas), crivada através de um crivo de 2 mm e colocada em tabuleiros com dimensões 17x12x6 cm (1224 cm³). Neste procedimento, foram utilizados 2 controlos - CTLs (em condições de luz e de obscuridade). Para cada tratamento (CTLs, e diferentes inoculados) preparam-se 3 tabuleiros independentes. O teor em clorofila dos inóculos usados foi determinado antes da sua aplicação (vide secção 2.2.4.). Os tabuleiros foram colocados em condições de fotoperíodo natural e temperatura ambiente, durante 6 meses (entre junho e dezembro de 2017).

O volume de água a adicionar a cada tabuleiro foi calculado tendo por base os dados de pluviosidade média da região de recolha do solo e a área superficial de solo em cada tabuleiro. Desta forma, os solos foram regados 2 vezes por semana com 100 mL (com exceção do CTL na obscuridade, que foi regado com 50 mL, pois registou-se que ao estar tapado menos água era perdida por evaporação). Os solos foram revolvidos no final de cada mês de ensaio.

Após este período, de cada tabuleiro recolheram-se amostras de solo para avaliação de parâmetros físico-químicos (capacidade máxima de retenção de água, pH, condutividade e conteúdo em matéria orgânica) e bioquímicos do solo (desidrogenases, fosfatases ácidas, urease e arilsulfatase), da mineralização do azoto e da nitrificação potencial.

2.4.2. Análise de parâmetros físico-químicos do solo

Todos os parâmetros descritos nesta secção foram medidos em triplicado, em cada um dos 3 tabuleiro de solo (réplicas do ensaio).

2.4.2.1. pH e condutividade elétrica do solo

O procedimento foi realizado de acordo como protocolo proposto por Dewis e Freitas (1984), SPAC (2000) e Tan *et al.*, (1996). Para o efeito foram pesados 10 g de solo e colocados em frascos de polipropileno. De seguida, foram adicionados 50 mL de solução KCl (1M) aos frascos contendo as amostras e estes colocados em agitação magnética, durante 15 minutos. Posteriormente as suspensões repousaram durante 30 minutos e de seguida mediu-se o pH utilizando o medidor de pH InoLab pH7110. O procedimento foi repetido substituindo solução de KCl (1M) por água desionizada. A suspensão de solo:água (1:5 m/v), após leitura do pH, foi mantida em repouso durante 24 h para medição da condutividade elétrica, efetuada com um medidor multiparamétrico InoLab pH7110.

2.4.2.2. Capacidade máxima de retenção de água ($CRA_{máx}$)

O procedimento utilizado esteve de acordo com o protocolo padronizado (ISO/DIS 11268-2.2, 1998). Com auxílio de uma lâmina retirou-se o fundo de copos de polipropileno e substituiu-se o mesmo com papel de filtro, fixo com fita adesiva. O peso do frasco mais a respetiva tampa (tara) foi registado. Cada frasco foi cheio com solo seco até aproximadamente metade do seu volume.

Os frascos fechados com as respetivas tampas foram colocados num tabuleiro com água durante 3 h e posteriormente transferidos para papel absorvente (substituído sempre que necessário), por um período de 2 h, para eliminar o excesso de água que não está a ser retida pelo solo. Decorridas as 2 h, os frascos foram novamente pesados (peso solo saturado), os valores foram registados e os frascos foram colocados numa

estufa a 105 °C, durante 24 h. No final, os frascos foram pesados uma vez mais e o peso seco de solo registado. A capacidade máxima de retenção da água, em percentagem foi calculada através da equação 6:

$$\text{CRA}_{\text{máx}} = ((\text{Peso solo saturado} - \text{Peso solo seco}) / \text{Peso solo seco}) * 100 \quad \text{Equação 6}$$

2.4.2.3. Conteúdo em matéria orgânica

O procedimento utilizado foi baseado no protocolo SPAC (2000), que descreve a determinação do conteúdo em matéria orgânica do solo por ignição. Cadinhos com solo seco (após 12 h na estufa a 105 °C) foram colocados numa mufla durante 8 h, a 450 °C. Os cadinhos foram deixados a arrefecer no interior da mufla, transferidos para um exsiccador, e depois pesados, para determinação do peso após mufla. A percentagem de matéria orgânica foi calculada através da equação 7:

$$\text{Matéria orgânica \%} = ((\text{Peso solo seco} - \text{Peso solo após ignição}) / \text{Peso solo seco}) * 100 \quad \text{Equação 7}$$

2.4.3. Análise de parâmetros bioquímicos do solo

2.4.3.1. Medição da atividade das desidrogenases

O procedimento utilizado foi descrito por Thalman (1968) e ligeiramente modificado. Para o controlo e para cada amostra de solo (réplicas dos diferentes tratamentos), foi pesada 1 g de solo fresco para seis tubos Falcon de 15 mL. A três destes tubos adicionou-se 1 mL de tampão Tris (0,1M, pH 6). Os tubos foram tapados e agitados no vórtex sendo estes tubos os controlos do ensaio enzimático. Aos outros três tubos adicionou-se 1 mL de substrato, TTC (Cloro de 2,3,5- trifeniltetrazólio) a 1%, preparado em tampão Tris. Após agitação no vórtex, todos os tubos foram incubados por um período de 24 h, a 40°C. Decorridas as 24 h, procedeu-se à adição de 5 mL de acetona a cada tubo e mistura no vórtex. Os tubos foram novamente colocados em agitação, durante 2 h no escuro, para extração do produto de reação (trifenilformazão). Após agitação, os tubos foram centrifugados a 553 g, durante 4 minutos, e de seguida, foi lida a absorvância do sobrenadante no espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS a 546 nm. A concentração do produto de atividade da enzima foi determinado com recurso a uma reta padrão e a atividade da enzima foi calculada para cada réplica do ensaio através da equação 8:

$$\text{Atividade de Desidrogenase } (\mu\text{g TFP. g}^{-1} \text{ dm. h}^{-1}) = \frac{\left[\frac{(L-C) \times V}{W} \times \frac{100}{\%dm} \right]}{24}$$

Equação 8

L – média dos valores das amostras ($\mu\text{g TPF/mL}$)

C- média dos valores dos controlos do ensaio ($\mu\text{g TPF/mL}$)

V – Volume de incubação (neste caso 6 mL)

W- Peso inicial do solo húmido

%dm - percentagem de matéria seca (100%-%humidade)

2.4.3.2. Medição da atividade das fosfatases ácidas

O procedimento utilizado foi adaptado dos métodos descritos por Tabatabai e Bremner (1969) e Eivazi e Tabatabai (1977). Para cada amostra, pesou-se 1 g de solo fresco para cada tubo Falcon de 15 mL, num total de seis tubos por cada réplica de solo. Nos três tubos do controlo de ensaio enzimático foram adicionados 4 mL de tampão universal modificado, (composto por uma mistura de Tris(hidroximetil)aminometano, ácido maleico, ácido cítrico monohidratado e ácido bórico, a pH 6,5) e estes foram posteriormente agitados no vórtex. Aos três tubos de reação adicionou-se 1 mL da solução de substrato (p-nitrofenil fosfato, 115 mM) e 4 mL da solução tampão e os tubos foram igualmente agitados no vórtex. Todos os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 h. De seguida, adicionou-se 1 ml de cloreto de cálcio (0,5 M) e 4 ml de hidróxido de sódio (1 M) a todos os tubos. Nos tubos de controlo adicionou-se ainda 1 mL de solução de substrato. Procedeu-se a uma centrifugação a 553 g , durante 4 minutos. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 400 nm no espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS e a concentração do produto de reação da enzima (p-nitrofenol) foi determinada através de uma reta padrão previamente preparada. Posteriormente a atividade da enzima foi determinada com recurso à equação 9:

$$\text{Atividade fosfatases ácidas } (\mu\text{g pNP.g}^{-1} \text{ dm.h}^{-1}) = \frac{(L-C) \cdot V \cdot D}{W} * \frac{100}{\%dm} \quad \text{Equação 9}$$

L - média dos valores das amostras ($\mu\text{g pNP/ml}$)

C - média dos valores dos controlos ($\mu\text{g pNP/ml}$)

V - volume de incubação (5 ml)

D – fator de diluição (2)

W - peso inicial do solo húmido (1g)

%dm - percentagem de matéria seca (100- % humidade)

2.4.3.3. Medição da atividade da urease

Para medição da atividade da enzima urease pesou-se para cada tubo Falcon, de 15 mL, 1 g de solo húmido, num total de seis tubos por cada réplica de solo. Nos três tubos do controlo do ensaio enzimático foram adicionados 4 mL de tampão borato (0,1 M; pH10). Nos tubos de reação, foram adicionados 0,5 ml da solução de substrato (ureia) e 4 mL de tampão borato (0,1 M; pH10). Todos os tubos foram agitados no vórtex e incubados durante 2 h a 37 °C. Após incubação adicionou-se 0,5 mL da solução de substrato aos tubos de controlo. De seguida, foram adicionados 6 mL de cloreto de potássio (2 M) a todos os tubos que foram colocados num agitador orbital durante 30 minutos, a 150 rpm. Após a agitação procedeu-se a uma centrifugação a 553 g, durante 4 minutos. Do sobrenadante, foram retirados 500 μl e transferidos para novos tubos ao quais foram adicionados 4,5 mL de água destilada e 2,5 mL do reagente A (uma mistura de 100 ml de solução de hidróxido de sódio (0,3 M) com 100 ml de solução de salicilato de sódio e 100 ml de água destilada) e 1 ml da solução de dicloroisocianurato de sódio (1,06 M). Os tubos foram agitados e deixados a repousar à temperatura ambiente durante 30 minutos. A absorvância da mistura resultante, foi lida a 690 nm no espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS. A concentração do produto de atividade da enzima (amónia) foi determinado com recurso a uma reta padrão e a atividade da enzima urease calculada através da equação 10:

$$\text{Atividade de Urease } (\mu\text{g N. g}^{-1}\text{dm. h}^{-1}) = \frac{(L-C)*V}{W} * \frac{100}{\%dm} \quad \text{Equação 10}$$

L - média dos valores das amostras ($\mu\text{g N/ml}$)

C - média dos valores dos controlos ($\mu\text{g N/ml}$)

V - volume de incubação (10,5 ml)

W - Peso inicial do solo húmido (1g)

%dm - percentagem de matéria seca (100- % humidade)

2.4.3.4. Medição da atividade da arilsulfatase

Para medição da atividade da enzima arilsulfatase pesou-se para cada tubo Falcon de 15 mL 1 g de solo húmido, num total de seis tubos por cada réplica de solo. Nos três tubos do controlo do ensaio, foram adicionados 4 mL de tampão de acetato (0,5 M; pH 5,8). Nos tubos de reação, foram adicionados 1 ml da solução de substrato (0,02 M de potássio-p-nitrofenilsulfato em tampão acetado) e 4mL de tampão acetado (0,5 M; pH 5,8). Todos os tubos foram agitados no vórtex e incubados durante 1 h, a 37 °C, em agitação orbital. Após incubação foi adicionado 1 mL de solução substrato aos tubos do controlo. De seguida, foram adicionados 5mL de água desionizada a todos os tubos. Seguiu-se uma agitação no vórtex e uma centrifugação a 553 g durante 4 minutos de todos os tubos. Posteriormente foram transferidos 2mL do sobrenadante para novos tubos e adicionado 4 mL de água desionizada e 4 mL de solução de hidróxido de sódio (0,5 M). A absorvância da mistura resultante foi lida a 420 nm no espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS. A concentração do produto de atividade da enzima (nitrofenol) foi determinado com recurso a uma reta padrão e a atividade da enzima arilsulfatase foi calculada através da equação 11:

$$\text{Actividade da Arilsulfatase } (\mu\text{g N g}^{-1} \text{ dm h}^{-1}) = \frac{(L-C)*V}{W} * \frac{100}{\%dm} \quad \text{Equação 11}$$

L – Média da concentração das amostras ($\mu\text{g pNP/ml}$)

C – Média da concentração dos controlos ($\mu\text{g pNP/ml}$)

V – Volume do extrato (neste caso é 10ml)

W – Peso inicial do solo húmido (neste caso é 1g)

%dm – Percentagem de matéria seca (100-%humidade).

2.4.3.5. Medição da mineralização do azoto nos solos

Para medição da mineralização do azoto, pesou-se para cada tubo Falcon de 15mL 1g de solo húmido, num total de seis tubos por réplica de solo. Foram adicionados 3 mL de água desionizada a todos os tubos e os tubos de controlo, foram colocados a incubar durante 7 dias a -20 °C enquanto os restantes, foram colocados a incubar a 40 °C por igual período. Após o período de incubação, foram adicionados 3 mL de cloreto de potássio (2 M) a todos os tubos e estes foram colocados durante 30 minutos em agitação orbital a 150 rpm. De seguida, os tubos foram centrifugados a 553 g durante 4 minutos. Após a centrifugação, foram retirados 0,5 mL do sobrenadante para novos tubos ao quais foram também adicionados 4,5 mL de água desionizada. De seguida, foram adicionados 2,5 ml do reagente A (mistura de 28,3 g de salicilato de sódio, 0,20 g de nitroprussiato de sódio; 10 ml de hidróxido de sódio (5M) para 500 mL) e 1 mL de solução de dicloroisocianurato de sódio. A mistura foi agitada no vortéx e deixada a repousar durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 690 nm no espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS. A concentração do produto de atividade da enzima (ião NH_4^+) foi determinado com recurso a uma reta padrão e a nitrificação potencial, calculada através da equação 12:

$$\text{Mineralização de azoto } (\mu\text{g N. g}^{-1} \text{ dm. d}^{-1}) = \frac{(L-C)*V * \frac{100}{\%dm}}{7} \quad \text{Equação 12}$$

L - média dos valores das amostras ($\mu\text{g N/ml}$)

C - média dos valores dos controlos ($\mu\text{g N/ml}$)

V - volume de incubação (6 ml)

D – fator de diluição (10)

W - Peso inicial do solo húmido (1g)

%dm - percentagem de matéria seca (100- % humidade)

2.4.3.6 Medição da nitrificação potencial

Para medição da nitrificação potencial dos solos, pesou-se para cada tubo Falcon de 15mL 1g de solo húmido, num total de 6 tubos para cada réplica de solo. Posteriormente foram adicionados 4 ml de solução substrato (sulfato de amónia; 1mM) e 20µl de clorato de sódio (1,5M) a todos os tubos. Os tubos foram fechados e agitados no vortéx. Os tubos controlo foram colocados a incubar a -20°C enquanto, os restantes tubos foram colocados a incubar durante 5h à temperatura ambiente e com agitação orbital de 150 rpm. Após o período de incubação adicionou-se 1mL de cloreto de potássio (2M) a todos os tubos. Os tubos foram agitados e centrifugados a 553 g, durante 4 minutos. Dos sobrenadantes transferiu-se 1 mL para novos tubos e adicionou-se 0,6mL de tampão cloreto de amónio (0,19 M, pH 8,5) e 0,4ml de reagente A (2 g de sulfanilamida, 0,1 g de cloridrato de di-hidroclorato de N- (1-naftil)-etilenodiamina; 20 ml ácido fosfórico). A mistura foi deixada a repousar 15 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 520 nm no espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS. A concentração do produto de atividade da enzima (nitrito) foi determinada com recurso a uma reta padrão e a nitrificação potencial, calculada através da equação 13:

$$\text{Nitrificação potencial (ng N. g}^{-1} \text{ dm. 5h}^{-1}) = \frac{(L-C) * V * 1000 * \frac{100}{\%dm}}{5} \quad \text{Equação 13}$$

L – Média dos valores das amostras (µg N/ml)

C – Média dos valores dos controlos (µg N/ml)

V – Volume de incubação (neste caso é 5,02ml)

1000 – fator de conversão (µg=ng)

W – Peso inicial do solo húmido (neste caso é 1g)

%dm – Percentagem de matéria seca (100-%humidade).

2.5. Caracterização genética dos isolados das CBS

2.5.1. Extração de DNA genómico

Para a extração do DNA genómico dos isolados, as células foram recolhidas das culturas por centrifugação e o DNA foi extraído utilizando o kit de extração de DNA Maxwell[®] 16 System, seguindo os procedimentos descritos no mesmo.

2.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após extração do DNA genómico procedeu-se à amplificação parcial por reação de PCR dos genes 18SrRNA e ITS (internal transcribed spacer). Para o efeito foi utilizada a Master Mix NZY Taq 2x Colourless (NZYTech[™]) ajustando as instruções do fabricante para um volume final de 20 μ L. Para tal, a 10 μ L de Master Mix foi adicionado 0,8 μ L de cada um dos oligonucleótidos iniciadores (a uma concentração final de 0,4 μ M), 2 μ L DNA genómico e 6,4 μ L de água ultrapura. As reações foram realizadas com o recurso a um termociclador Bio-Rad[™], utilizando o programa descrito na tabela 2. Os conjuntos de oligonucleótidos utilizados, foram escolhidos de acordo com o gene/sequência alvo que se pretendia amplificar e estão descritos na tabela 3.

Tabela 2. Programa de PCR e respetivas especificidades da reação.

Processo	Duração (min)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	5	95	1
Desnaturação	1	95	30
Emparelhamento	1	50	
Extensão	1,5	72	
Extensão final	7	72	1

Tabela 3 – Gene/sequência alvo e respetivos oligonucleótidos utilizados para amplificação por PCR.

Gene	Pares de oligonucleótidos	Sequência 5' → 3'	Tamanho esperado da sequência amplificada (pb)	Referências
18S/ITS	NS1	GTAGTCATATGCTTGTTTC	1756	Mikhailyuk, <i>et al.</i> , 2008
	18 L	CACCTACGGAAACCTGTTACGACTT		Mikhailyuk, <i>et al.</i> , 2008
	574*f	CGGTAAYTCCAGCTCYV	1202	Hugerth, 2014
	18 L	CACCTACGGAAACCTTGTTACGACTT		Mikhailyuk, <i>et al.</i> , 2008
18S	Ns7m	GGCAATAACAGGTCTGT	1300	Mikhailyuk, <i>et al.</i> , 2008
	LS 1850	CCTCACGGT ACTTGTTTC		Mikhailyuk, <i>et al.</i> , 2008
	NS1	GTAGTCATA TGCTTGCTCT C	1227	Mikhailyuk, <i>et al.</i> , 2008
	1132r	CCGTCAATTHCTTYAART		Hugerth, 2014

2.5.3. Eletroforese em gel de agarose

Após a reação de PCR, as sequências amplificadas, foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) em 1x TAE (Tris-acetato (0,04 M); EDTA (0,001 M)). Para permitir a visualização das bandas de DNA, foram também adicionados 0,75 µL de Green Safe (NZYTech™). O marcador de tamanho (bp) utilizado foi o NZYDNA Ladder VIII (NZYTech™).

2.5.4. Extração, purificação e quantificação dos produtos de PCR e sequenciação

Após eletroforese, os géis foram observados com recurso a um transiluminador e os amplificados excisados do gel com uma lâmina de bisturi. De seguida, foi utilizado o kit NZYGelpure (NzyTech™) para a purificação de DNA a partir de gel de agarose, seguindo o protocolo do fabricante. As concentrações de DNA foram determinadas por quantificação da absorvância a 260 nm usando um leitor de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) e considerando o coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a 50 ng.cm/µL. A pureza do DNA foi avaliada através da relação entre Abs a 260 nm e

Abs a 280 nm, devendo esta situar-se entre 1,8 e 2. Os produtos de PCR isolados foram sequenciados pela STABvida (Lisboa).

2.5.5. Análise filogenética

De modo a identificar as espécies presentes nos isolados e o seu relacionamento filogenético, foi utilizado o software LALIGN (ExpASy) para o alinhamento das sequências obtidas do gene 18S rRNA e da região ITS (*intergenic transcribed spacer*) e estas foram analisadas e comparadas com a informação presente na base de dados NCBI (Junho 2018) utilizando a ferramenta BLASTn.

2.6. Caracterização morfológica dos isolados das CBS

2.6.1. Microscopia ótica (MO)

As células presentes nos diferentes isolados de microalgas e cianobactérias foram observadas com o auxílio do microscópio Miotic BA310 e as imagens foram obtidas através do software Miotic image plus 2.0.

2.6.2. Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)

Para a preparação da amostra para a microscopia eletrónica de transmissão, as células foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (PFA, 2%), juntamente com tampão cacodilato de sódio (0,005 M, pH 7,2). Seguiram-se 3 lavagens, de 10 minutos cada com tampão cacodilato de sódio. Após a lavagem foi adicionado tetróxido de ósmio (2%) em tampão cacodilato de sódio (50 mM, pH 7,2) e seguiu-se um período de incubação de 1 h. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com lavagens de 10 minutos com cacodilato de sódio e incorporadas em albumina a 30%. De seguida, a preparação foi colocada num tubo de microhematocrito que após centrifugação a 775 g, durante 4 minutos foi cortado no local onde se depositou a amostra. Seguidamente iniciou-se o processo de desidratação que consistiu na passagem da amostra por uma série de concentrações crescentes de etanol a 100% (25 - 100%; v/v), em óxido de propileno e por fim, em concentrações crescentes de resina (EMBed-812). As amostras foram depois transferidas para moldes, cobertas com resina e colocadas numa estufa a 55 °C, durante 48 h, permitindo assim a polimerização. Após a polimerização estar concluída, as amostras foram cortadas em secções finas com um ultramicrotomo. As secções foram contrastadas com uma solução de acetato

de uranilo (2%) e citrato de chumbo (2%), antes de serem visualizadas, utilizando um microscópio electrónico Jeol JEM-1400.

2.7. Análise estatística

Nas experiências dos capítulos 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4, os dados foram analisados com recurso ao teste *t-student* (utilizando o programa GraphPad) para detetar diferenças significativas nos parâmetros em estudo relativamente às situações controlo. No capítulo 3.5, os dados foram analisados com recurso a análises de variância de uma via (ANOVA, SPSS). Quando foram detetadas diferenças significativas entre tratamentos, recorreu-se ao teste de Dunnett ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) em comparação com o controlo.

Resultados e discussão

3.1. Rastreio de cianobactérias e microalgas nativas de solos portugueses como potenciadores do crescimento de plantas

Com o objetivo de selecionar espécies de microalgas e cianobactérias nativas de solos portugueses potenciadoras do crescimento de plantas foram recolhidas 14 amostras de solo e crostas biológicas de solo em diversos pontos do país. As amostras utilizadas foram numeradas pela ordem de recolha (Tabela 1).

Após um período de incubação das amostras em meio líquido propício ao crescimento de organismos autotrófico as culturas obtidas foram caracterizadas por observação ao microscópio ótico (Figura 1) e algumas das culturas foram logo numa primeira fase subdivididas em purificações parciais, obtendo-se culturas enriquecidas em alguns dos seus constituintes (ex 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, etc.). O meio de crescimento destas culturas (contendo os exsudados das culturas) foi utilizado como suplemento à solução de Hoagland para crescimento de plântulas de alface em placa de Petri durante um período de 15 dias, após o qual o peso fresco e seco das plântulas foram determinados (Figura 2 e 3). Nos 3 primeiros dias foi também calculada a taxa de germinação, no entanto, não se registaram diferenças significativas entre tratamentos.

Das culturas testadas, a 4.3 foi a que demonstrou ter o maior efeito promotor do crescimento das plantas (Figura 2). Ao fim de 15 dias o peso fresco das plântulas de alface tratadas com os exsudados da cultura foi aproximadamente o dobro em comparação com o controlo, tratado apenas com meio de cultura BG₁₁. As culturas 1.2, 1.3, 2 e 2.2 e 14, demonstraram um efeito negativo no crescimento de plântulas, enquanto as restantes não alteraram significativamente o peso fresco médio. Em termos de peso seco, nenhuma amostra provocou aumento do peso das plântulas (Figura 3).

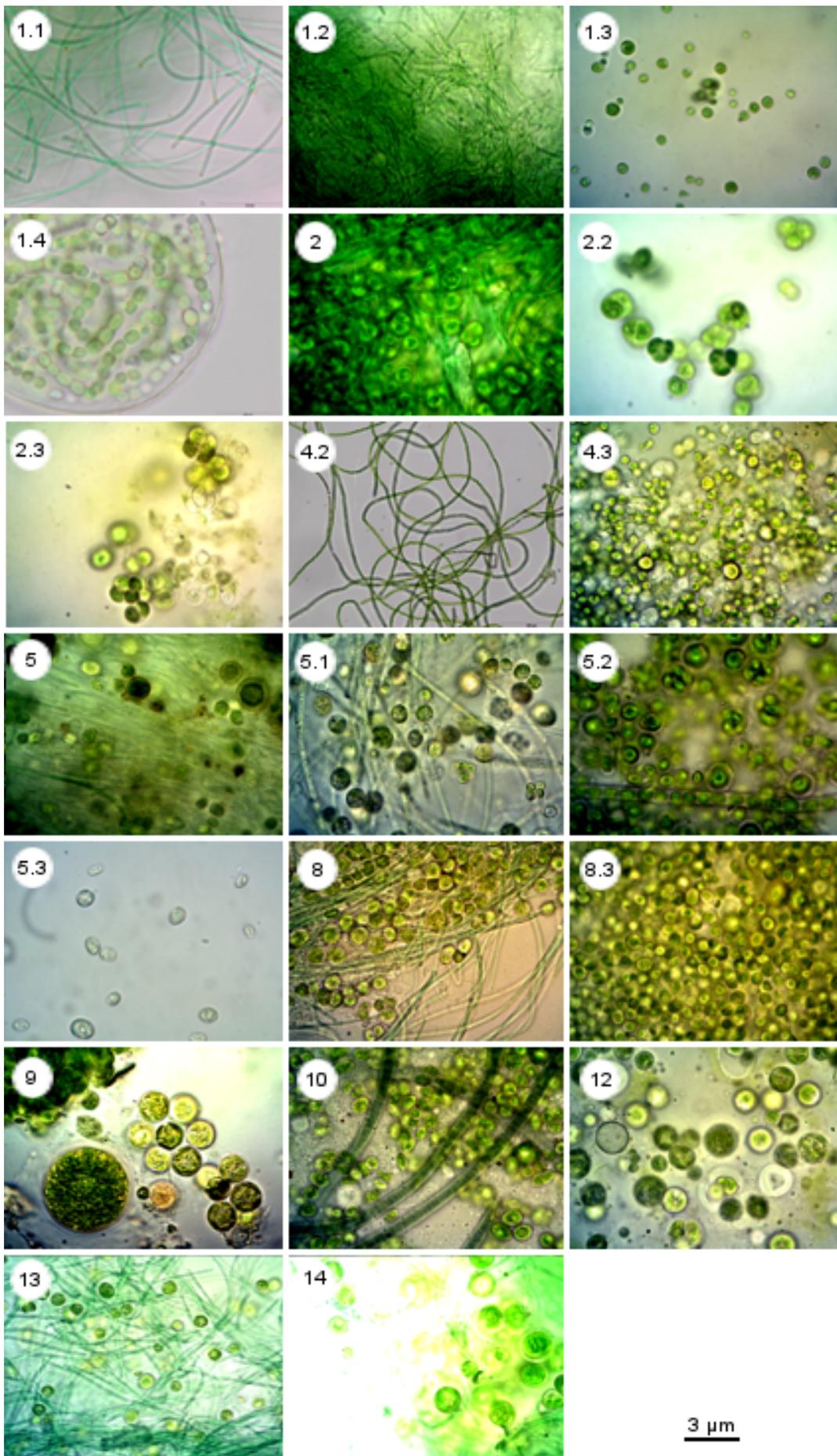


Figura 1 - Observação ao microscópio ótico das diferentes culturas de algas e cianobactérias utilizadas no rastreio de microrganismos potenciadores do crescimento de plantas.

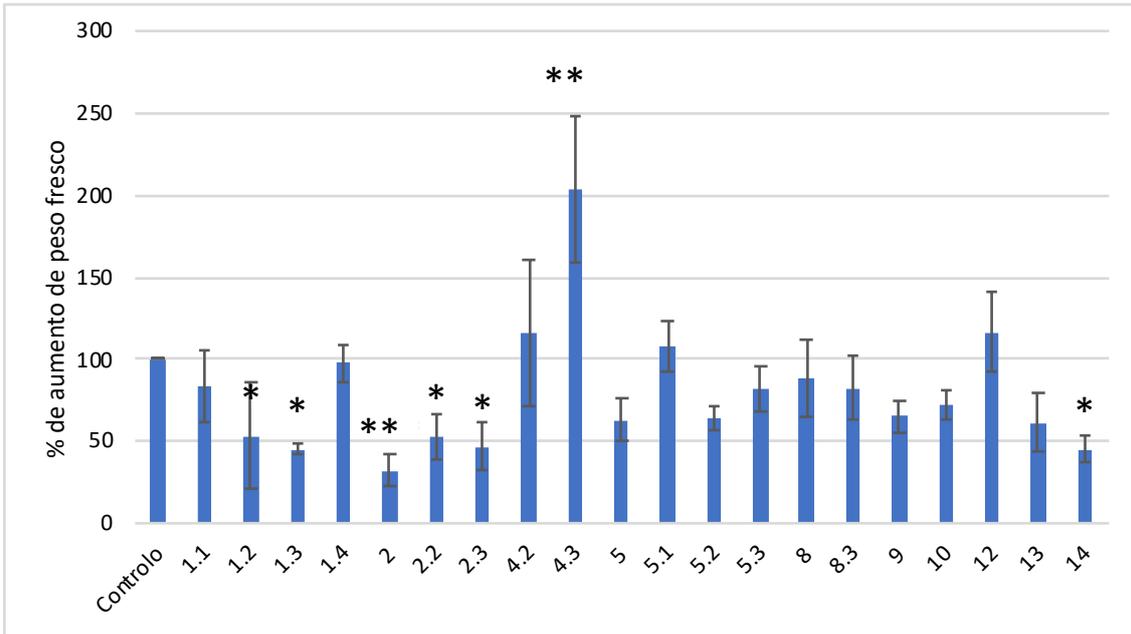


Figura 2 - Peso fresco médio (expresso em percentagem de aumento relativamente ao controlo) +/- desvio padrão das plântulas crescidas em meio suplementado com exsudados das culturas selecionadas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas relativamente ao tratamento controlo (*, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$)

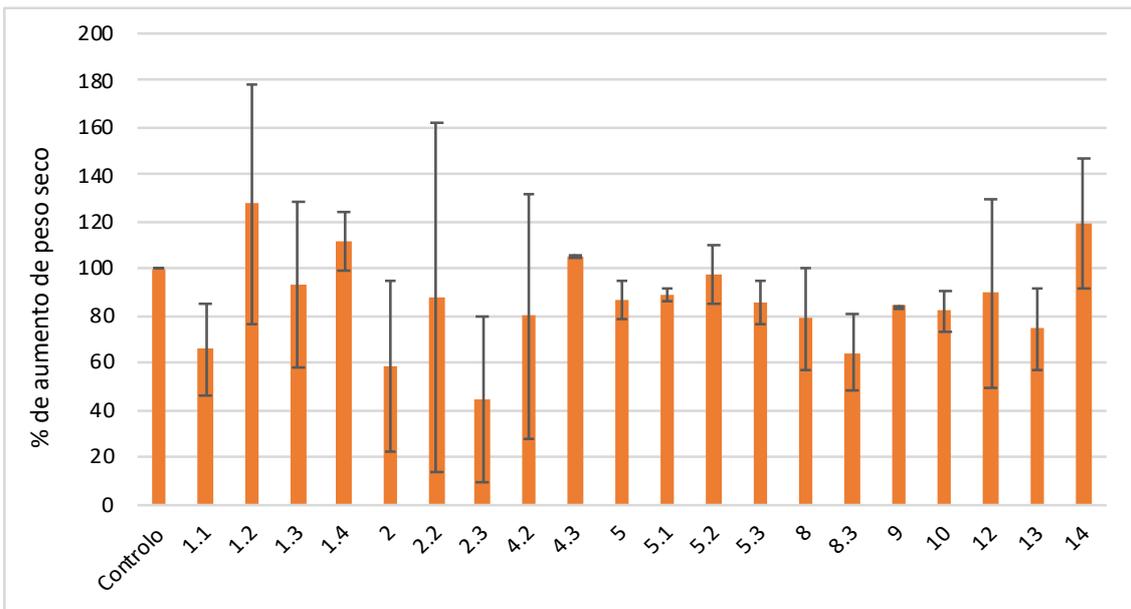


Figura 3 - Peso seco médio (expresso em percentagem de aumento relativamente ao controlo) +/- desvio padrão das plântulas crescidas em meio suplementado com exsudados das culturas selecionadas.

As fitohormonas fazem parte de diversos processos de desenvolvimento fisiológico das plantas. São conhecidos diversos microrganismos presentes no solo também capazes de produzir e secretar algumas dessas fitohormonas (Costacurta e Vanderleyden 1995; Shi *et al.*, 2009; Seipke *et al.*, 2012; Singh, 2014). Estudos mostram que algumas estirpes de cianobactérias e algas são capazes de produzir substâncias

similares a auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido jasmónico e ácido abcísico (Singh e Trehan, 1973; Rodgers *et al.*, 1979; Marsálek *et al.*, 1992; Tsavkelova *et al.* 2006; Osman *et al.*, 2010; Hashtroudi *et al.*, 2013, Lu e Xu, 2015), bem como outras substâncias bioactivas como vitaminas do complexo A, B, C, D, E e K. Estas vitaminas fazem parte de diversos processos enzimáticos, como a fotossíntese, mas têm efeito direto em componentes celulares como a membrana celular (Oertli, 1986; Borowitzka, 1995; Pulz e Gross, 2004; Smith *et al.*, 2007). Perante isto poderemos por a hipótese de a cultura 4.3 estar a secretar hormonas, vitaminas ou outras substâncias bioativas potenciadoras do desenvolvimento das plântulas de alface.

3.2. Verificação do efeito potenciador do crescimento de plantas em hidroponia

Após os ensaios em placa para rastreio de espécies de algas e cianobactérias com efeito potenciador do crescimento das plantas, foram realizados ensaios de crescimento das plantas de alface em hidroponia para confirmar o efeito benéfico da cultura

4.3. Para isso, as culturas hidropónicas de alface foram suplementadas com meio de cultura BG₁₁ (controlo) ou igual



Figura 4 - Plantas de alface crescidas durante 30 dias em solução de Hoagland em sistema de hidroponia, suplementadas com exsudados da cultura 4.3 ou apenas com meio BG₁₁ (controlo).

volume de meio de cultura contendo os exsudados da cultura 4.3 (Figura 4). Após um mês de crescimento, verificou-se que as plantas tratadas com o exsudado da cultura 4.3, eram maiores, e apresentavam mais vigor e uma coloração mais avermelhada indicadora de níveis mais elevados de antocianinas, pigmentos cuja presença é característica da variedade de alface utilizada.

No ensaio em hidroponia, a cultura 4.3 demonstrou novamente ter a capacidade de promover o crescimento das plantas de alface. Na Figura 5A é possível observar que as plantas tratadas com o exsudado da cultura 4.3 duplicaram o seu peso fresco em relação ao controlo. Quanto aos comprimentos da raiz e parte aérea apesar de se perceber um ligeiro aumento das plantas tratadas, os resultados não foram significativos (Figura 5B). Estes resultados, aumento do peso fresco e ausência de alteração do peso seco ou do tamanho da planta, pode ser explicado por um efeito a nível da extensibilidade da parede celular e subsequente entrada de água nas células. Este efeito é característico do efeito a nível do crescimento de algumas fitohormonas vegetais, nomeadamente as auxinas ou citocininas (Taiz *et al.*, 2015; Hashtroudi *et al.*, 2013).

De forma a avaliar o estado nutricional e a produtividade vegetal das plantas tratadas com os exsudados da cultura 4.3 foram quantificados os teores em clorofilas, teor proteico e a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) para se perceber de que forma o metabolismo das plantas foi afetado. Dos resultados da Figura 5 é possível verificar que, apesar de um ligeiro decréscimo no teor de proteínas (Figura 5C) e clorofilas (Figura 5D) não se registaram diferenças significativas nos teores das plantas

tratadas comparativamente à situação controlo. Também a atividade da glutamina sintetase não foi afetada nas plantas tratadas com os exsudados da amostra 4.3 (Figura 5D). Apesar de existir uma ligeira diminuição na atividade da glutamina sintetase, quando comparado com o controlo, a diferença não foi significativa. Estas diminuições dos teores proteicos, clorofilinos e de atividade da GS poderão dever-se a uma diluição dos conteúdos celulares provocada pelo efeito no aumento de peso fresco por provável efeito na extensibilidade da parede e entrada de água. Estes resultados sugerem, que não houve alterações dos processos de síntese e do metabolismo geral das plantas por efeitos dos exsudados microbianos.

De forma a avaliar se o tratamento com exsudados da cultura 4.3 provocaria algum tipo de *stress* nas plantas foi quantificado o teor em MDA (ácido malondialdeído), indicador do grau de peroxidação lipídica. Verificou-se que, as plantas sujeitas ao tratamento com os exsudados da amostra 4.3, quando comparadas com o controlo, não mostraram aumento dos níveis de peroxidação lipídica (Figura 5F), não estando, portanto, sujeitas a qualquer tipo de *stress*.

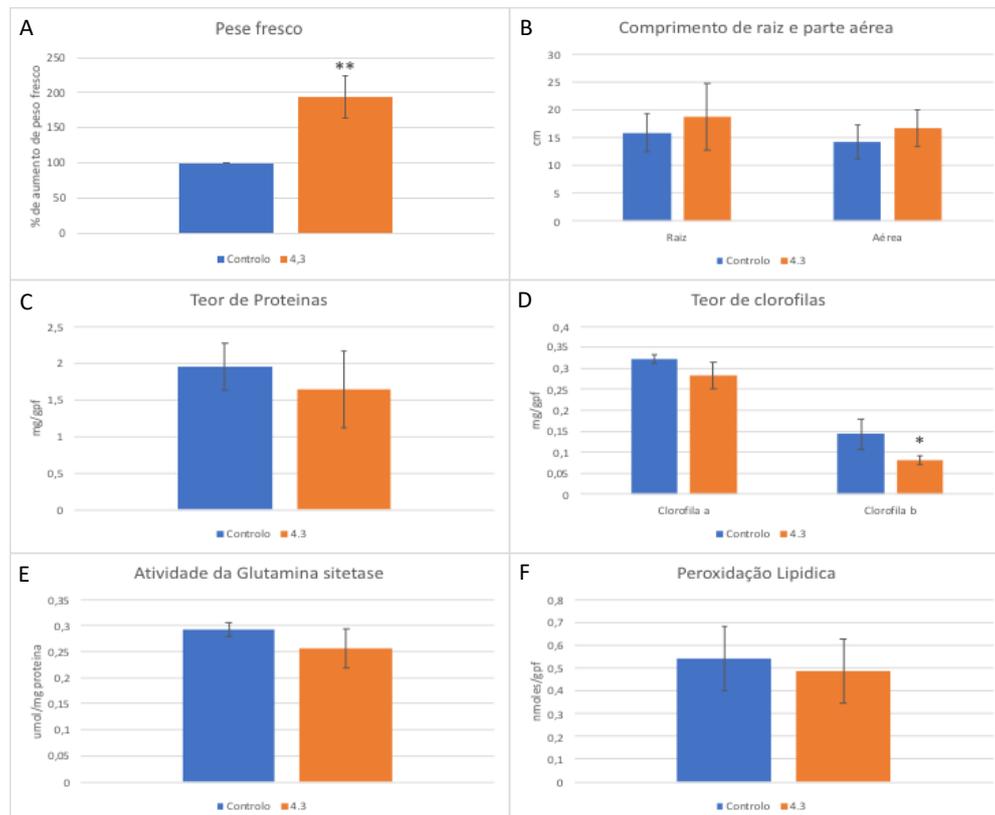


Figura 5 - Efeito dos exsudados da amostra 4.3 nas plantas de alface em sistema de hidroponia A – no peso fresco da planta (expresso em percentagem de aumento relativamente ao controlo); B – no comprimento da raiz e parte aérea; C – no teor de proteínas; D – no teor de clorofilas; E – na atividade da glutamina sintetase; F – na peroxidação lipídica. As plantas controlo cresceram com solução de Hoagland suplementado com meio BG₁₁, enquanto as plantas 4.3, cresceram com solução de Hoagland suplementado com meio BG₁₁ com exsudados da cultura 4.3. As barras representam valores médios dos parâmetros medidos e as barras de erro representam desvios padrão. Comparada com o controlo ** indica diferença significativa ($p < 0,01$).

Tal como visto anteriormente no rastreio em placa, a amostra selecionada mostrou ser capaz de promover o aumento de peso fresco das plantas, não se verificando no entanto aumentos de tamanho das raízes ou parte aérea. Conjuntamente com a ausência de alteração a nível dos teores proteicos e clorofilinos, bem como da actividade da enzima GS, pelo que os resultados podem ser explicados através de maior entrada de água nas células promovida pelos exsudados da amostra selecionada, sem no entanto alterarem o metabolismo geral das plantas. Este tipo de resposta pode ser atribuído a excreção pelos microorganismos de fitohormonas como auxinas citocininas, etileno ou giberelinas. As auxinas afetam de diversas formas o desenvolvimento das plantas, estando envolvidas em processos como crescimento de raízes e caules, gravi e fototropismo, dominância apical, floração, entre outras. São essenciais para o crescimento celular, afetando tanto a divisão quanto a expansão celular. Em alguns casos (crescimento de coleóptilos), a expansão celular promovida pelas auxinas ocorre na ausência de divisão celular, estimulando o alongamento celular ao atuarem sobre a parede celular tornando-as mais flexíveis e favorecendo a entrada de água. (Taiz *et al.*, 2015). As citocininas estimulam a divisão celular, mas também estão envolvidas na senescência foliar, mobilização de nutrientes, dominância apical e germinação das sementes, entre outras. Em espécies dicotiledóneas as citocininas favorecem uma expansão celular sem que esta se traduza num aumento de peso seco de cotilédones (Taiz *et al.*, 2015). A aplicação de citocininas em folhas, também favorece a produção de clorofila e enzimas fotossintéticas. Em certas concentrações, o etileno, reduz o alongamento das folhas e promove a expansão lateral das mesmas. O efeito deste gas é particularmente notório nos novos órgãos em formação principalmente no ápice e hipocótilo. Pensa-se que o etileno é o responsável pela re-orientação das microfibrilhas fazendo com que a célula se expanda. As giberelinas, promovem o alongamento internodal de diversas espécies acompanhado de uma diminuição da espessura do caule, do tamanho das folhas e de aparecimento de um verde mais pálido nas folhas (Taiz *et al.*, 2015).

Estudos realizados por outros autores, mostram que existem estirpes de cianobactérias e algas capazes de produzir substâncias similares a auxinas, citocininas, giberelinas, etileno (Singh, 2014, Lu e Xu, 2015). Das substâncias semelhantes a hormonas produzidas por microorganismos, as auxinas e as citocininas, estão descritas como podendo aumentar o peso fresco das plantas sem que o aumento se reflita também no peso seco (Taiz *et al.*, 2015). No entanto, as citocininas promovem a síntese de clorofila e no nosso estudo, verifica-se uma diminuição do teor de clorofilas ainda que não seja significativo. A síntese de substâncias semelhantes a auxinas parece ser

a explicação mais viável para o efeito provocado pelos exsudados da cultura 4.3. Contudo, estudos complementares seriam necessários para confirmar estes resultados.

3.3. Isolamento e caracterização da cultura 4.3 selecionada

Os resultados obtidos no capítulo 3.1 e 3.2 com a amostra 4.3 despertaram o interesse para a sua identificação genética e caracterização morfológica. Com recurso a microscopia ótica foi possível observar que a cultura correspondia a uma mistura heterogénea de algas verdes unicelulares com diferentes aspetos. Observaram-se células individualizadas com uma forma cocóide, sem cobertura mucilaginosa e cloroplasto com um pirenoide pronunciado, que por vezes formavam agregados (Figura 6 A). Observaram-se também em abundância células com forma elipsoidal, agrupadas em colónias de 4 células com flagelos. Pela sua morfologia, estas últimas células aparentam pertencer ao género *Senedesmus* (Figura 6 B). O resultado da observação de microscopia electrónica de transmissão é também apresentado na Figura 6 C. A célula de forma oval delimitada por uma parede celular (a) e revestida por mucilagem (b), onde é possível identificar cloroplastos no seu interior (c) e diversos vacúolos (d), parecendo ser uma célula de microalgas do género *Scenedesmus*.

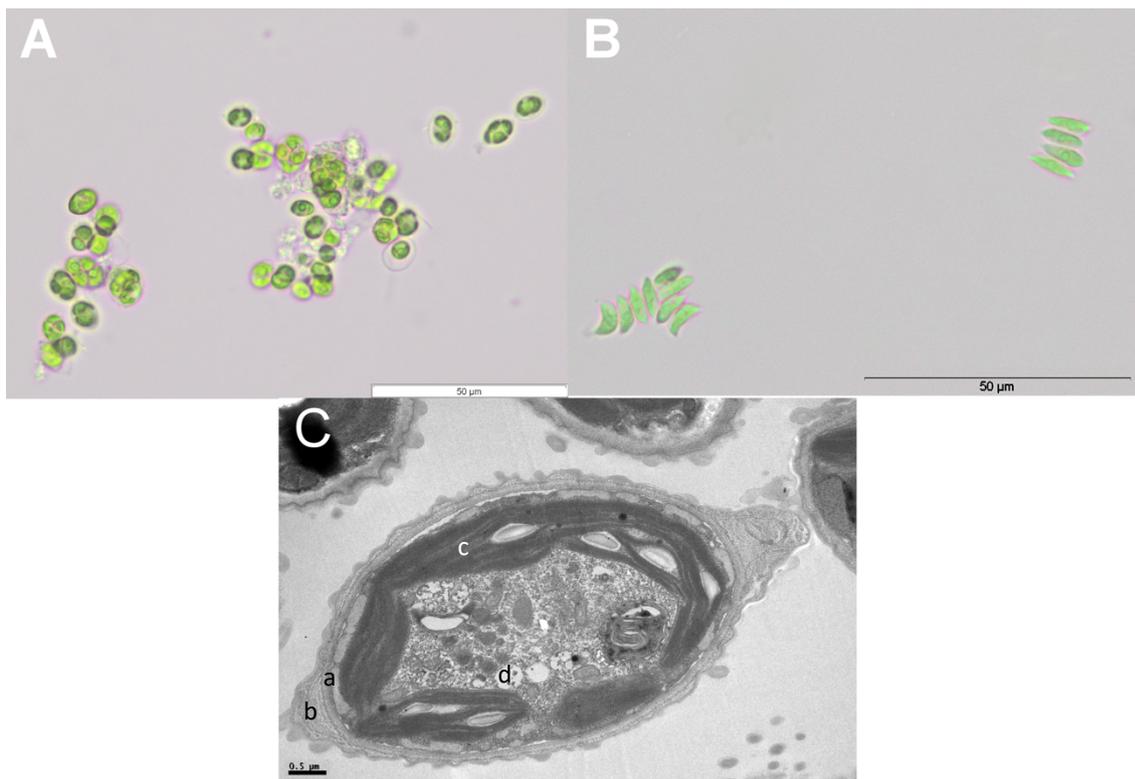


Figura 6 - Observações da cultura 4.3 ao microscópio ótico (A e B) e ao microscópio electrónico de transmissão (C).

Como a cultura 4.3 é constituída por diversas espécies de algas, esta foi sujeita a purificações sucessivas com o objetivo de isolar as espécies constituintes, obtendo-se 2 culturas enriquecidas em cada um dos seus principais constituintes (culturas 4.3.1 e 4.3.2). Estas sub-culturas parcialmente purificadas foram analisadas quanto ao seu efeito no crescimento das plantas e identificadas utilizando técnicas moleculares. O DNA genómico de cada uma das culturas foi utilizado para a amplificação por PCR, de uma região dos genes 18S RNA escolhido por se tratar de um gene bastante conservado e ITS. A Figura 7 representa um esquema dos locais de hibridação dos oligonucleótidos usados e tamanho dos produtos resultantes da amplificação. Após a sequenciação dos produtos amplificados as sequências obtidas foram sujeitas a uma análise usando o algoritmo BLAST para comparação com a base de dados NCBI e cálculo da significância estatística (Figuras 8 e 9). Como é possível verificar na Figura 8, a espécie *Micractinium inermum* aparece sempre como primeiro resultado na cultura 4.3.1 com uma homologia sempre superior a 97%. Relativamente à cultura 4.3.2 os resultados do BLAST, aliados à caracterização morfológica, apenas permitiram identificar a microalga como pertencente ao género *Senedesmus* (Figura 9).

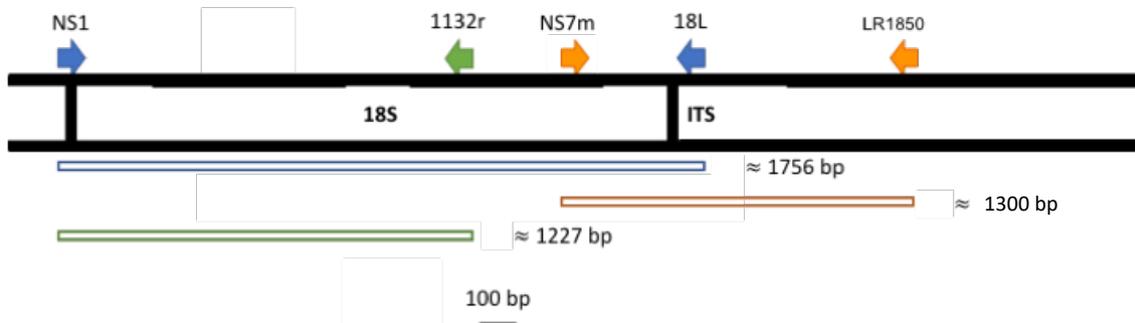


Figura 7 - Esquema de hibridação dos oligonucleótidos iniciadores à região codificante do gene 18sRNA/ITS e tamanhos previstos dos fragmentos obtidos na amplificação

Cianobactérias e microalgas autóctones como potenciadoras de crescimento de plantas e melhoradoras da estrutura do solo

NS1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium inermum</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence;	2002	2002	100%	0.0	99%	KM114868.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium inermum</i> genes for SSU rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, LSU rRNA, culture, collection: NIES:2171	1999	1999	100%	0.0	99%	AB731604.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium</i> sp. NIES-2171 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; an	1999	1999	100%	0.0	99%	JX889641.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium inermum</i> strain NLP-F014 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, con	1993	1993	99%	0.0	99%	KF597304.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorophyta</i> sp. SL-2016 isolate BSC-24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1988	1988	100%	0.0	99%	KX395732.1

1132r

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium inermum</i> genes for SSU rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, LSU rRNA, culture, collection: NIES:2171	1847	1847	97%	0.0	98%	AB731604.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. HS-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1836	1836	97%	0.0	97%	KU674363.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium</i> sp. KNUA036 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1836	1836	97%	0.0	97%	KT883906.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium</i> sp. KNUA034 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1836	1836	97%	0.0	97%	KM243325.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. UKM2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1836	1836	97%	0.0	97%	KP262476.1

LR1850

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium inermum</i> strain NLP-F014 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, con	1755	1755	95%	0.0	97%	KF597304.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorellaceae</i> sp. MCWWS28 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; a	1751	1751	95%	0.0	97%	KP204570.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> -like algae voucher HS26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequen	1742	1742	95%	0.0	97%	KU641127.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorellaceae</i> sp. MCWWS8 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; ar	1689	1689	95%	0.0	94%	KP204586.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorellaceae</i> sp. MCWWS7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; ai	1685	1685	95%	0.0	94%	KP204585.1

NS7m

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium inermum</i> strain NLP-F014 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, con	2089	2089	99%	0.0	98%	KF597304.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorellaceae</i> sp. MCWWS28 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; a	2085	2085	99%	0.0	98%	KP204570.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> -like algae voucher HS26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequen	2078	2078	99%	0.0	98%	KU641127.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium inermum</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence;	2069	2069	97%	0.0	98%	KM114868.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium</i> sp. NIES-2171 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; an	1984	1984	92%	0.0	99%	JX889641.1

Figura 8 - Resultados da análise BLAST das várias sequências obtidas por sequenciação utilizando os diferentes oligonucleotídeos iniciadores, NS1, 1132r, LR1850 e NS7m para a cultura 4.3.1

NS1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Acutodesmus bajacalifornicus</i> isolate SM19-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1670	1670	84%	0.0	92%	KX495077.1
<input type="checkbox"/> <i>Acutodesmus bajacalifornicus</i> isolate SB12-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1670	1670	84%	0.0	92%	KX495046.1
<input type="checkbox"/> <i>Acutodesmus bajacalifornicus</i> isolate SB12-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1670	1670	84%	0.0	92%	KX495023.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus obliquus</i> isolate CCAP 276/3C small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1666	1666	85%	0.0	92%	MG022741.1
<input type="checkbox"/> <i>Scenedesmus bijugus</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1666	1666	85%	0.0	92%	MF069190.1

18L

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus</i> sp. KG-2018 strain SAG 2564 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, i	1483	1483	79%	0.0	90%	MH703775.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus</i> sp. KG-2018 strain WD-1-6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, co	1483	1483	79%	0.0	90%	MH703774.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus</i> sp. KG-2018 strain WD-7-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, co	1483	1483	79%	0.0	90%	MH703773.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus</i> sp. KG-2018 strain Hg-6-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, con	1483	1483	79%	0.0	90%	MH703772.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus</i> sp. KG-2018 strain Ru-6-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, con	1483	1483	79%	0.0	90%	MH703744.1

NS7m

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Scenedesmus obliquus</i> genomic DNA containing 16S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, culture collection CCAP 276/49	2159	2159	94%	0.0	98%	FR866726.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus obliquus</i> isolate 12_2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequen	2141	4280	94%	0.0	98%	KT818720.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus obliquus</i> isolate 12_4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequen	2139	2139	94%	0.0	98%	KT778105.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus obliquus</i> isolate SM17_4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequ	2137	2137	93%	0.0	98%	KT778106.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus obliquus</i> isolate SM17_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequ	2134	2134	93%	0.0	98%	KT778104.1

LR1850

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Acutodesmus</i> sp. HH 10202 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequ	1825	1825	89%	0.0	94%	MF326554.1
<input type="checkbox"/> <i>Scenedesmus</i> sp. HH 10205 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequ	1820	1820	89%	0.0	94%	MF326557.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus obliquus</i> isolate 12_4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequen	1808	1808	90%	0.0	94%	KT778105.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus obliquus</i> isolate 12_2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequen	1808	3617	90%	0.0	94%	KT818720.1
<input type="checkbox"/> <i>Tetradesmus obliquus</i> isolate SM17_4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequ	1807	1807	89%	0.0	94%	KT778106.1

Figura 9 - Resultados da análise BLAST das várias sequências obtidas por sequenciação utilizando os diferentes oligonucleotídeos iniciadores, NS1, 1132r, LR1850 e NS7m para a cultura 4.3.2.

Cada uma das subculturas 4.3, 4.3.1 e 4.3.2, enriquecidas respectivamente em *M. inermum* e *Senedesmus* sp. foi testada relativamente ao seu efeito no crescimento de plântulas de alface, quantificando-se o comprimento das raízes, a parte aérea e o comprimento total das plântulas, bem como peso fresco e peso seco das plântulas cujo crescimento foi suplementando com os exsudados das culturas (Figura 10). A análise dos gráficos da Figura 10 permitiu verificar que tal como a cultura 4.3 (controlo) a cultura de algas enriquecida em *M. inermum* provoca um aumento do peso fresco médio das plântulas (apesar de estatisticamente não ser significativo), não apresentando efeito nos restantes parâmetros quantificados, parecendo contudo, ser esta espécie a principal responsável pelo efeito potenciador de crescimento das plantas. Não obstante este facto, tudo sugere que a co-cultura poderá favorecer a produção de exudados algais.

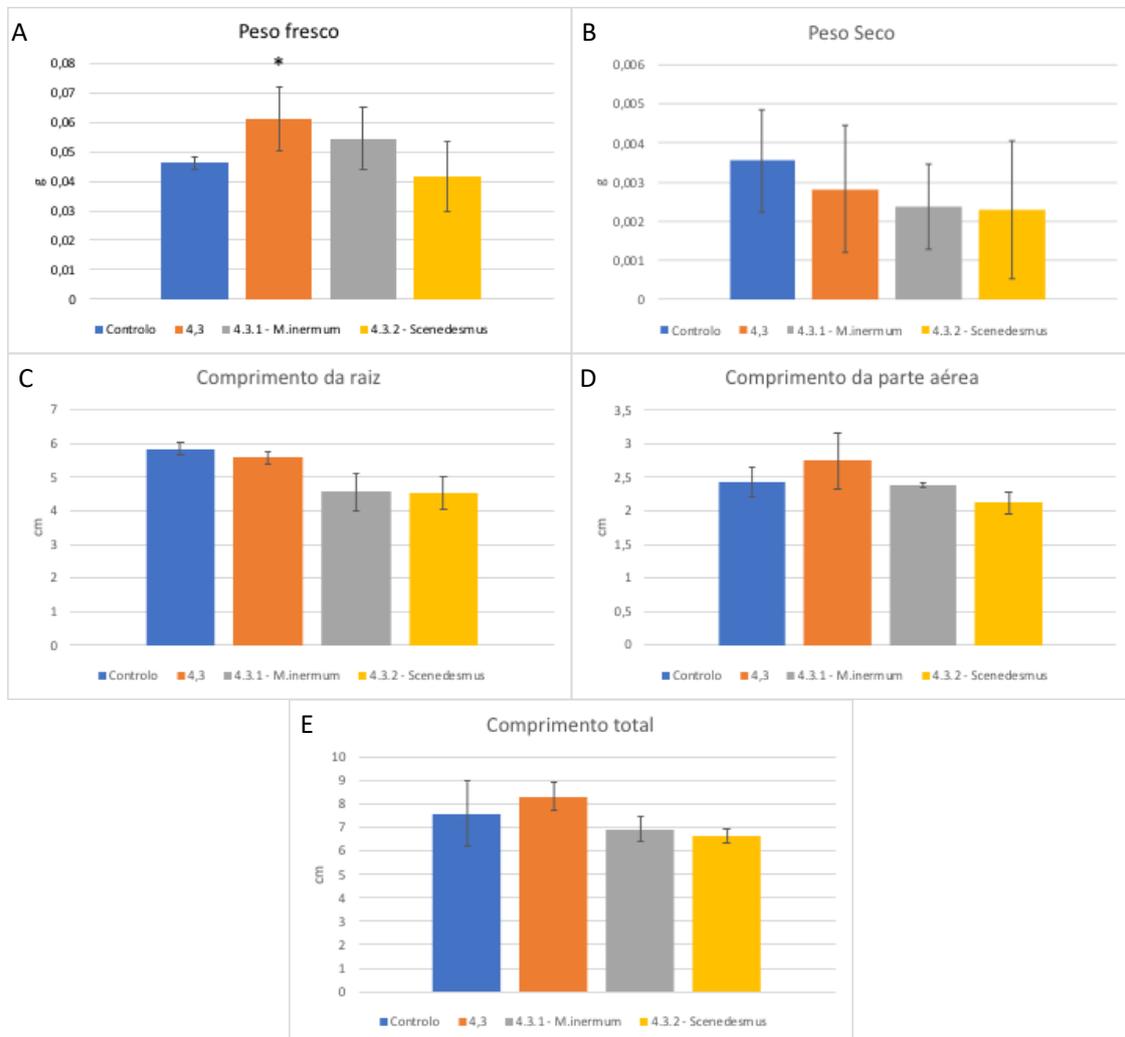


Figura 10 - Efeito dos exsudados das culturas algais nas plântulas de alface (*L. sativa*) A – no peso fresco das plantas; B – no peso seco das plantas; C- no comprimento da raiz; D – no comprimento na parte aérea da planta; E - no tamanho total da planta. As barras representam valores médios dos parâmetros medidos e as barras de erro representam desvios padrão. Comparada com o controlo * indica diferença significativa ($p < 0,05$).

No entanto, os estudos realizados (apenas duas experiências independentes) terão de ser repetidos de forma a podermos afirmar com certeza que *M. inermum* é o responsável pelo efeito potenciador do crescimento das plantas da cultura 4.3. A espécie *M. inermum* é conhecida pelo seu fácil cultivo e rápido crescimento mixotrófico, ideal para uma rápida produção de biomassa (Smith *et al.*, 2015). Apesar de ser principalmente descrita como sendo uma espécie de habitats aquáticos (tese vania Issa *et al.*, 2012, Varol e Fucikova, 2015), estudos indicam a sua presença no solo (Luo *et al.*, 2010). A sua utilização como potenciador de crescimento nunca foi estudada, no entanto existem diversos estudos sobre a sua utilização para produção de biodiesel (Massimi e Kirkwood, 2016). A outra sub-cultura parcialmente purificada, foi identificada como sendo uma microalga pertencente ao género *Senedesmus*, também descrita para ambientes aquáticos (Mandotra *et al.*, 2014) e com várias aplicações biotecnológicas tais como extração de compostos com fins terapêuticos (Guedes *et al.*, 2011, Amaro *et al.*, 2015) e produção de biodiesel (Mandal e Mallick, 2009). A espécie *Scenedesmus dimorphus* foi também avaliada quanto ao seu potencial agronómico e demonstrou ser capaz de favorecer a germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas de tomate (Garcia-Gonzalez, 2014)

3.4. Avaliação do efeito protetor das cianobactérias e microalgas selecionadas contra o *stress* salino

O *stress* salino causa diversos danos nas plantas, podendo levar à inibição do crescimento das mesmas, primeiro sinal de *stress* salino, ou em casos mais extremos à morte. A salinização do solo altera o potencial hídrico das células vegetais e dificulta a manutenção do metabolismo celular (Bolaños e Longstreth 1984; Hagemann, 2011). Em situações de *stress* salino, a presença de cianobactérias e algas, auxilia no crescimento de plantas através da libertação de um leque diversificado de compostos biologicamente ativos para a rizosfera, alguns dos quais são capazes de induzir respostas de defesa contra o *stress* osmótico (Singh, 2014; Lu e Xu, 2015). Por este motivo fomos testar algumas das culturas isoladas neste estudo para verificar se beneficiariam as plantas numa co-cultura em situação de *stress* salino.

Para este ensaio foram selecionadas as culturas 1.1, 1.4 e 4.3. Estudos paralelos mostraram que a cultura 1.4, é constituída fundamentalmente por cianobacterias do género *Nostoc* e é capaz de fixar azoto, enquanto a cultura 1.1 pertence ao género *Oculatella* e, apesar de não fixar azoto, este isolado foi selecionado pois aparenta ser uma espécie ainda por identificar. A amostra 4.3 foi selecionada pela sua capacidade em promover o aumento de peso das plantas descrita anteriormente.

Após a inoculação, crescimento e desenvolvimento das culturas de algas e cianobactérias em substrato constituído por uma mistura de vermiculite e perlite, este foi dividido por vasos onde foram colocadas plântulas de alface regadas com meio nutritivo suplementado ou não com NaCl numa concentração de 100 mM e ao fim de 30 dias as plantas foram medidas, pesadas e sujeitas a análises bioquímicas.

A Figura 11 mostra as plantas no fim de um dos três ensaios independentes realizados e verifica-se que comparativamente com o controlo respetivo, as plantas que cresceram nos substratos inoculados com os isolados de algas e cianobactérias, parecem ser maiores. Ainda observando a Figura 11, verifica-se que todas as plantas crescidas na presença da solução salina, têm um tamanho inferior às plantas correspondentes não tratadas, bem como aparentam ter um teor de clorofila superior.

Em situação de crescimento em condições de salinidade, e comparativamente ao controlo, as plantas crescidas em co-cultura com as algas ou cianobacterias parecem apresentar um desenvolvimento ligeiramente superior. As plantas tratadas e não tratadas com a solução salina foram analisadas quantificando-se o seu peso fresco, tamanho da parte aérea, níveis de prolina e actividade da GS.

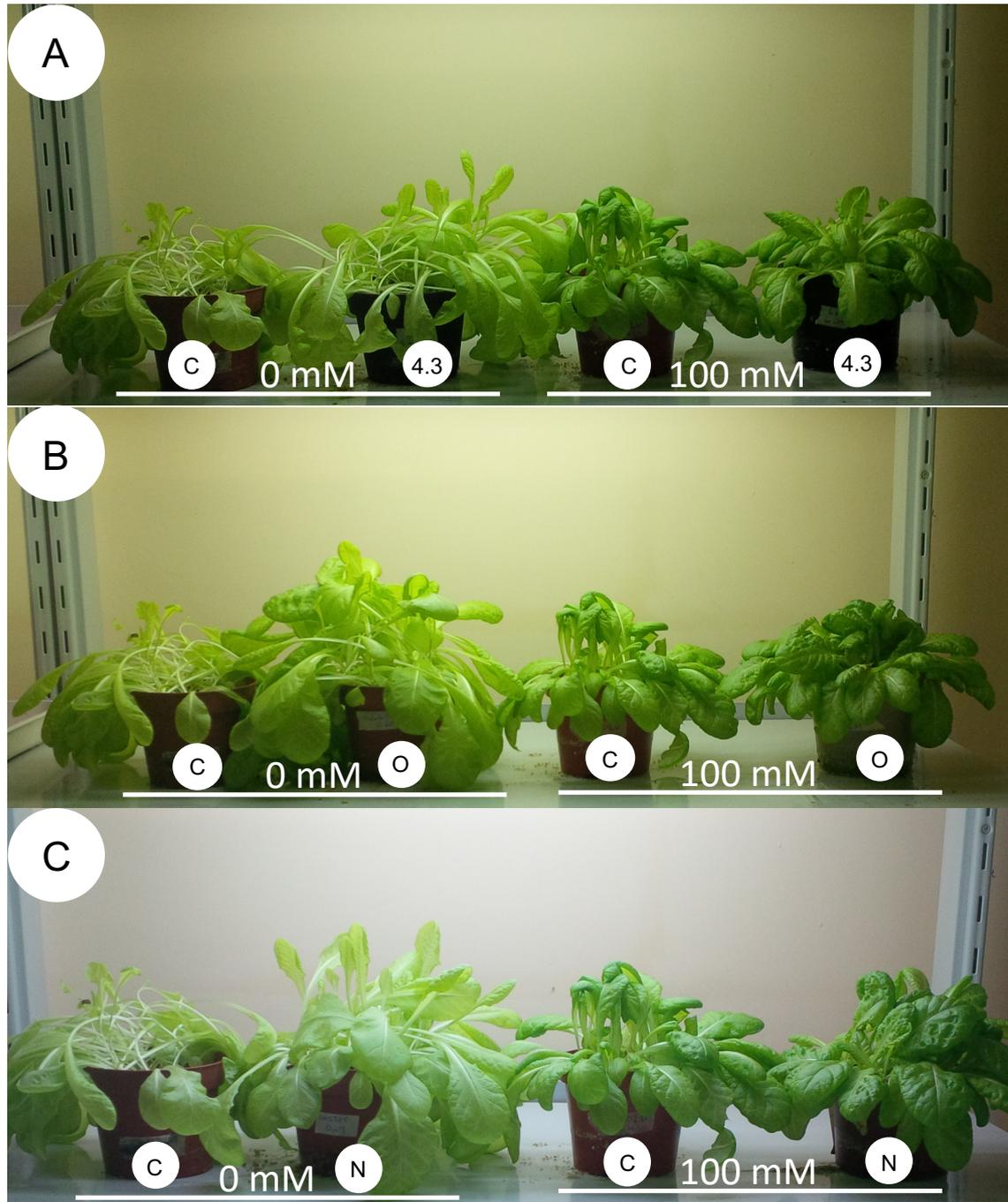


Figura 11- Alfaces crescidas em co-cultura com algas e cianobactérias na ausência (0mM) ou presença (100mM) de NaCl. A -cultura 4.3; B – *Oculatella* (O)C – *Nostoc* (N). A Figura ilustra os resultados obtidos em um dos três ensaios independentes realizados

Relativamente ao peso fresco, na ausência de solução salina as plantas co-cultivadas com *Oculatella sp.* mostraram um aumento de peso de cerca de 75% em relação ao respetivo controlo e as plantas co-cultivadas com *Nostoc sp.* um aumento próximo dos 50% (Figura 12 A). As plantas co-cultivadas com a cultura 4.3 não demonstraram alterações significativas havendo, no entanto, um ligeiro aumento do peso nas plantas co-cultivadas com esta cultura. Em oposição ao que havia sido observado

anteriormente, os resultados obtidos com a cultura 4.3, neste ensaio experimental não demonstram um efeito potenciador do crescimento. Nos estudos anteriores deste trabalho (secções 3.1 e 3.2) foram utilizados apenas os exsudados resultantes do crescimento das culturas mas, neste estudo foi utilizada uma co-cultura o que pode explicar os resultados indicando que a aplicação destas algas vivas pode causar um efeito adverso nas plantas. Em todas as situações de co-cultura, a salinidade afetou o peso fresco e o comprimento da parte aérea das plantas de forma semelhante (Figura 12 B), sendo que em nenhum dos casos a inoculação com as microalgas ou as cianobactérias conseguiu reverter a redução de crescimento provocada pela salinidade, notando-se, no entanto, um ligeiro aumento do crescimento (quer em termos de peso, quer em comprimento da parte aérea), não significativo, nas plantas co-cultivadas com *Nostoc sp.* e *Oculatella sp.*

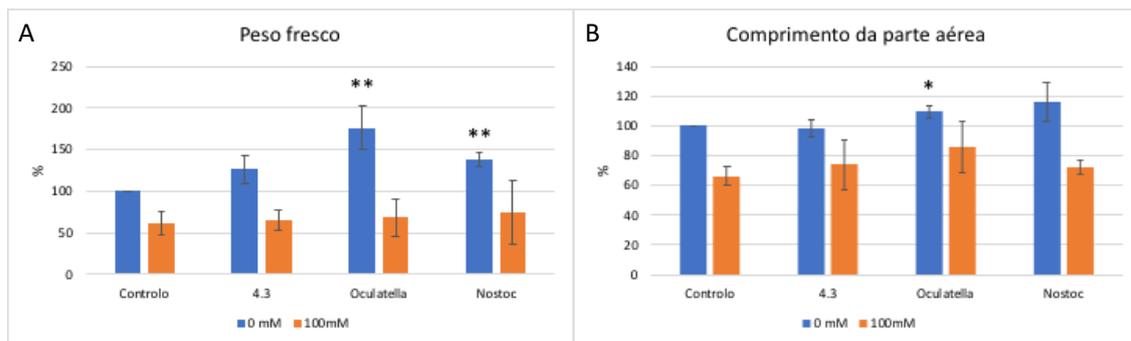


Figura 12 - Avaliação do efeito protetor dos isolados selecionados na situação de ausência (0mM) ou presença (100mM) de NaCl. A – Peso fresco médio das plantas; B- comprimento médio da parte aérea das plantas. As plantas cresceram em substrato, uma mistura de perlite + vermiculite (2:1), inoculado ou não com as com culturas selecionadas. As barras de erro representam desvios padrão. Nos gráficos, * indica diferenças significativas ($p < 0,05$) e ** indica diferenças significativas ($p < 0,01$) em relação ao controlo.

De modo a aferir o nível de *stress* a que as plantas estão sujeitas quando co-cultivadas com as microalgas e cianobactérias e avaliar o possível efeito protetor destes microrganismos na condição de *stress* salino, procedeu-se à quantificação da prolina, uma vez que se trata de um composto osmorregulador com função de defesa contra *stress* hídrico (Bandurska, 1993). Os resultados (Figura 13 A) mostram que em condições de salinidade, tal como seria esperado, os níveis de prolina aumentaram significativamente. Por oposição, a co-cultura com algas e cianobactérias na ausência de salinidade não provocou aumento dos níveis de prolina. Contudo, o nível de *stress* foi intensificado em situações de salinidade pela presença quer da cultura 4.3 quer do *Nostoc sp.* A co-cultura com *Oculatella sp.* diminuiu ligeiramente os níveis de prolina relativamente ao controlo em situação de salinidade, não sendo no entanto os

resultados significativos. Este resultado poderá apontar para um efeito protector contra o *stress* salino do co-cultivo das plantas com esta cianobactéria, sendo no entanto necessário confirmação destes resultados

Com o objectivo de avaliar o estado nutricional e a produtividade das plantas em situação de *stress* salino e na presença dos microrganismo, avaliou-se a actividade da glutamina sintetase (GS). Verificou-se que este parâmetro não foi influenciado significativamente pela presença dos organismos fotoautotrofos à exceção nas plantas tratadas com *Nostoc* e, verificando-se no entanto um ligeiro aumento nas plantas co-cultivadas com *Oculatella*, de forma coincidente com o maior crescimento e melhor aspeto observado anteriormente nestas plantas (Figura 11). A salinidade aumentou a actividade da GS, situação semelhante ao descrito noutras situações de *stress* salino (Silveira *et al.*, 2003).

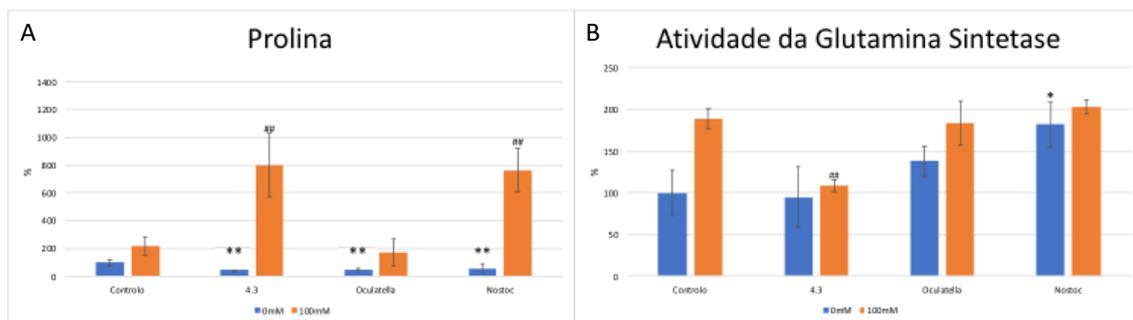


Figura 13 - Avaliação do efeito protector dos isolados seleccionados na situação de ausência (0mM) e presença (100mM) de NaCl. A – Quantificação da prolina; B- Atividade da glutamina sintetase. As plantas cresceram em substrato, uma mistura de perlite + vermiculite (2:1), inoculado ou não com as com culturas seleccionadas. Comparativamente ao controlo sem sal, * indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) e ** indica uma diferença significativa ($p < 0,01$). Comparativamente ao controlo com sal, ## indica uma diferença significativa ($p < 0,01$).

Foram ainda realizados estudos relacionados com a fotossíntese e de que forma esta é afetada pela presença de sal e pela presença de cianobactérias e microalgas seleccionadas. Não se verificaram diferenças significativas na taxa de fotossíntese entre os diferentes tratamentos, com e sem sal e com ou sem co-cultivo com algas e cianobactérias usando o irga LI-COR 6400 (Figura 14-A). A fotossíntese efetiva, ou eficiência do fotossistema II, mostra o estado real da cadeia de eletrões nos tilacoides, ou seja, a quantidade de eletrões presentes na cadeia. Este parâmetro não mostrou ser afetado pela salinidade à exceção das plantas que foram co-cultivadas com *Nostoc*, que foram afetadas negativamente (Figura 14-B). A presença de *Oculatella* e *Nostoc* mostrou um aumento face à situação controlo e ao co-cultivo com a amostra 4.3 em situação de ausência de salinidade (Figura 14-B). Relativamente à fotossíntese potencial ou eficiência máxima do fotossistema II, nas situações de ausência de salinidade não se registaram diferenças significativas quanto à eficiência máxima do fotossistema II entre os vários co-cultivos, no entanto, em situação de salinidade as

plantas crescidas em co-cultura que registam valores superiores face ao controlo (Figura 14-C). As plantas não apresentam diferenças em relação ao teor de clorofilas *a* e *b*, entre as diferentes situações de co-cultivo, quer na presença, quer na ausência de sal, no entanto, a presença de sal faz com que exista um aumento de clorofila *a* em todas as situações (Figura 14-D e E), confirmando o aumento da cor verde observada (Figura 11). Relativamente à taxa de transpiração (Figura 14-F) observou-se que na ausência de sal, as plantas crescidas com *Oculatella*, apresentam uma maior taxa de transpiração e que, na presença de sal, a taxa de transpiração diminuiu em todas as situações de co-cultivo e especialmente nas tratadas com *Nostoc*. Na situação de ausência de sal, a condutância estomática não é alterada à exceção das plantas co-cultivadas com *Oculatella* em que estas apresentam uma condutância estomática superior. A presença de sal afeta a condutância estomática; face à situação controlo as plantas crescidas na presença de sal apresentam uma condutância estomática inferior (Figura 14-G). Nas plantas crescidas na ausência de sal, apenas as plantas co-cultivadas com o *Nostoc* apresentam um aumento na concentração intracelular de CO₂. A presença de sal promove um aumento da concentração intracelular de CO₂ à exceção das plantas que foram co-cultivadas com a amostra 4.3 que mostram uma diminuição da concentração deste gás no espaço intracelular (Figura 14-H).

Os resultados obtidos na taxa de transpiração e condutância estomática, estão de acordo com estudos semelhantes em plantas de arroz (Moradi e Ismail, 2007) em que a presença de sal provoca uma diminuição nestes dois parâmetros. Em plantas suscetíveis ao sal, o teor de clorofilas tende para diminuir e em plantas tolerantes ao sal, este tende para aumentar (Sudhir e Murthy, 2004) assim, podemos dizer que esta cultivar de alface, tolera o sal.

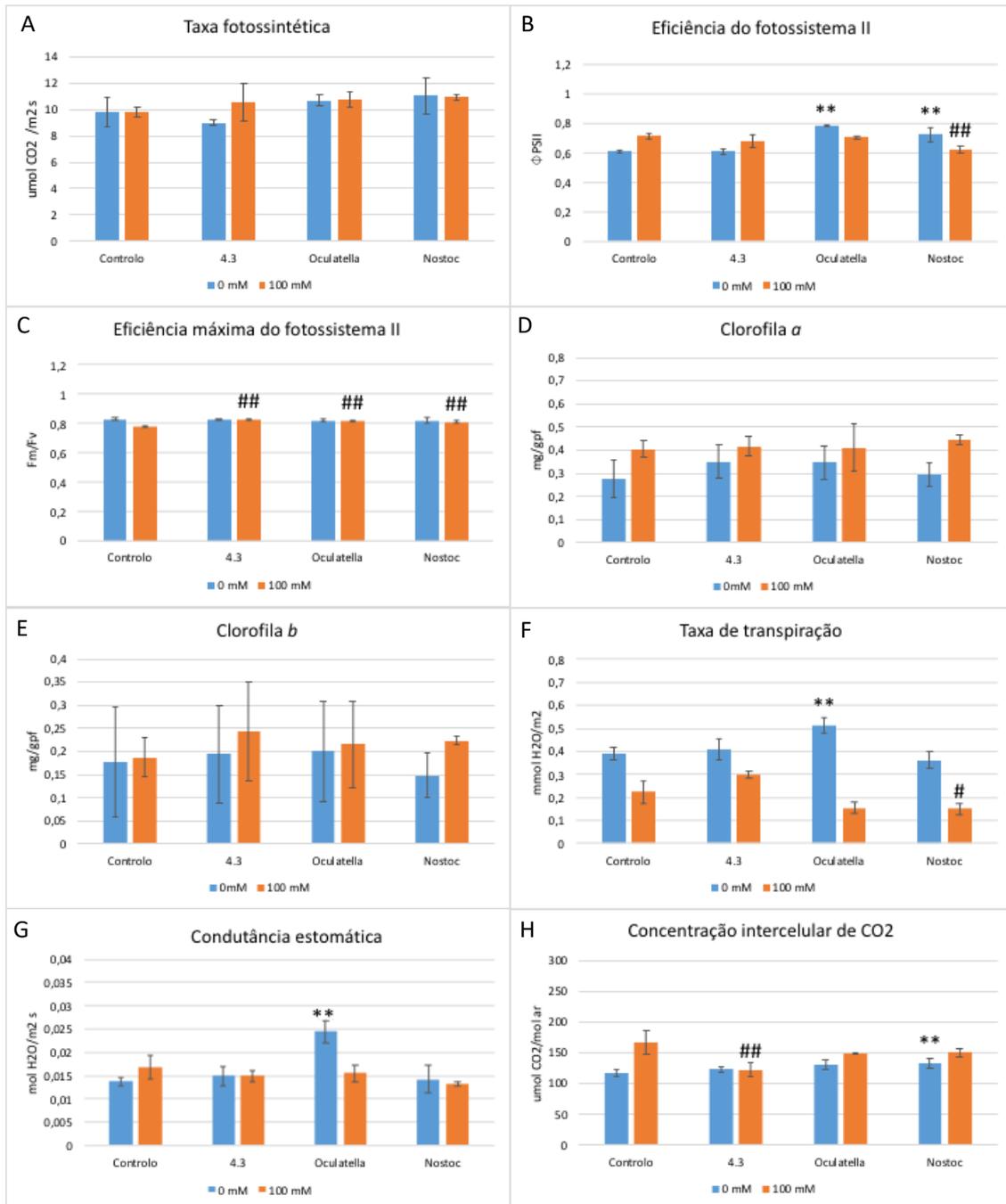


Figura 14 - Avaliação do efeito protetor dos isolados selecionados na situação de ausência (0mM) e presença (100mM) de NaCl. A – Taxa fotossintética; B – Eficiência do Fotossistema II ;C – Eficiência máxima do fotossistema II ;D – Quantificação do teor de clorofila a;E – Quantificação do teor de clorofila b ;F – Taxa de respiração;G – Condutância estomática;H – Concentração intracelular de CO_2 . As plantas cresceram em substrato, uma mistura de perlite + vermiculite (2:1), inoculado ou não com as culturas seleccionadas e tratadas ou não com sal. Em relação ao controlo sem sal, os asteriscos indicam diferenças significativas nas situações de co-cultivo (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Em relação ao controlo com sal, os cardinais indicam diferenças significativas nas situações de co-cultivo (# $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$).

Estudos realizados em laboratório indicam que a alface (*Lactuca sativa*) é moderadamente sensível ao *stress* salino (Ayers *et al.*, 1951) enquanto estudos conduzidos no campo indicam que a alface é tolerante ao *stress* salino (Pasternak *et al.*, 1986).

Os resultados obtidos quanto ao crescimento das plantas, (Figura 12 A e B), foram consistentes com resultados obtidos por Al-Maskari e o seu grupo em 2010, ou seja, as melhores taxas de crescimento foram obtidas na situação e salinidade de 0 mM e o menor crescimento registado na situação de crescimento de presença de sal. Tendo em conta a forma de como a presença excessiva de sódio influencia as plantas, os resultados são os espectáveis.

Pensa-se que a prolina é responsável por desempenhar uma função protetora de enzimas e de membranas (Bandurska, 1993), assim em condições de *stress* é espectável que a acumulação deste aminoácido seja superior. Nos estudos realizados neste trabalho em nenhuma das situações a presença dos isolados selecionados influenciou de forma significativa os resultados da quantificação da prolina face ao controlo na presença de sal, pelo que não se pode concluir que as estirpes selecionadas conferem proteção neste tipo de *stress*. No entanto é possível verificar que nos tratamentos onde se verificam os valores mais baixos deste aminoácido, também são os que apresentam valores da atividade da GS mais elevados, bem como melhor aspeto em geral na presença de sal mostrando assim que as plantas tratadas com esse isolado, *Oculatella*, se mostram em melhores condições fisiológicas na presença de *stress* salino. Será no entanto necessário repetir esta experiência para demonstrar o efeito desta cianobactéria na protecção contra *stress* salino.

Em situação de co-cultivo com *Oculatella* (e na ausência de sal) observou-se um melhor aspeto geral das plantas, acompanhado de aumento do peso fresco, da actividade da glutamina sintetase e de alguns parâmetros fotossintéticos, e uma diminuição dos níveis de prolina. Estes resultados apontam para um efeito benéfico do co-cultivo das plantas de alface com esta cianobactérias. No entanto, o mesmo resultado não se verificou no ensaio em placas talvez pelo período de crescimento ser demasiado curto para se registarem resultados significativos. É de notar ainda que a cultura 4.3 não mostrou, nesta experiência, o mesmo efeito que nas placas e hidroponia. Este resultado pode ser explicado por neste estudo serem utilizadas as algas e não os exsudados da cultura, ou seja, a presença das algas afetou de algum modo os efeitos obtidos através dos seu exsudados.

3.5. Avaliação do papel dos isolados de microrganismos do solo nas propriedades físico-químicas e bioquímicas da matriz

Para avaliação do papel dos isolados de microrganismos do solo como condicionadores da qualidade desta matriz foram testadas as culturas 1.1, 1.4, 4.2 e 4.3. As culturas 1.1 e 1.4 foram identificados em estudos paralelos no laboratório como pertencentes ao género *Nostoc* sp. (1.4) capaz de fixar azoto, e ao género *Oculatella* (1.1). A cultura 4.2, foi identificada como composta maioritariamente por microalgas do género *Klebsormidium* que foi selecionado pela sua morfologia, filamentosa.

Seis meses após inoculação, os solos apresentavam crostas biológicas de cor verde na parte mais superficial como é possível observar na Figura 15.



Figura 15 - Solo inoculado com espécies selecionadas. A- 4.2.; B – 1.1(*Oculatella*); C – 1.4. (*Nostoc*).

3.5.1. Parâmetros físico-químicos do solo

No que refere aos parâmetros físico-químicos do solo (Figura 16), registaram-se diferenças significativas entre tratamentos para o conteúdo em matéria orgânica do solo, na capacidade de retenção da água, no pH e na condutividade (Tabela 4). Com base na Figura 16, verifica-se que o isolado de *Oculatella* não teve qualquer efeito significativo em nenhuma das propriedades do solo agrícola avaliado. A cianobactéria *Nostoc*, mostrou ter alguma capacidade de aumentar o conteúdo em matéria orgânica do solo, mas não afetou de forma significativa os restantes parâmetros. A alga *Klebsormidium*, demonstrou ser capaz de aumentar a quantidade de matéria orgânica e a capacidade de retenção de água do solo. Apesar de não se ter observado nenhuma crosta visível no solo do controlo de obscuridade, tal como era esperado, os resultados obtidos sugerem que as condições de escuridão e de humidade, já que este solo retinha mais água por estar coberto, favoreceram de forma significativa o aumento do conteúdo em matéria orgânica e subsequentemente a capacidade de retenção de água no solo, provavelmente devido ao aparecimento de fungos que foi registado.

Tabela 4 – Resultados da ANOVA de uma via efetuada para avaliar o efeito dos isolados nos parâmetros físico-químicos do solo agrícola.

	F	GL	p
Matéria Orgânica	11,288	10,14	0,001
Densidade	2,074	10,14	0,159
Capacidade de retenção de água	16,088	10,14	0,000
pH	10,484	10,14	0,001
Condutividade	8,467	10,14	0,003

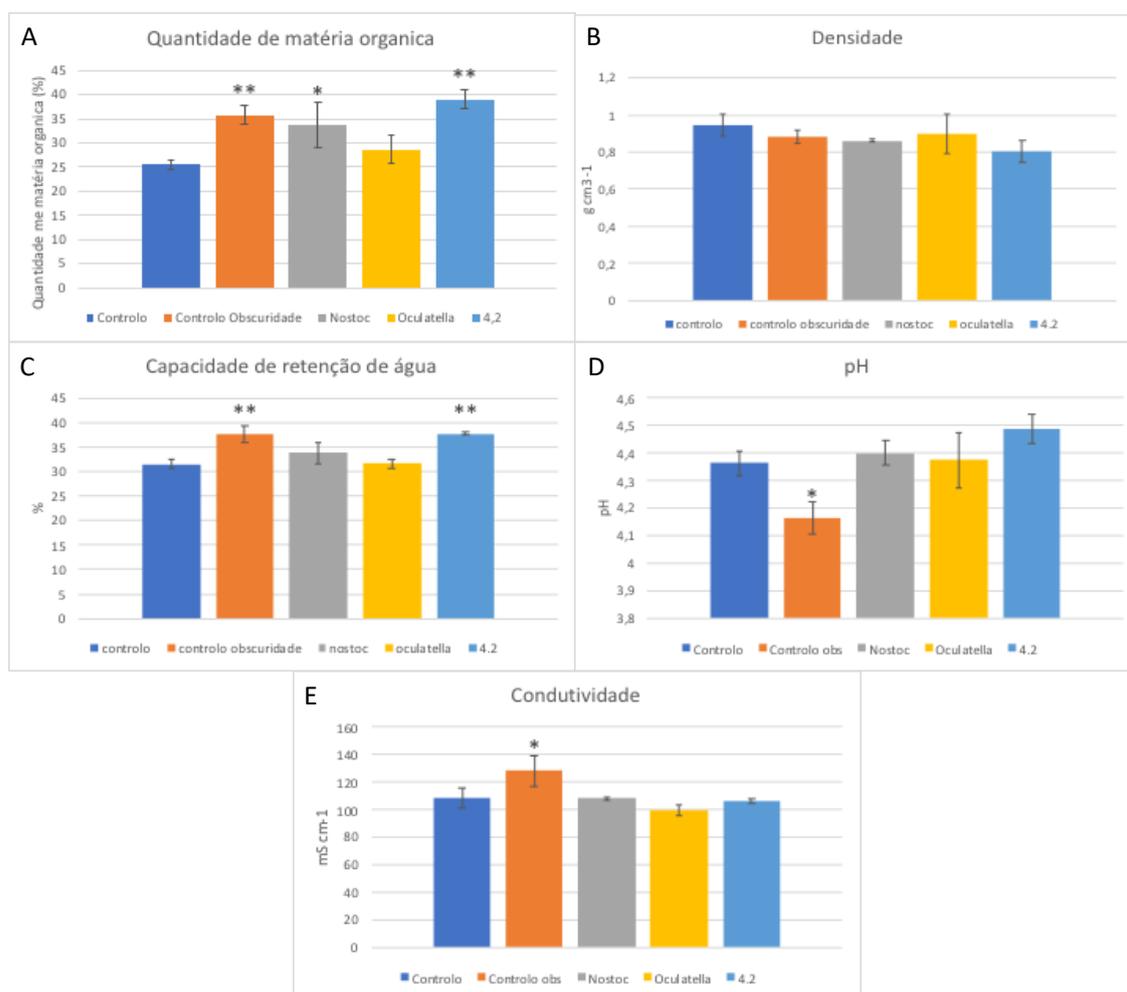


Figura 16 – Variação média das propriedades físico-químicas do solo agrícola nos controlos (à luz e em abuscridade) e nos tratamentos com os três isolados de microrganismos do solo estudados. A – Conteúdo em matéria orgânica; B - Densidade; C -Capacidade de retenção de água; D – pH; E – Condutividade elétrica. As barras de erro representam o desvio padrão das réplicas do ensaio e os asteriscos, as diferenças relativamente ao controlo com luz. *, **, significa $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respetivamente.

Do mesmo modo, o aumento da condutividade resultou do excesso de água no solo deste controlo na obscuridade que promoveu a solubilização de forma iónicas. Os solos compactados são menos porosos e conseqüentemente, os poros são também mais pequenos (Kooistra e Tovey, 1994). Para um menor número de poros, a proporção

de poros com ar diminui (Stepniewski *et al.*, 1994) causando problemas de arejamento do solo e alteração dos processos biológicos (Brussaard e Van Faassen, 1994). Se a densidade for elevada, o crescimento de raízes pode também ser limitado (Logsdon e Karlen, 2004). A capacidade máxima de retenção de água e a quantidade de matéria orgânica estão assim intimamente interligadas na medida em que a presença de matéria orgânica favorece o desenvolvimento de poros no solo entre os agregados de diversas dimensões que se formam, facilitando a passagem de água. Os resultados obtidos refletem exactamente esta correlação. Para todos os solos analisados, o pH situava-se na gama de valores considerados fortemente ácidos ($\leq 4,5$). A avaliação do pH do solo, é importante pois, dependendo do valor do pH, a solubilidade de nutrientes e atividade microbianas são influenciadas (Smith e Doran, 1996). A condutividade elétrica de um solo, está dependente da concentração de sais no solo e da sua composição química. Assim, pode-se aferir que a presença dos isolados seleccionados não alterou a quantidade de iões presente no solo (Smith e Doran, 1996).

3.5.2 Parâmetros bioquímicos do solo

Quanto aos parâmetros bioquímicos do solo verificou-se que apenas a atividade das desidrogenases e da urease foram afetadas de forma significativa pela presença de alguns inóculos com microrganismos do solo. A atividade das desidrogenases foi significativamente aumentada na presença de *Nostoc* e do *Klebsormidium* (Figura 17, Tabela 5). A atividade da urease foi significativamente aumentada na presença de *Klebsormidium*, comparativamente ao controlo de luz. Por oposição a atividade desta enzima do ciclo do azoto foi inibida no controlo de obscuridade.

Tabela 5- Resultados da ANOVA de uma via efetuada para avaliar o efeito dos isolados nos parâmetros bioquímicos do solo agrícola.

	F	GL	p
Desidrogenase	7,678	10,14	0,004
Arilsulfatase	2,553	10,14	0,104
Fosfatase	2,337	10,14	0,126
Urease	18,313	10,14	0,000
Mineralização	1,812	10,14	0,203
Nitrificação Potencial	15,881	10,14	0,000

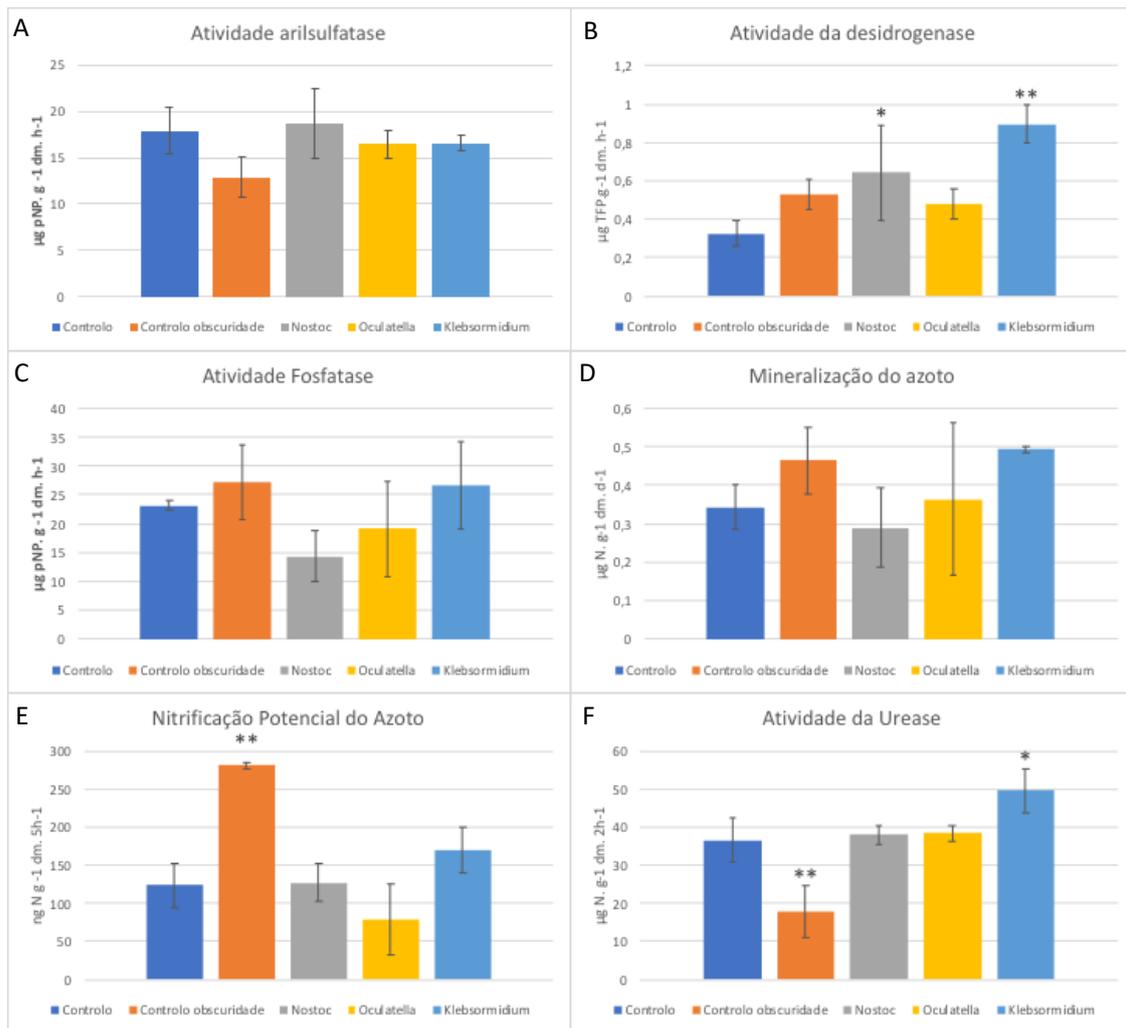


Figura 17 - Valores médios de atividade enzimática do solo nos controlos à luz e na obscuridade e diferentes tratamentos com inóculos. A- Atividade da aril sulfatase; B Atividade da desidrogenase; C - Atividade da fosfatase; D - Mineralização do azoto; E - Nitrificação potencial; F Atividade da Urease. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e os asteriscos marcam diferenças significativas relativamente ao controlo com luz. (* para $p < 0,05$, e ** para $p < 0,01$, respetivamente).

Registaram-se diferenças significativas na atividade das desidrogenases, nitrificação potencial e na atividade da urease. Sendo as desidrogenases enzimas que oxidam a matéria orgânica do solo e que se degradam após a morte celular (Pereira *et al.*, 2006), estas são, de uma forma indireta, um ótimo indicador da biomassa microbiana metabolicamente ativa do solo (Taylor *et al.*, 2002). Os resultados obtidos em alguns dos tratamentos, mostram que a inoculação com *Nostoc* e *Klebsormidium*, favoreceram atividade metabólica dos microrganismos do solo.

A espécie *Klebsormidium sp.*, demonstrou características favoráveis para melhorias na qualidade de solos. Esta espécie, foi capaz de promover a capacidade de retenção de água, a quantidade de matéria orgânica disponível e promoveu a atividade

microbiana do solo. Também o isolado de *Nostoc sp* utilizado, demonstrou resultados positivos nomeadamente promovendo o aumento de matéria orgânica do solo e da atividade microbiana no solo, para além da sua capacidade de fixação de azoto. Assim, a aplicação destas espécies, em solos degradados, pode conduzir a uma recuperação desses solos para uso agrícola.

Os resultados obtidos na nitrificação potencial, podem ser explicados pela presença de fungos observados no solo.

Conclusão

Os estudos efetuados neste trabalho tiveram como objetivo isolar e identificar algas e cianobactérias nativas de solos portugueses como promotoras do crescimento das plantas, como protetoras de plantas em condições de *stress* salino e como melhoradoras da estrutura do solo. Para isso procedeu-se a um rastreio de diversas amostras recolhidas em diversos pontos do país para seleccionar aquelas que seriam capazes de favorecer o crescimento das plantas. De todas as amostras recolhidas foram testadas as amostras 4.3, *Oculatella sp.* e *Nostoc sp.* para testar o seu efeito contra o *stress* salino. E por fim, foram seleccionadas as amostras de *Klebsormidium sp.*, *Oculatella sp.* e *Nostoc sp.* Para se perceber de que forma a sua presença no solo, influenciava as características do mesmo.

Neste estudo foi isolada uma cultura algal heterogénea nativa de um solo português capaz de promover o aumento de peso fresco das plantas, sem no entanto alterar o seu peso seco ou comprimento de raízes partes aéreas, nem o seu metabolismo. Os efeitos observados podem potencialmente ser atribuídos à excreção pelos componentes microbianos da cultura de substâncias com um papel semelhante ao da auxina na extensibilidade da parede celular e no crescimento por aumento dos teores em água. O efeito desta cultura foi testada em situações de hidroponia, abrindo caminho à sua utilização nesta condição agrícolas atualmente em expansão no nosso país. A espécie *Micractinium inermum*, aparenta ter sido responsável pelo efeito promotor no crescimento das plantas, no entanto, são necessários mais estudos para se comprovar o seu efeito.

Os resultados da avaliação do efeito protetor dos isolados contra o *stress* salino, não foram conclusivos. A co-cultura com *Oculatella sp.* e *Nostoc sp.* poderá proteger as plantas contra o *stress* causado pelo excesso de sal, uma vez na situação sem sal ambas as cianobactérias demonstram ser capaz de potenciar o crescimento das plantas, bem como aumentarem actividade da GS, ainda que na presença de sal, o seu efeito não seja tão notório, não sendo os resultados significativos. A avaliação das plantas co-cultivadas com *Oculatella sp.* mostraram que o seu nível de *stress* é baixo na situação sem sal e ligeiramente inferior ao controlo sem inóculo na presença de sal, o que aliado aos resultados relativos aos crescimentos das plantas co-cultivadas em presença de sal faz destas cianobactérias objecto de estudos futuros e mais aprofundados.

A utilização das espécies seleccionadas como condicionadores do solo, teve resultados positivos e mostrou que o *Klebsormidium sp.*, uma alga verde filamentosa é

uma ótima espécie para melhoria na qualidade do solo. Para além de melhorias na quantidade de matéria orgânica do solo, promoveu o aumento da capacidade de retenção de água. O isolado de *Nostoc sp* utilizado, para além da capacidade de fixação de azoto reconhecida, também fez com que houvesse um aumento de matéria orgânica do solo e promoveu a atividade microbiana no solo. Em suma, quer as microalgas quer as nativas poderão vir a ter uma utilidade na recuperação de solos portugueses degradados, nomeadamente solos queimados.

Este trabalho contribuirá para o desenvolvimento de uma formulação baseada em cianobactérias e microalgas nativas, otimizada para ser utilizada como biofertilizante em solos portugueses. É um projecto de grande importância para o sector agrícola português, uma vez que identifica cianobactérias e microalgas presentes nos solos agrícolas portugueses, revelando assim um conjunto de microrganismos nativos com potencial para serem aplicados no solo como biofertilizantes, melhorando a fertilidade dos solos e a qualidade ambiental. Estes microrganismos poderão vir a ser usado em práticas de gestão agrícola sustentável, de baixo custo e amigas do ambiente, abrindo novos caminhos para aumentar a qualidade e a produtividade das culturas em Portugal.

Referências Bibliográficas

Al-Maskari A, Al-Kharusi L, Al-Miqbali H, Khan M (2010) Effects of Salinity Stress on Growth of Lettuce (*Lactuca sativa*) under Closed-recycle Nutrient Film Technique. *Int J Agric Biol* **12**: 377–380

Amaro H, Fernandes F, Valentão P, Andrade P, Sousa-Pinto I, Malcata F, Guedes A (2015) Effect of Solvent System on Extractability of Lipidic Components of *Scenedesmus obliquus* (M2-1) and *Gloeotheca* sp. on Antioxidant Scavenging Capacity Thereof. *Mar. Drugs* **13**: 6453-6471

Ayers A D, Wadleigh C H, Bernstein L (1951) Salt tolerance of six varieties of lettuce. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **57**: 237-242

Bandurska H (1993) *In vivo* and *in vitro* effect of proline on nitrate reductase activity under osmotic stress in barley. *Acta Physiol. Plant* **15**: 83–88

Barone V, Baglieri A, Stevanato P, Broccanello C, Bertoldo G, Bertaggia M, Cagnin M, Pizzeghello D, Moliterni V, Mandolino G (2017) Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J Appl. Phycol.* **30**: 1061-1071

Bates L S, Waldren R P, Teare I D (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**: 205-207

Belnap J, Gardner J S (1993) Soil microstructure in Soils of the Colorado Plateau: The role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Gt. Basin Nat.* **53**: 40–47

Belnap J, Prasse R, Harper K T (2001) Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management, Influence of Biological Soil Crusts on Soil Environments and Vascular Plants. *Ecol. Stud.* 281–300, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Berendsen R L, Pieterse C, Bakker P (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant. Sci.* **17**: 478–486

Berruti A, Lumini E, Balestrini R, Bianciotto V (2016) Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: Let's benefit from past successes. *Front Microbiol.* **6**: 1–13

Bhardwaj D, Ansari M W, Sahoo R K, Tuteja N (2014) Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb. Cell Fact.* **13**: 1–10

Black C A (1968) Soil-plant relationships. John Wiley, New York Boeken B, Shachak M (1994) Desert plant communities in human-made patches – implications for management. *Ecol Appl* **4**: 702–716

Bocchi S, Malgioglio A (2010) *Azolla-Anabaena* as a Biofertilizer for Rice Paddy Fields in the Po Valley, a Temperate Rice Area in Northern Italy. *Int. J. Agron.* **2010**: 1–5

Bolaños J A, Longstreth D J (1984) Salinity effects on water potential components and bulk elastic modulus of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *Plant Physiol.* **75**: 281–284

Bond R D, Harris J R (1964) The Influence of the Microflora on Physical Properties of Soils. *Aust J Soil Res* **2**: 111–22

Borowitzka M (1995) Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds, *J Appl Phycol* **7**: 3-15

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

Brussaard L, Van Faassen H G (1994) Effects of compaction on soil biota and soil biological processes. In: Soane, B.D., Van Ouwerkerk, C. (Eds.), Soil Compaction in Crop Production. Elsevier, New York, 215–235

Burney J A, Davis S J, Lobell D B (2010) Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:12052–12057

CCE (2006) Comunicação da comissão ao conselho, ao parlamento europeu, ao comité económico e social europeu e ao comité das regiões, Bruxelas, 22.9.2006, Estratégia temática de protecção do solo

Chamizo S, Cantón, Y, Rodríguez-Caballero E and Domingo F (2016) Biocrusts positively affect the soil water balance in semiarid ecosystems. *Ecohydrology* **9**: 1208–1221.

Choudhury A, Kennedy I R (2004) Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biol Fertil Soils* **39**: 219– 227

Colica G, Li H, Rossi F, Li D, Liu Y, De Philippis R (2014) Microbial secreted exopolysaccharides affect the hydrological behavior of induced biological soil crusts in desert sandy soils. *Soil Biol Biochem* **68**: 62–70

Costacurta A, Vanderleyden J (1995) Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol* **21**: 1–18

Cullimore J V, Sims A P (1980) An association between photorespiration and protein catabolism: Studies with *Chlamydomonas*. *Planta* **150**: 392–396

Dewis J, Freitas F (1984) Physical and chemical methods of soil and water analysis. FAO/UN-Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Soils Bulletin **10**. Rome, Italy.

Dirzo R, Raven PH (2003) Global state of biodiversity and loss. *Annu Rev Environ Resour* **28**: 37–167

Eckert R E, Peterson F F, Meurisse M S, Stephens J L (1986) Effects of soil-surface morphology on emergence and survival of seedlings in big sagebrush communities. *J Range Manage* **39**: 414–420

Eivazi F, Tabatabai M A (1977) Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem* **9**:167-172

Faheed FA (2008) Effect of *Chlorella vulgaris* as Bio-fertilizer on Growth Parameters and Metabolic Aspects of Lettuce Plant. *J Agri Soc Sci* **4**: 1813–2235

FAO (2009) How to Feed the World in 2050. Insights from an Expert Meet FAO **2050**: 1– 35

FAO, FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, acessado em 30 de setembro de 2018

Flores-Félix J D, Menéndez E, Rivera L P, Marcos-García M, Martínez-Hidalgo P, Mateos P F, Martínez-Molina E, Velázquez M, García-Fraile P, Rivas R (2013) Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J Plant Nutr Soil Sci* **176**: 876–882

Garcia-Gonzalez J (2014) Evaluation of Potential Agricultural Applications of the Microalga *Scenedesmus dimorphus*. Ms Thesis, Arizona State University

Geesey G, Jang L (1990) Extracellular polymers for metal binding. In: Ehrlich HL, Brierley CL (eds) *Microbial mineral recovery*. McGraw-Hill, New York, 223–247

Gerland P, Raftery A E, Sevcikova H, Li N, Gu D, Spoorenberg T, Alkema L, Fosdick B K, Chunn J, Lalic N, Bay G, Buettner T, Heilig G K, Wilmoth J (2014) World population stabilization unlikely this century. *Science* **346**: 234–237.

Greene B, Darnall D W (1990) Microbial oxygenic photoautotrophs (cyanobacteria and algae) for metal-ion binding. In: Ehrlich HL, Brierley CL (eds) *Microbial mineral recovery*. McGraw-Hill, New York, 277–302

Guedes A, Amaro H, Pereira R, Malcata F (2011) Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biotechnol Prog* **27**: 1218-1224

Hagemann M (2011) Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 87–123.

Harper JL (1977) *Population biology of plants*. Academic Press, New York

Harper KT, St. Clair LL (1985) Cryptogamic soil crusts on arid and semiarid rangelands in Utah: effects on seedling establishment and soil stability. Dept Botany Range Sci, Brigham Young University, Provo, Utah

Hashtroudi, M S, Ghassempour A, Riahi H, Shariatmadari Z, Khanjir M (2013) Endogenous auxin in plant growth-promoting Cyanobacteria-*Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola*. *J Appl Phycol* **25**: 379–386

Hatfield J L, Prueger J H (2004) Impact of changing precipitation patterns on water quality. *J Soil Water Conserv* **59**: 51–58

Heath R L, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **125**: 189-198

Herd R (2010) Handbook of Agricultural Economics, eds Pingali P, Evenson R (Elsevier, Amsterdam), 3253–3304

Hoagland D and Arnon D (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station

Hu C, Liu Y, Song L, Zhang D (2002) Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands. *J Appl Phycol* **14**: 281–292

Hugerth L W, Muller E E L, Hu Y O O, Lebrun L A M, Roume H, Lundin D, Wilmes P, Andersson A F (2014) Systematic Design of 18S rRNA Gene Primers for Determining Eukaryotic Diversity in Microbial Consortia. *PLoS ONE* **9**: e95567

Ismail EG, Walid WM, Salah K, Fadia ES (2014) Effect of manure and bio-fertilizers on growth, yield, silymarin content, and protein expression profile of *Silybum marianum*. *Adv Agric Biol* **1**: 36-44

ISO/DIS (1998) Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2. Determination of effects on reproduction. Annex C. ISO/Dis 11268-2.2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Issa A A, Attitalla I H, El-Mesmary H M A (2012) A first report of fresh water algae at Suluq lake, Libya. *Tpcls J Microbiol* **1**: 18-24

Jafari T H, Đurić S (2003) Inoculation of Maize Hybrids: The Effect on Grain Yield and Number of Microorganisms in Soil. University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, 401–415

Jafari T H, Đurić S, Stamenov D (2016) Influence of green algae *Chlorella vulgaris* on initial growth of different agricultural crops. *J Nat Sci Novi Sad* **130**: 29– 33

Karl T R, Melillo J M, Peterson T C (2009) Global climate change impacts in the United States. Cambridge Univ. Press, New York

- Karthikeyan N, Prasanna R, Sood A, Jaiswal P, Nayak S, Kaushik B D** (2009) Physiological characterization and electron microscopic investigation of cyanobacteria associated with wheat rhizosphere. *Folia Microbiol* **54**: 43–51
- Kooistra M J, Tovey N K** (1994). Effects of compaction on soil microstructure. In: Soane, B.D., Van Ouwerkerk, C. (Eds.), *Soil Compaction in Crop Production*. Elsevier, New York, pp. 91–111
- Lababpour A**, (2016) Potentials of the microalgae inoculant in restoration of biological soil crusts to combat desertification, *Int J Environ Sci Technol* **13**: 2521-2532
- Lal R** (2001) Soil degradation by erosion *Land Degrad Develop* **12**: 519-539
- Lan S, Wu L, Yang H, Zhang D, Hu C** (2017) A new biofilm based microalgal cultivation approach on shifting sand surface for desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Bioresource Technol* **238**: 602–608
- Lange W** (1976) Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae. *Canad J Microbiol* **22**: 1181–1185
- Liu Y, Cockell C S, Wang G, Hu C, Chen L, De Philippis R** (2008) Control of Lunar and Martian Dust—Experimental Insights from Artificial and Natural Cyanobacterial and Algal Crusts in the Desert of Inner Mongolia, China. *Astrobiology* **8**: 75–86
- Logsdon S D, Karlen D L** (2004) Bulk density as a soil quality indicator during conversion to no-tillage, *Soil Tillage Res* **78**: 143–149
- Lu Y, Xu J** (2015) Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology. *Trends Plant Sci* **20**: 273–282
- Luo W, Pröschold T, Bock C, Krienitz L** (2010) Generic concept in Chlorella-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Plant Biol* **12**: 545-553
- Machado F, Dias C, Pinho P, Araújo A, Pinto D, Correia C, Santos C** (2017) Photosynthetic performance and volatile organic compounds profile in *Eucalyptus globulus* after UVB radiation. *Environ Exp Bot* **140**: 141-149.

Maestre F T, Bowker M A, Cantón Y, Castillo-Monroy A P, Cortina J, Escolar C, Escudero A, Lázaro R, Martínez I (2011) Ecology and functional roles of biological soil crusts in semi-arid ecosystems of Spain. *J. Arid Environ.* **75**: 1282-1291

Mandal B, Vlek P L G, Mandal L N (1999) Beneficial effects of blue-green algae and Azolla, excluding supplying nitrogen, on wetland rice fields: A review. *Biol Fertil Soils* **28**: 329–342

Mandal S, Mallick N (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 281–291

Mandotra S.K., Kumar P., Suseela M.R., Ramteke P.W. (2014) Fresh water green microalga *Scenedesmus abundans*: A potential feedstock for high quality biodiesel production. *Bioresour Technol* **156**: 42–47

Maqubela M P, Mnkeni P N S, Issa O M, Pardo M T, D'Acqui L P (2009) Nostoc cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. *Plant Soil* **315**: 79–92

Marsálek B., Zahradnickova H, Hronkova M (1992) Extracellular abscisic acid produced by cyanobacteria under salt stress. *J Plant Physiol* **139**: 506–508

Mason J (2004) Sustainable Agriculture. Second Edition. By J. Mason. Collingwood, Australia: Landlinks Press (2003), pp. 205. Exp Agric.

Massimi R, Kirkwood A (2016) Screening microalgae isolated from urban storm- and wastewater systems as feedstock for biofuel. *PeerJ* **4**:e2396

Meeks J C, Castenholz R W (1971) Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Arch Mikrobiol* **78**: 25 - 41

Mikhailyuk T I, Sluiman H J, Massalski A, Mudimu O, Demchenko E M, Kondratyuk S, Friedl T (2008) Biodiversity of Klebsormidium (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *J. Phycol* **44**: 1586–1603

Mohammadi K, Sohrabi Y (2012) Bacterial Biofertilizers for sustainable crop production: A review. *J Agric Biol Sci* **7**:307–316

Moradi F, Ismail A M (2007) Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice, *Ann Bot* **99**: 1161–1173

Mugnai G, Rossi F, Felde V J, Colesie C, Büdel B, Peth S, Kaplan A (2018) Development of the polysaccharidic matrix in biocrusts induced by a cyanobacterium inoculated in sand microcosms. *Biol Fert Soils* **54**: 27–40

Oancea F, Velea S, Mincea C, Ilie L (2013) Micro-Algae Based Plant Biostimulant and Its Effect on Water. *Rom J Plant Prot* **VI**: 104–117

Odjadjare E C, Mutanda T, Olaniran A (2015) Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Crit Rev Biotechnol* **37**: 37-52

Oertli J (1986) Exogenous application of vitamins as regulators for growth and development of plants - a review. *Pflanzenenahr Boden* **150**: 375-391

Ördög V, Stirk W A, Lenobel R, Bancírová M, Strnad M, van Staden J, Szigeti J, L. Németh L (2004) Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J Appl Phycol* **16**: 309–314

Osman M, El-Sheekh M, El-Naggar A, Gheda S (2010) Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biol Fert Soils* **46**: 861–875

Park C H, Li X R, Zhao Y, Jia, R L, Hur J S (2017) Rapid development of cyanobacterial crust in the field for combating desertification. *PLoS ONE* **12**:e0179903

Pasternak D, De Malach Y, Borovic I, Shram M, Aviram C (1986) Irrigation with brackish water under desert conditions. IV. Salt tolerance studies with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agric Water Manage* **11**: 303-311

Pereira R, Sousa J P, Ribeiro R, Gonçalves F (2006) Microbial indicators in mine soils (S. Domingos Mine, Portugal). *Soil Sediment Contam* **15**: 147–167

Pingali P (2012) Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**: 12302–12308

Prasanna R, Jaiswal P, Kaushik BD (2008) Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability — promises and challenges. *Indian J Microbiol* **48**: 297–297

Prasanna R, Joshi M, Rana A, Nain L (2010) Modulation of IAA production in cyanobacteria by tryptophan and light. *Polish J Microbiol* **59**: 99–105

Prasanna R, Sood A, Ratha SK, K. Singh P (2013) *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, Cyanobacteria as a “green” option for sustainable agriculture 145–166, John Wiley & Sons, Ltd.

Pretty J, Brett C, Gee D, Hine R, Mason C, Morrison J, Rayment M, Van Der Bijl G, and Dobbs T (2001) Policy Challenges and Priorities for Internalizing the Externalities of Modern Agriculture. *J Environ Plann* **44**: 263–283

Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**: 635–648

Richards J F (1991) Land transformation. In *The Earth as Transformed by Human Action: Global and Regional Changes in Biosphere Over the Past 300 Years*, Turner BL, Clark WC, Kate RW, Richards JF, Mathews JT, Mayer WB eds). Cambridge University Press: New York; 163-178

Rodgers G A, Bergman B, Henriksson U, Udris M (1979) Utilisation of blue green algae as biofertilisers. *Plant Soil* **52**: 99–107

Rodríguez-Caballero E, Cantón Y, Chamizo S, Afana A, Solé- Benet A (2012) Effects of biological soil crusts on surface roughness and implications for runoff and erosion. *Geomorphology* **145–146**: 81–89

Rosenzweig C, Tubiello F N, Goldberg R, Mills E, Bloom J (2002) Increased crop damage in the US from excess precipitation under climate change. *Glob Environ Change* **12**:197–202

Sahoo R K, Bhardwaj D, Tuteja N (2013) Biofertilizers: a sustainable eco-friendly agricultural approach to crop improvement. In *Plant Acclimation to Environmental Stress* Editado por Tuteja N, Gill SS. LLC 233 Spring Street, New York, 10013, USA: Springer Science plus Business Media; 403–432

Schlenker W, Roberts M J (2009) Nonlinear temperature effects indicate severe damages to U.S. crop yields under climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 15594–15598

Seipke RF, Kaltenpoth M, Hutchings M I (2012) Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 862–876

Sergeeva E, Liaimer A, Bergman B (2002) Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* **215**: 229–238

Sharma NK, Tiwari SP, Tripathi K, Rai AK (2011) Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): Facts and challenges. *J Appl Phycol* **23**: 1059–1081

Shi Y, Lou K, Li C (2009) Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol Fertil Soils* **45**: 645–653

Silveira J, Viégas R, Rocha I, Moreira A, Moreira R, Oliveira J (2003) Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Plant Physiol.* **160**: 115–123

Sims D, Gamon J A (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens Environ* **81**: 337-354

Singh J S, Kumar A, Rai A N, Singh D P (2016) Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability. *Front Microbiol* **7**: 529

Singh S (2014) A review on possible elicitor molecules of cyanobacteria: Their role in improving plant growth and providing tolerance against biotic or abiotic stress. *J Appl Microbiol* **117**: 1221–1244

Singh V P, Trehan K (1973) Effect of extracellular products of *Aulosira fertilissima* on the growth of rice seedlings. *Plant Soil* **38**: 457–464

Smith A G, Croft M T, Moulin M, Webb M (2007) Plants need their vitamins too. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 266–275

Smith J L, Doran J W (1996) Measurement and use of pH and electrical conductivity for soil quality analysis. In *Methods for assessing soil quality* (Vol. 49). Soil Science Society of America Madison, WI.

Smith R T, Bangert K, Wilkinson S J, Gilmour D J (2015) Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass Bioenergy* **82**: 73-86

SPAC (2000) *Soil Analysis. Handbook of Reference Methods*. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Stanhill G, Cohen S (2001) Global dimming: A review of the evidence for a widespread and significant reduction in global radiation with discussion of its probable causes and possible agricultural consequences. *Agric For Meteorol* **107**: 255–278

Stepniewski W, Glinski J, Ball B C, (1994) Effects of compaction on soil aeration properties. In: Soane, B.D., Van Ouwerkerk, C. (Eds.), *Soil Compaction in Crop Production*. Elsevier, New York, pp. 167–169

Sudhir P, Murthy S D S (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* **42**: 481–486

Tabatabai M A, Bremner J M (1969) Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphate activity. *Soil Biol Biochem* **1**:31-307

Taiz L, Zeiger E, Møller I M, Murphy A (2015) *Plant Physiology and Development*, 6th edition, Sinauer Associates

Taylor J P, Wilson B, Mills M S, Burns R G (2002) Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol Biochem* **34**: 387 - 401

Temraleeva A D, Dronova S A, Moskalenko S V, Didovich S V (2016) Modern Methods for Isolation, Purification, and Cultivation of Soil Cyanobacteria. *Microbiology* **85**: 389–399

Thakmann A (1968) Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch Forsch* **21**: 249-258

Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort B L (2011) Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 20260–20264

Tsavkelova E A, Klimova S Y, Cherdyntseva T A, Netrusov A I (2006) Hormones and hormone-like substances of microorganisms: a review. *Appl Biochem Microbiol* **42**: 229–235

Vaishampayan A, Sinha R P, Hader D P, Dey T, Gupta A K, Bhan U, Rao AL (2002) Cyanobacterial biofertilizers in Rice Agriculture. *Bot Rev* **67**: 453–516

Varol M, Fucikova K (2015) Four New Records for the Freshwater Water Algae of Turkey. *Limnofish1*: 83-88

Verrecchia E, Yair A, Kidron GJ, Verrecchia K (1995) Physical properties of the psammophile cryptogamic crust and their consequences to the water regime of sandy soils, north-western Negev Desert, Israel. *J Arid Environ* **29**: 427–437

Vitousek P K, Abet J D, Howarth R W, Likens G E, Matson P A, Sehnfeller D W, Schlesinger W H, Timan D G (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle sources and consequences. *Ecol Appl* **7**: 737-750

Wang W, Liu Y, Li D, Hu C, Rao B (2009) Feasibility of cyanobacterial inoculation for biological soil crusts formation in desert area. *Soil Biol Biochem* **41**: 926–929

Watanabe I, Espians C R, Berja N S, Alimango B V (1977a) Utilization of Azolla-Anabaena complex as nitrogen fertilizer for rice. *Int Rice Res Inst Res Pap Ser* 115

Watanabe I, Lee K K, Alimagno B V (1977b) Biological nitrogen fixation in paddy field studies by in situ acetylene-reduction assays. *Int Rice Res Intitute Res Pap Ser* 1–16

Wu Y, Rao B, Wu P, Liu Y, Li G, Li D (2013) Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on top soil. *Plant Soil* **370**: 115–124

Zaady E, Katra I, Barkai D, Knoll Y, Sarig S (2017) The coupling effects of using coal fly-ash and bio-inoculant for rehabilitation of disturbed biocrusts in active sand dunes. *Land Degrad Dev* **28**: 1228–1236