

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E POTENCIAL
BIORREMEIADOR DE *Arthrospira* sp. (SITZENBERGER EX
GOMONT, 1892) NO TRATAMENTO DE EFLUENTES DE
PRODUÇÃO INTENSIVA DE CAMARÕES MARINHOS**

MARIANA HOLANDA PAES BARBOZA

RIO GRANDE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E POTENCIAL
BIORREMEIADOR DE *Arthrospira* sp. (SITZENBERGER EX
GOMONT, 1892) NO TRATAMENTO DE EFLUENTES DE
PRODUÇÃO INTENSIVA DE CAMARÕES MARINHOS**

Aluna: Mariana Holanda Paes Barboza

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Poersch

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo César Abreu

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande

Rio Grande, RS

Março de 2015

ATA DE APROVAÇÃO

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo Geral	vi
Abstract	viii
Introdução Geral	10
Objetivo Geral	15
Objetivos específicos	15
Referências Bibliográficas	16
CAPÍTULO I: Meio de cultivo para produção em larga-escala de <i>Arthrospira</i> sp.	
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e Métodos	23
Resultados	25
Discussão	30
Referências Bibliográficas	34
CAPÍTULO II: Avaliação do potencial biorremediador de <i>Arthrospira</i> sp. no tratamento de efluentes de cultivo intensivo de camarões marinhos.	
Resumo	38
Abstract	39
Introdução	40
Material e Métodos	42
Resultados	48
Discussão	60
Referências Bibliográficas	68
Discussão Geral e Perspectivas	74
Referências Bibliográficas	78
Anexos	79

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luis Poersch, pela orientação, confiança, ensinamentos e conselhos, e por sempre dizer que daria tudo certo!

Ao professor Dr. Paulo Abreu pela incansável paciência, atenção única, por me incentivar em tudo e me tranquilizar, pelos ensinamentos científicos e intelectuais que foram além da orientação e que os levarei comigo para toda a vida;

Aos amigos do Laboratório de cultivo de microalgas Stela, Carol, Lucélia, Fábio e Bruno pela ajuda constante e paciência e pelos momentos de alegria na estufa seja no inverno ou verão e em especial à Camila que compartilhou das mesmas angústias e alegrias de um mestrando dia-a-dia ao meu lado, além das sessões de terapia no biodiesel e por achar que as microalgas vão salvar o mundo!

Ao pessoal do camarão pelo convívio e ajuda sempre que necessário, agradeço ao Ferran, André e à Gabi pela amizade e ajuda de sempre em especial à Tati pela amizade, conselhos, e ensinamentos;

A todos os professores do PPGA aqui pelos ensinamentos e formação acadêmica, esses dois anos foram de intenso e valioso aprendizado; aos técnicos e funcionários da EMA em especial ao Sandro pelas ajudas com os nutrientes;

À minha família pelo apoio sempre e por entender todas as minhas faltas nesse período, em especial à minha mãe que sempre me ensinou a valorizar a educação e por nunca me deixar desistir. Agradeço também ao Lucas, que além de meu namorado, foi meu professor de estatística, meu ajudante nos experimentos, obrigada pelos tanques lavados e trabalhos revisados, pela paciência, parceria e amor, por ter sido meu maior incentivador sempre e embarcado nessa vida de pós graduando comigo. Obrigada por estar ao meu lado e me fazer tão feliz; Agradeço às minhas amigas de toda a vida, Soraia, Cinthya, Anne, Luh e Cris por me fazer entender que amizade e amor ultrapassam quilômetros;

À minha família gauchesca Lilian e Lucas Pelegrin, e aos meus grandes amigos Giovanna, Manoel P. César, Mário Jr, Denis B, Juan, Daniel, Boi vocês fizeram a minha vida mais alegre aqui no extremo sul do país; Aos amigos do mestrado e da EMA, ainda haverá mais 4 anos de convivência!

Ao Prof. Dr. Roberto Derner, à Prof. Dr^a Virgínia Tavano e ao Dr. Dariano Krummenauer pelo aceite em participar da banca e pelas valiosas sugestões;

À FURG e ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura, pela oportunidade de realização do mestrado em Aquicultura, a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à FINEP pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

RESUMO GERAL

Com o incremento da aquicultura, os impactos negativos sobre o meio ambiente tendem a se intensificar. O maior problema ambiental da aquicultura está relacionado aos efluentes com grande potencial de poluição das águas naturais. Uma das metas da aquicultura deve ser produzir mais produtos sem aumentar significativamente o uso de recursos de água e de solo. O sistema de aquicultura com bioflocos (*Biofloc Technology* - BTF) atende a essa expectativa, porém ainda existe liberação de efluentes com altas concentrações de nutrientes e matéria orgânica, especialmente durante a despesca. Diversos estudos demonstram a eficiência da utilização de microalgas na remoção de nutrientes de efluentes de cultivo, porém, para uma microalga atender aos requisitos para ser utilizada em sistemas de tratamento de efluentes, precisa apresentar algumas características como possuir células facilmente removíveis por simples filtração, fácil realização do cultivo massivo, tolerância a uma ampla faixa de salinidade e geração de subproduto de valor agregado. A cianobactéria *Arthrospira sp.* é uma espécie promissora para o tratamento de efluentes da carcinocultura marinha. Com isso, o presente trabalho tem como objetivos avaliar a eficiência de um meio de cultivo de baixo custo, composto de Fertilizantes agrícolas e bicarbonato de sódio, para produção em larga escala de *Arthrospira sp.*, além de avaliar os custos para produção desse novo meio de cultivo, bem como testar a viabilidade do tratamento de efluentes de produção de camarões marinhos em meio com bioflocos (Sistema BFT), usando esta microalga. Quatro experimentos foram realizados e apresentados aqui em dois capítulos desta Dissertação. No primeiro capítulo a cianobactéria foi cultivada em meio f/2 e meio Fertilizante, onde apresentou um maior rendimento celular neste último meio de cultivo. Um segundo experimento visou incrementar o meio Fertilizante testando a adição de diferentes concentrações de bicarbonato de sódio. O tratamento onde foi acrescentado 15 gL^{-1} de bicarbonato de sódio apresentou crescimento celular semelhante ao meio Zarrouk padrão para cultivo de *Arthrospira sp.* No segundo capítulo, dois experimentos foram realizados. Um experimento objetivou avaliar qual a concentração de efluente do sistema BFT seria melhor para o crescimento de *Arthrospira sp.* A cianobactéria apresentou maior crescimento celular em 100% do efluente do sistema BFT decantado, quando comparado com o crescimento em meio Fertilizante (Controle).

Um segundo experimento teve como objetivo determinar a possibilidade do crescimento da cianobactéria no efluente do sistema BFT sem nenhum tratamento prévio, bem como mensurar a absorção dos nutrientes desse efluente por parte da microalga. O crescimento celular foi igual nos dois tratamentos EFLU (efluente sem tratamento prévio) e EFLU DEC (efluente decantado), e houve uma importante remediação do fosfato no efluente, constatando assim que é possível o cultivo de *Arthrospira* sp. no efluente de cultivo de camarões marinhos em sistema BFT, bem como a remoção de grande parte do fosfato desse sistema.

Palavras – chave: cianobactéria, cultivo massivo, nutrientes, sistema BFT.

ABSTRACT

With increase in aquaculture activities, the negative impacts on the environment tend to intensify. The largest aquaculture environmental problem is related to effluents with high potential for pollution of natural waters. One of the goals of aquaculture should be to increase production without significantly increasing the use of water resources and soil. The aquaculture biofloc system (*Biofloc Technology* - BTF) meet that expectation, but there is still release of effluents with high rates of nutrients and organic matter, especially during harvesting. Several studies demonstrate the effectiveness of using microalgae cultivation in removing effluent nutrients. However for a microalgae to meet the requirements for use in wastewater treatment systems, it needs to present some features like simple removal by filtration easy massive cultivation, tolerance to a wide range of salinity and generation of value-added by-product. The cyanobacterium *Arthrospira* sp. is a promising species for treatment of marine shrimp farming effluent. Thus, this study aims to evaluate the efficiency of a low cost means of cultivation, consisting of agricultural fertilizers and sodium bicarbonate, for large-scale production of *Arthrospira* sp., and to evaluate the costs for production of this new medium cultivation and to determine the feasibility of treatment of marine shrimp farming effluent in medium with bioflocs (BFT System), using this microalgae. Four experiments were carried out and presented here in two chapters of this dissertation. In the first chapter the cyanobacterium was cultivated in f/2 and a Fertilizer's medium, showing a higher cell yield in the latter culture medium. A second experiment aimed to increase the testing fertilizer through addition of different concentrations of sodium bicarbonate. The treatment with addition of 15 g L⁻¹ sodium bicarbonate had similar cell growth in standard Zarrouk's medium for growing *Arthrospira* sp. In the second chapter objective was to determine the possibility of the growth of cyanobacteria in the effluent of the BFT system without any prior treatment, as well as measure the absorption of nutrients of the effluent by the microalgae. Cell growth was similar in both treatments EFLU (untreated effluent) and EFLU DEC (decanted effluent), and there was a significant remediation of phosphate in the effluent, showing as well that *Arthrospira* sp. cultivation is

possible in the effluent from marine shrimp farming in BFT system, as well as removal of most of the phosphate from the system.

Keywords: cyanobacteria; mass production; nutrients; BFT system.

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria da aquicultura tem crescido de forma acelerada nas últimas décadas, apresentando grande potencial para suprir a demanda humana por proteína. Entretanto, a aquicultura tornou-se uma atividade que causa significativos impactos sobre o meio ambiente e os recursos naturais, levando a questionamentos sobre a sustentabilidade desta atividade econômica (Naylor *et al.* 2000; Olesen *et al.* 2011).

Boyd (2003) relata em seu estudo alguns impactos negativos relacionados à aquicultura, tais como: a destruição de manguezais, marismas e outros ambientes aquáticos sensíveis; poluição das águas naturais pelos efluentes; uso excessivo de medicamentos, antibióticos e outros produtos químicos para controle de doenças; utilização de farinha de peixe e outros recursos naturais para produção de rações para peixes e camarões; salinização do solo e da água; uso excessivo de águas subterrâneas e outras fontes de água doce para abastecimento dos tanques de produção; propagação de doenças dos animais produzidos para as populações nativas; efeitos negativos sobre a biodiversidade causados pela fuga de espécies exóticas introduzidas pela aquicultura; conflitos com outros usuários dos recursos hídricos e comunidades próximas.

Uma das preocupações da aquicultura deve ser o aumento da produtividade sem aumentar significativamente o uso de recursos, como água e solo. Neste sentido, o sistema de bioflocos (*Biofloc Technology* - BTF) reduz em mais de 90% as trocas de água nos sistemas aquícolas, sem comprometer a qualidade da água, através do estímulo a produção de microrganismos que consomem os compostos nitrogenados e se transformam em biomassa proteica que serve de alimento para alguns organismos aquáticos (Crab, 2010). Ainda de acordo com Crab (2010), em comparação com tecnologias de tratamento de água convencionais utilizados na aquicultura, o sistema BFT fornece uma alternativa mais econômica (diminuição das despesas de tratamento de água na ordem de 30%), e, adicionalmente, uma redução nos custos com alimentação. A eficiência de utilização da proteína é duas vezes mais alta em sistemas BFT, quando comparado aos sistemas de produção convencionais.

Porém, em alguns casos há a necessidade de renovação de água, quando, por exemplo, ocorre o aumento de nutrientes como o nitrito, que em altas concentrações é tóxico para as espécies cultivadas (Campos *et al.* 2012), ou até mesmo quando há presença de microalgas indesejadas no sistema. As cianobactérias e clorófitas filamentosas são um exemplo destas microalgas, que em elevadas densidades podem ocasionar obstrução das brânquias de peixes e camarões e, em casos extremos, na morte dos organismos produzidos. A renovação da água gera, então, efluentes com altas concentrações de nutrientes, como compostos nitrogenados, fósforo e matéria orgânica, provenientes, por exemplo, da excreção dos animais produzidos e ração não consumida. Estes elementos quando lançados no ambiente sem tratamento prévio podem gerar danos ambientais como a eutrofização dos corpos d'água receptores. Portanto, o manejo ambiental, incluindo a remoção de poluentes, tornou-se essencial para a sustentabilidade e aceitação da aquicultura (Henry-Silva & Camargo 2006)

Para se proteger e preservar os corpos d'água, a formulação de estratégias adequadas de redução da poluição é essencial. Uma das etapas deste direcionamento é o desenvolvimento de metodologias utilizadas nas estações de tratamento de águas residuais (Barros, *et al.* 2015). Existem diversos métodos de tratamento de efluentes, que são basicamente divididos em físicos e biológicos. Os métodos físicos buscam a remoção do material particulado em suspensão e, eventualmente, também removem os nutrientes e matéria orgânica a eles associados. O tratamento biológico utiliza microrganismos como bactérias, fungos, microalgas, protozoários e rotíferos, além de moluscos filtradores, macroalgas e macrófitas para eliminar os nutrientes dissolvidos da água de cultivo (Klein, 2010).

Diversos estudos demonstram a eficiência da utilização de microalgas na remoção de nutrientes de efluentes de cultivo e produção de biomassa. Tam & Wong (2000), sugerem o uso de microalgas na remoção de nutrientes inorgânicos dos efluentes devido aos baixos custos do processo e da alta eficiência verificada. Converti *et al.* (2006) declaram que o uso de microalgas pode oferecer uma ótima alternativa aos métodos de tratamento tradicionais, proporcionando uma série de vantagens, tais como: menores riscos

ambientais por basear-se nos princípios de depuração que ocorrem naturalmente; permitem a reciclagem de biomassa reduzindo as causas de poluição secundária; removem metais pesados e, sob condições fotossintéticas, liberaram oxigênio, promovendo melhora no potencial de auto depuração do corpo d'água.

Segundo Chuntapa *et al.* (2003), a microalga a ser utilizada em sistemas integrados de aquicultura deve apresentar as seguintes características: células facilmente removíveis por simples filtração (60-200 μm), fácil realização do cultivo massivo, tolerância a uma ampla faixa de salinidade e geração de subproduto de valor agregado. Além disso, Uduman *et al.* (2010) afirmam que um sistema de remoção de biomassa microalgal eficiente é a chave para o tratamento de águas residuais, já que os custos para colheita de algas unicelulares correspondem a cerca de 20-30% dos custos gerais do cultivo (Lam & Lee, 2012).

A espécie escolhida para aplicação neste trabalho, *Arthrospira* sp. (Figura 1) De acordo com Tomaselli (1997) foi desconsiderada como membro do gênero *Spirulina* e incluída no gênero *Arthrospira* por Castenholz (1989), oficialmente aceito em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. As espécies *A. máxima* e *A. platensis*, amplamente cultivadas em escala industrial, são muitas vezes referidas como *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis*. A distinção de *Arthrospira* e *Spirulina* (cujas dimensões do filamento são bem menores) em dois gêneros se baseia em características genéticas, morfológicas e estruturais.

Este gênero apresenta as características mencionadas acima, possuindo a vantagem de poder ser coletada e separada do meio de cultivo através de uma simples filtração. Desta forma, o cultivo desta espécie apresenta vantagem quando comparado ao cultivo de outras microalgas unicelulares, no que se refere à redução nos custos colheita (Jiang *et al.* 2015).

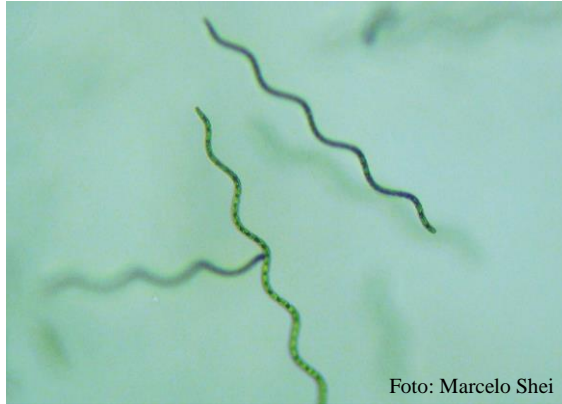


Figura 1. *Arthrospira* sp.

Para que a biorremediação por microalgas seja viável, do ponto de vista econômico, é necessário que sua produção em larga escala também seja viável. O custo de produção pode ser um dos entraves para o maior desenvolvimento do cultivo de algas, já que geralmente os meios de cultivo são caros. No caso da produção massiva de *Arthrospira* sp. e *Spirulina* spp., o meio de cultivo Zarrouk (Zarrouk, 1966) tem sido utilizado por muitos anos como meio padrão para cultivo destes microorganismos (Madkour *et al.* 2012). Porém, este meio de cultivo é bastante caro e complexo em sua formulação. Com isso, muitos meios de cultivo alternativos têm sido estudados para cultivo em larga escala de microalgas, em especial de *Arthrospira* sp. (Becker & Venkatanaman, 1982; Faucher *et al.* 1979; Seshadri & Thomas, 1979; Wu *et al.* 1993; Raof *et al.* 2006; Madkour *et al.* 2012; Devanathan & Ramathan, 2013).

Arthrospira sp., que pertence à ordem Oscillatoriales, família Cyanophyceae, é uma cianobactéria filamentososa de cor verde-azulada. As cianobactérias ou algas azuis são organismos pertencentes ao reino Monera. São procariontes tendo, portanto, o material genético disperso na célula, enquanto que as demais microalgas apresentam núcleos individualizados e pertencem ao Reino Eukaria. *Arthrospira* se reproduz por divisão binária. A forma helicoidal dos filamentos (ou tricomas) é característica do gênero e possuem comprimento de 50 a 500 μm e largura de 3 a 4 μm (Habib *et al.* 2008). Espécies do gênero *Arthrospira* necessitam de grande quantidade de bicarbonato, que além de fonte de carbono, auxilia a manter a condição alcalina do meio de cultura, vital para o cultivo

desse gênero e constitui barreira para o desenvolvimento de outros microrganismos (Richmond *et al.* 1982; Vonskak *et al.* 1983).

Os primeiros relatos do uso da *Arthrospira* sp. na alimentação datam da pré-história, a partir da informação de que tribos de caçadores coletavam massas gelatinosas de algas verde-azuladas e as consumiam cruas ou cozidas (Richmond, 1990). Esta cianobactéria foi produto de consumo dos Astecas, no Vale do México, e da população do Lago Chaad, na África (Parada *et al.* 1998). O cultivo e a comercialização da biomassa de espécies do gênero *Arthrospira* existe em várias regiões do mundo e as principais espécies produzidas são *A. máxima* e *A. platensis* (Araújo *et al.* 2003).

A ocorrência de off-flavor e a produção de toinas é comum em algumas cianobactérias, porém não há relatos de ocorrência de off-flavor nem da produção de toxinas associadas a esta espécie, sendo ela, inclusive, empregada como complemento na alimentação humana, ração animal em piscicultura e produtos farmacêuticos (Baranowski *et al.* 1984). Além disso, *Arthrospira* sp. é considerada um microrganismo GRAS (*Generally accepted as safe*), não apresentando toxicidade, sendo permitido o seu uso como suplemento alimentar pela *Federal Drugs Administration* - FDA do Governo dos E.U.A. Em 2009 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA do Governo Brasileiro incluiu a *Spirulina* na lista de Novos Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, estabelecendo como limite um consumo máximo de 1,6 g microalga/indivíduo/dia, quantidade essa inferior às permitidas por outras nações.

Portanto, o uso de *Arthrospira* sp. pode permitir potencialmente não só a depuração da água de sistemas de Aquicultura, como também produzir biomassa e bioprodutos de alto valor comercial.

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo determinar a viabilidade do cultivo de *Arthrospira* sp. no efluentes de produção de camarões marinhos em meio com bioflocos bem como testar seu potencial biorremediador de nutrientes acumulados no sistema.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a eficiência de um meio de cultivo de baixo custo, composto de Fertilizantes agrícolas e bicarbonato de sódio, para produção de *Arthrospira* sp. em larga escala;
- Determinar a viabilidade do crescimento de *Arthrospira* sp. no efluente de produção de camarão marinho;
- Verificar a necessidade de tratamento prévio do efluente para adaptação do meio de cultivo para *Arthrospira* sp.
- Testar o potencial biorremediador de *Arthrospira* sp. na remoção dos compostos nitrogenados e fosfato;

Para que os objetivos propostos fossem atingidos, foram realizados quatro experimentos que estão divididos em dois capítulos apresentados ao longo desta dissertação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, KG L, AD FACCHINETTI & CP SANTOS. 2003. Influência da ingestão de biomassas de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de rações em ratos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 23:6-9.

BARANOWSKI, JD, CA DOMINGUEZ & PC MAGARELLI. 1984. Effects of drying on selected qualities of *Spirulina platensis* protein. *Journal agric. Food Chem.*, 32: 1385-1387

BARROS, AI, AL GONÇALVES, M SIMÕES, JCM. PIRES. 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41:1489–1500.

BECKER, EW & LV VENKATARAMAN. 1984. Production and Utilization of the Blue-green Alga *Spirulina* in India. *Biomass*, 4: 105-125.

BOYD CE. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*, 226:101-12.

CAMPOS BR, KCF MIRANDA, F D'INCAO, L POERSCH & W WASIELESKY. 2012. Toxicidade aguda da amônia, nitrito e nitrato sobre os juvenis de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Decapoda). *Atlântica*, Rio Grande, 34(1): 75-81.

CHUNTAPA, B, S POWTONGSOOK & P MENASVETA. 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, 220: 355-366.

CONVERTI, A, S SCAPAZZONI, A LODI, JCM CARVALHO. 2006. Ammonia and urea removed by *Spirulina platensis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33: 6-16.

DEVANATHAN, J & N RAMANATHAN. 2013. Utilization of seawater as a medium for mass production of *Spirulina platensis* – a novel approach. Int. Journal of Recent Scientific Research, 4: 597-602.

FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture 2014. FAO, Rome.

HABIB, MAB, M PARVIN, TC HUNTINGTON & RM HASAN. 2008. A Review on Culture, Production and Use of *Spirulina* as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish, FAO Fisheries and Aquaculture Circular. No. 1034, Rome-Italy, ISBN 978-92-5-106106-0, pp. 1-41.

HENRY-SILVA, GG & AFM CAMARGO. 2006. Efficiency of aquatic macrophytes to treat Nile tilapia pond effluents. Scientia Agricola., 63: 417-513.

JIANG, L, H PEI, W HU, Y JI, L HAN & G MA. 2015. The feasibility of using complex wastewater from a monosodium glutamate factory to cultivate *Spirulina subsalsa* and accumulate biochemical composition. Bioresource Technology, 180: 304–310.

KLEIN, AP. 2010. Aplicação da cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* como biorremediador de efluente da carcinocultura marinha. Monografia. 37p.

LAM, MK & KT LEE. 2012. Microalgae biofuels: a critical review of issue, problems and the way forward. Biotechnol. Adv., 30:673-690.

MADKOUR, FF, A EI-W KAMIL & HS NASR. 2012. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. Egyptian Journal of Aquatic Research, 38:51-57.

NAYLOR, RL, RJ GOLDBURG, JH PRIMAVERA, N KAUTSKY, MCM BEVERIDGE, J CLAY, C FOLKE, J LUBCHENCO, H MOONEY, M TROELL. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature, 405: 1017-1024.

FAUCHER, O, B COUPAL, A LEDUY. 1979. Utilization of seawater and urea as a culture medium for *Spirulina maxim*. Canadian Journal of Microbiology, 25:752-759.

OLESEN, I, AI MYHR & GK ROSENDAL. 2011. Sustainable aquaculture: Are we getting there? Ethical perspectives on salmon farming. Journal of Agricultural & Environmental Ethics, 24(4): 381-408.

PARADA, JL, GZ CAIRE, MCZ MULÉ & MMS CANO. 1998. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. International Journal of Food Microbiology, 45:225-228.

RAOOF, B, BD KAUSHIKA & R PRASANNA. 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. Biomass & Bioenergy, 30:537-542.

RICHMOND, A, S KARG & S BOUSSIBA. 1982. Effects of Bicarbonate and Carbon Dioxide on the Competition between *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. Plant & Cell Physiol, 23(8): 1411-1417.

SESHADRI, CV & S THOMAS. 1979. Mass culture of *Spirulina* using low-cost nutrients. Biotchnol. Lett., 1:287-291.

TAM, NFY & TS WONG. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, 107: 145-151.

TOMASELLI, L. 1997. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: Vonshak, A. (ed) *Spirulina Platensis (Arthrospira) Physiology, Cell biology and Biotechnology*. London: Taylor and Francis, 1-15.

UDUMAN, N, Y QI, MK DANQUAH, GM FORDE & A HOADLEY. 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sust. Energ.* 2: 012701.

VONSHAK, A, A ABELIOVICH, S BOUSSIBA, S ARAD & A RICHMOND. 1982. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2: 175–185.

WU, B, CK TSENG & W XIANG. 1993. Large-scale Cultivation of *Spirulina* in Seawater Based Culture Medium. *Botanica Marina*, 36: 99-102.

ZARROUK, C. 1966. Contribution a l'etude d'une Cyanophycee: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina máxima*. Tese - Université Des Paris, Paris.

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós Graduação em Aquicultura
Instituto de Oceanografia

CAPÍTULO I

Meio de cultivo para produção em larga-escala de
Arthrospira sp.

RESUMO

A cianobactéria *Arthrospira* sp. foi cultivada em meio f/2 modificado e em meio Fertilizante. A densidade celular máxima no meio f/2 foi de $8,6 \times 10^4$ filamentos mL^{-1} , enquanto que no meio Fertilizante foi de $1,28 \times 10^5$ filamentos mL^{-1} , no 8º dia de cultivo. Num segundo experimento, o cultivo de *Arthrospira* sp. foi realizado em meio Fertilizante com adição de NaHCO_3 em 4 diferentes concentrações: 1) 0 g L^{-1} (F₀), 2) 5 g L^{-1} (F₅), 3) 10 g L^{-1} (F₁₀) e 4) 15 g L^{-1} (F₁₅), e comparados com meio Zarrouk (controle). O meio F₁₅ apresentou maior biomassa em peso seco quando comparado aos outros tratamentos, sem diferir estatisticamente do meio Zarrouk, gerando uma biomassa de $2,04 \text{ g L}^{-1}$ no 10º dia de cultivo. Além disso, o meio F₁₅ é cerca de 300 vezes mais barato que o meio Zarrouk, apresentando uma alternativa viável economicamente para produção de *Arthrospira* sp. em larga escala.

ABSTRACT

The cyanobacterium *Arthrospira* sp. was first cultured in modified f/2 medium and Fertilizer medium. The maximum cell density in the f/2 medium was 8.6×10^4 filaments ml^{-1} , while the fertilizer medium was 1.28×10^5 filaments m L^{-1} on the 8th day of cultivation. In a second experiment, the cultivation of *Arthrospira* sp. in Fertilizer medium was carried out with the addition of NaHCO_3 in four different concentrations: 1) 0 g L^{-1} (F₀), 2) 5 g L^{-1} (F₅), 3) 10 g L^{-1} (F₁₀) and 4) 15 g L^{-1} (F₁₅), and compared with Zarrouk medium (Control). The medium F₁₅ showed higher biomass dry weight when compared to other culture medium, without statistically differ from Zarrouk medium, generating a biomass of 2.04 g L^{-1} on the 10th day of culture. Furthermore, the F₁₅ medium is about 300 times cheaper than the Zarrouk médium presenting a viable alternative cost for producing *Arthrospira* sp. on a large scale.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Arthrospira* pertence à ordem Oscillatoriales, família Cyanophyceae, agrupa microalgas ricas em proteínas (60 a 70% da sua composição), vitaminas (B12 e carotenos), minerais, aminoácidos essenciais e ácidos graxos poliinsaturados (Jiménes *et al.* 2003).

O cultivo e a comercialização da biomassa de espécies do gênero *Arthrospira*, anteriormente classificada como do gênero *Spirulina*, existe em várias regiões do mundo, as principais espécies produzidas *A. máxima* e *A. platensis* (Araújo *et al.* 2003). Não há relatos de ocorrência de off-flavor nem da produção de toxinas associadas a esta espécie, sendo ela inclusive empregada como complemento na alimentação humana, ração animal na aquicultura e produtos farmacêuticos (Baranowski *et al.* 1984), com seu consumo autorizado pelo FDA (Federal Drug Administration), além de possuir o certificado GRAS (Generally Recognized As Safe).

Em cultivos de microalgas, o fornecimento de nutrientes consiste no segundo maior componente dos custos de produção (Vonshak, 1997). A produção em larga escala de *Arthrospira* é um processo bastante complexo, pois os meios mais usados para seu cultivo, o meio Zarrouk (Zarrouk, 1966) e o meio Schlösser (Schlösser *et al.* 1982), são bastante complexos em sua formulação, se tornando muito onerosos. Desta forma, se faz necessário o estudo de meios alternativos de cultura de microalgas para produção em larga escala que sejam mais baratos e facilmente obtidos. O uso de Fertilizantes agrícolas surge como uma alternativa aos meios de cultivo tradicionais, os quais vêm sendo empregados em cultivos massivos de microalgas com a intenção de diminuir os custos de produção.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de um meio de cultivo de baixo custo, composto de Fertilizantes agrícolas e bicarbonato de sódio, para produção em larga escala de *Arthrospira* sp., além de avaliar os custos para produção desse novo meio de cultivo, em comparação com o meio de cultivo Zarrouk, padrão para cultivo dessa cianobactéria.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de Cultivo e Microorganismo

A cepa de *Arthrospira* sp. utilizada neste estudo foi obtida no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (LEB-FURG), onde os cultivos eram mantidos em meio Zarrouk (Zarrouk, 1966). Na Estação Marinha de Aquicultura “Professor Marcos Alberto Marchiori”, do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (EMA/IO/FURG), a microalga foi cultivada inicialmente em meio f/2, modificado de Guillard (1975), composto por: 150 g L⁻¹ de NaNO₃ e 9 g L⁻¹ de Na₂HPO₄. Dessa solução estoque utilizam-se 1 mL L⁻¹ para a o meio de cultivo. Além disso, os cultivos eram mantidos em salinidade 15, pH em torno de 8,0, temperatura em torno de 30°C, intensidade luminosa de 1500 lux, fotoperíodo de 12h claro/escuro e aeração constante. Posteriormente a cepa foi mantida em meio Zarrouk (Zarrouk, 1966).

O meio Fertilizante utilizado nos experimentos foi adaptado de Yamashita & Magalhães (1984), sendo composto por Sulfato de amônio (30 g L⁻¹), Uréia (1,5 g L⁻¹) e Superfosfato triplo (5 g L⁻¹). Dessa solução estoque utilizam-se 5 mL L⁻¹ para a o meio de cultivo.

2.2.Desenho Experimental

2.2.1. Experimento 1

Foi realizado um primeiro experimento para verificar o crescimento de *Arthrospira* sp. em meio com Fertilizantes. Este experimento teve duração de 8 dias e foi realizado com inóculos na proporção de 1:1 de cultivos em fase exponencial em beckers de 500 mL. Os beckers foram distribuídos em 2 tratamentos com 3 repetições cada: 1) meio f/2 e 2) meio Fertilizante. A cada dois dias foram coletadas amostras (10 mL), fixadas em lugol para posterior contagem celular, na câmara de Utermöhls, em microscópio invertido (Utermöhls, 1958). Os cultivos foram mantidos em temperatura de 25°C, salinidade de 15, fotoperíodo de 12:12h claro:escuro e aeração constante.

2.2.2. Experimento 2

Em um segundo experimento, que teve duração de dez dias, foi avaliado o efeito da adição de bicarbonato de sódio ao meio Fertilizante. O experimento foi desenvolvido com cinco tratamentos, em triplicatas, sendo estes: 1) Controle, com a microalga cultivada em meio Zarrouk (Z), e outros quatro tratamentos com o meio Fertilizante como descrito anteriormente, mas com adição de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) em quatro diferentes concentrações: 2) 0 g L^{-1} (FB₀), 3) 5 g L^{-1} (FB₅), 4) 10 g L^{-1} (FB₁₀) e 5) 15 g L^{-1} (FB₁₅). Os cultivos foram realizados em carboys contendo 1,5 L de meio de cultivo. Para formulação do meio de cultivo, foi preparada água na salinidade 15, tratada com $0,2 \text{ mL L}^{-1}$ de hipoclorito de sódio à 5% e neutralizada, após 24 horas, com 75 mg L^{-1} de ácido ascórbico. Após isso, os meios de cultivo foram adicionados e posteriormente a cianobactéria foi inoculada na densidade de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ (Pelizer *et al.* 2003).

As unidades experimentais foram mantidas com aeração constante, de modo que os filamentos da microalga permanecessem sempre em suspensão, a temperatura inicial de 30°C , 1500 lux de intensidade luminosa e fotoperíodo de 12h:12h claro:escuro.

Nos dois experimentos os parâmetros físico-químicos como pH, temperatura e salinidade foram determinados a cada dois dias utilizando-se um pHmetro digital (Mettler Toledo/ FEP20), refratômetro portátil e termômetro de mercúrio. No experimento 1, a biomassa de *Arthrospira* sp. foi quantificada através contagem celular e no experimento 2 através de medidas de peso seco.

2.3. Cálculo de Produtividade

A produtividade máxima foi obtida pela equação: $P_x = X_{max} - X_i / t_{max}$, onde X_{max} , X_i e t_{max} correspondem a concentração máxima de biomassa, concentração inicial de biomassa e tempo correspondente a X_{max} , respectivamente (Ravelonandro *et al.*, 2008).

2.4. Análises estatísticas

Os dados dos experimentos 1 e 2 foram analisados após as devidas transformações matemáticas para atender os pressupostos da análise de variância (ANOVA). Para verificar a homogeneidade das variâncias de ambos os experimentos, foi realizado o teste de Levine. A normalidade dos dados foi feita seguindo o teste de Komolgorov – Smirnov. A partir daí, os dados foram submetidos à ANOVA dois fatores. Posteriormente foi aplicado o teste de Tukey para avaliação das diferenças significativas entre as médias dos diferentes tratamentos. As análises foram conduzidas com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$) (Zar, 2010).

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

No primeiro experimento o número de filamentos no tratamento com meio f/2 variou de $1,8 \times 10^4$ mL⁻¹ a $8,6 \times 10^4$ mL⁻¹. Já no meio Fertilizante, a densidade de filamentos variou de $4,5 \times 10^4$ mL⁻¹ a $1,28 \times 10^5$ mL⁻¹, havendo diferença significativa entre os tratamentos, somente no último dia de cultivo (dia 8) (Figura 1). Temperatura, pH e salinidade, 30°C, 8,0 e 15, respectivamente, mantiveram-se constantes ao longo do experimento.

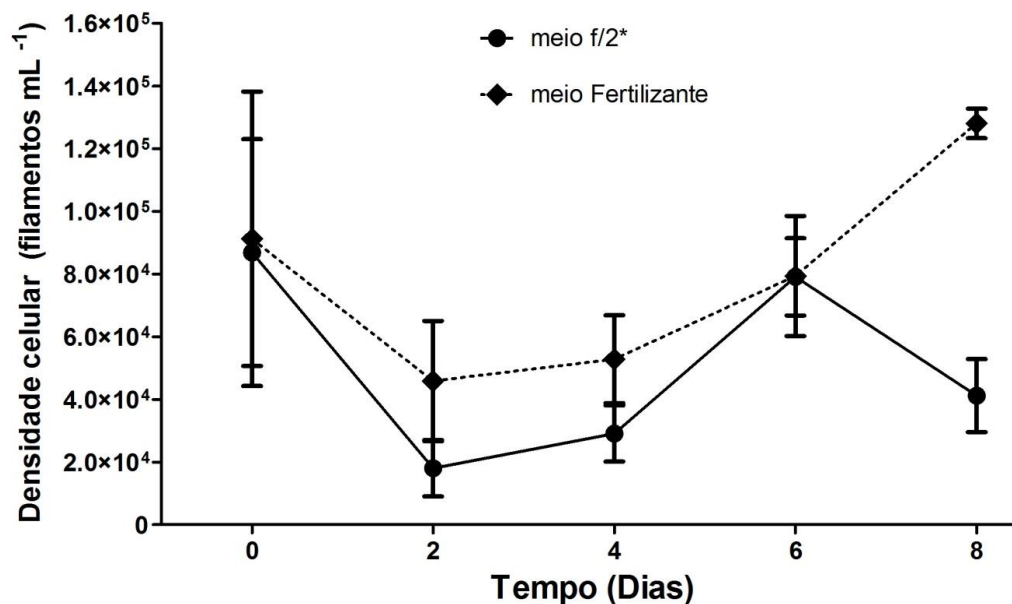


Figura 1. Densidade celular de *Arthrospira* sp. em meio f/2 e em meio Fertilizante, no experimento 1.

3.2.Experimento 2

A menor salinidade foi observada no tratamento FB₀ (11), enquanto a maior, no tratamento FB₁₅ (27). A salinidade variou significativamente entre os tratamentos, no tratamento Z, entre 15 e 16, no tratamento FB₀ entre 11 e 16, no tratamento FB₅ entre 16 e 19, no tratamento FB₁₀ entre 18 e 23 e no tratamento FB₁₅ entre 21 e 27, havendo diferença significativa entre todos os tratamentos, menos entre os meios Z e FB₀ no 3º dia do experimento (Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta a média dos valores de pH do segundo experimento. Como se pode ver, apenas o tratamento FB₀ apresentou valores de pH significativamente menor do que os demais tratamentos. O pH dos cultivos variou de 8,23 a 9,75 no tratamento com meio Zarrouk (Z), de 8,33 a 8,98 no tratamento FB₀, de 8,12 a 9,55 no tratamento FB₅, de 8,10 a 9,74 no tratamento FB₁₀ e de 8,11 a 9,86 no tratamento FB₁₅, havendo diferença estatística apenas no meio FB₀, onde não foi adicionado bicarbonato de sódio comercial, sendo esse o meio onde o pH obteve o menor valor, diferindo estatisticamente de todos os

tratamentos. Em contrapartida, os meios FB_{10} e Z, no último dia do experimento (10º dia) apresentaram os maiores valores de pH, 9,74 e 9,86, sem diferença estatística entre eles, porém com diferença estatística dos demais meios ($p < 0,05$) (Figura 2).

Tabela 1 - Valores máximos, mínimos e médias dos valores de pH, salinidade, peso seco ($g L^{-1}$) e produtividade máxima (P_x) ($g L^{-1}d^{-1}$) para o experimento 2, ao longo dos 10 dias de cultivo de *Arthrospira* sp. (médias±desvios padrão).

Tratamentos		pH	Salinidade	Peso seco	P_x
Z	Mínimo	8,23	15	0,223	-
	Máximo	9,75	16	1,275	1,23±0,90
	Média	9,41±0,58 ^a	13,67±1,72 ^c	0,485±0,28 ^a	-
FB_0	Mínimo	8,33	11	0,238	-
	Máximo	8,98	16	0,517	0,55±0,08
	Média	8,68±0,21 ^b	15,11±0,86 ^{a,c}	0,352±0,17 ^a	-
FB_5	Mínimo	8,12	16	0,200	-
	Máximo	9,55	19	0,747	0,71±0,03
	Média	9,25±0,56 ^a	17,78±1,10 ^{a,d}	0,431±0,25 ^a	-
FB_{10}	Mínimo	8,10	18	0,18	-
	Máximo	9,74	23	1,012	1,14±0,74
	Média	9,34±0,63 ^a	20,39±1,56 ^{b,d}	0,450±0,52 ^a	-
FB_{15}	Mínimo	8,11	21	0,212	-
	Máximo	9,86	27	2,040	2,02±0,68
	Média	9,38±0,64 ^a	23,61±1,58 ^b	0,683±0,68 ^a	-

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os valores ($p < 0,05$)

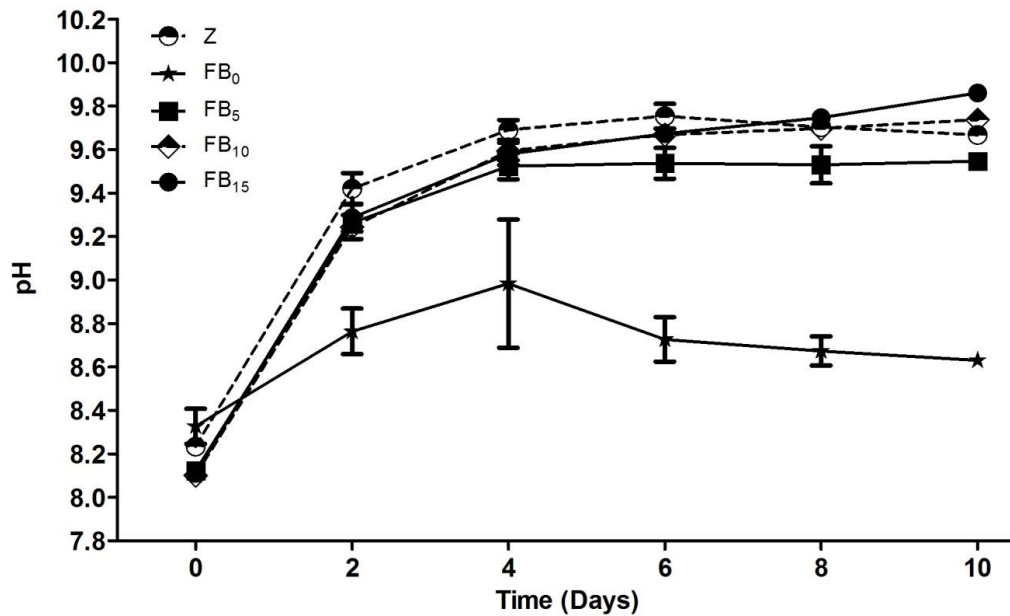


Figura 2. Evolução do pH (médias±desvios padrão) ao longo do cultivo de *Arthrospira* sp. durante cultivo em diferentes meios, suplementados com bicarbonato de sódio comercial (NaHCO_3), no experimento 2.

A concentração máxima de biomassa (Figura 3) foi obtida no tratamento FB_{15} ($2,04 \text{ g L}^{-1}$) e a concentração mínima no tratamento FB_{10} ($0,18 \text{ g L}^{-1}$). Em todos os tratamentos as concentrações mínimas foram observadas no dia 0 de cultivo, e as máximas no 10º dia, exceto para o meio FB_5 que obteve sua concentração máxima ($0,747 \text{ g L}^{-1}$) no 8º dia de cultivo. Não houve diferença significativa entre os tratamentos até o 8º dia de cultivo, mas apenas diferenças significativas dos tratamentos Z e FB_{15} em relação aos demais no 10º dia de experimento (Figura 3). As concentrações máximas de biomassa para os tratamentos Z, FB_0 e FB_{10} foram, $1,275$; $0,517$ e $1,012 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1).

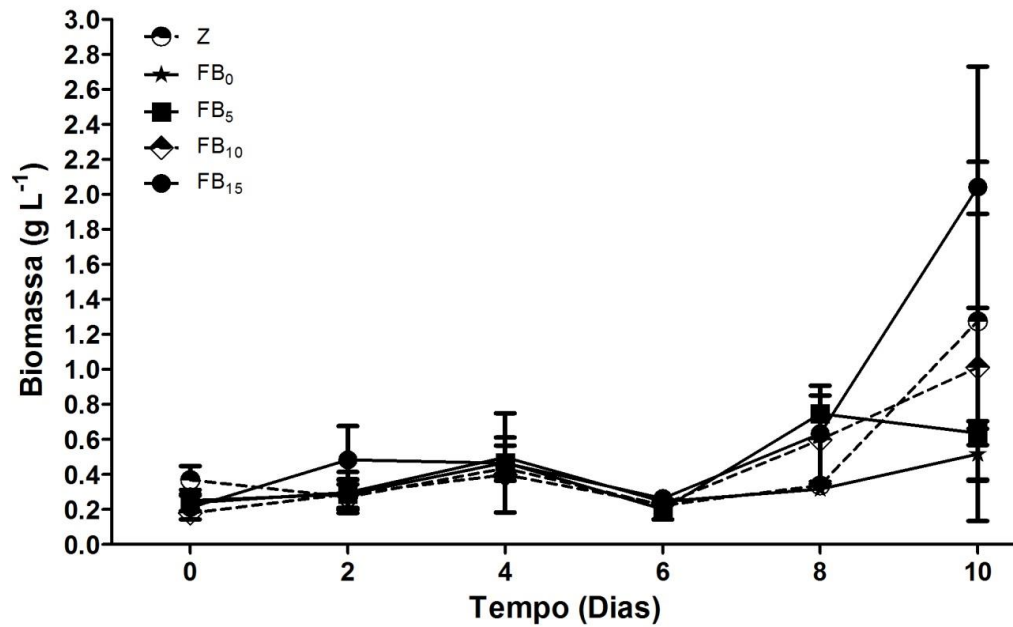


Figura 3. Concentração de biomassa (g L^{-1}) de *Arthrospira* sp. durante cultivo em diferentes meios, suplementados com bicarbonato de sódio comercial (NaHCO_3), no Experimento 2.

A produtividade de biomassa (P_x) foi maior no tratamento FB_{15} ($2,02 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e menor no tratamento FB_0 ($0,71 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Nos demais tratamentos Z, FB_5 e FB_{10} os valores de P_x foram de 1,23, 0,71 e $1,14 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1).

4. DISCUSSÃO

Arthrospira sp. é comercialmente cultivada em vários países, com uma produção anual total de 10.000 toneladas, sendo a segunda microalga mais cultivada em larga escala do mundo (Zhang *et al.* 2005). O grande entrave da produção massiva das espécies do gênero *Arthrospira* são os meios de cultivos. O meio Zarrouk (Zarrouk, 1966) e o meio Schlösser (Schlösser *et al.* 1982) são os mais utilizados, porém bastante complexos em sua formulação, se tornando muito onerosos. Segundo Vonshak (1997), os custos com nutrientes representam de 15 a 20% dos custos totais para produção de *Arthrospira* em larga escala.

Becker & Venkatanaman (1982) e Seshadri & Thomas (1979) foram os pioneiros na formulação de meios de cultivo alternativos, rentáveis e de baixo custo, para produção de *Arthrospira* em larga escala. Estes meios foram baseados em nutrientes obtidos a partir de resíduos rurais, tais como: farinha de ossos, urina ou efluente de digestores de biogás. Wu *et al.* (1993) utilizaram água do mar enriquecida com NaHCO_3 (5 g L^{-1}) para cultivo de *Arthrospira* sp. Já Raoof *et al.* (2006) formularam um meio de cultivo, baseado no meio Zarrouk, com adição de superfosfato simples, cloreto de cálcio, muriato de potássio, obtendo valores de biomassa em peso seco, clorofila e proteína sem diferença estatística entre o meio proposto no estudo e o meio Zarrouk. Da mesma forma, Madkour *et al.* (2012), formularam um meio de cultivo para a produção de *Arthrospira platensis* em larga escala, com a substituição de todos os nutrientes presentes no meio Zarrouk por Fertilizantes e produtos químicos comerciais, mais baratos e disponíveis localmente. Mais recentemente, Devanathan & Ramathan (2013) formularam um meio de cultivo com água do mar enriquecida com 5 g L^{-1} de NaHCO_3 , $1,5\text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 , $0,1\text{ g L}^{-1}$ de K_2HPO_4 , obtendo resultados similares ao meio Zarrouk.

No presente estudo, o cultivo de *Arthrospira* sp. no meio apenas com Fertilizantes levou a um incremento significativo na biomassa, quando comparado com o meio f/2. Entretanto, deve-se ressaltar que o meio f/2 utilizado neste experimento não é o meio de cultivo ideal para produção de *Arthrospira* sp., porém, é um meio de cultivo de menor

custo e de fácil preparo, quando comparado com o meio Zarrouk, sendo o meio f/2 já utilizado na EMA para cultivo de *Arthrospira platensis* sem apresentar danos no desenvolvimento do cultivo de *A. platensis* (Klein, 2010). O crescimento celular de *Arthrospira* sp. ao longo do experimento 1 indica que é possível a substituição do meio de cultivo f/2, composto por reagentes analíticos, como o NaNO_3 e NaHPO_4 , por Fertilizantes agrícolas comerciais ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ e P_2O_5). O uso de fontes de nitrogênio, como o nitrato, são usadas a fim de garantir maiores rendimentos de biomassa, por isso os meios formulados por Zarrouk *et al.* (1966); Paoletti *et al.* (1975) e Schlösser *et al.* (1982), utilizam fontes de nitrogênio como o KNO_3 e o NaNO_3 no preparo de seus meios de cultivo (Sassano *et al.* 2007).

De acordo com Danesi *et al.* (2002), a substituição de uma fonte de nitrogênio tradicional como o KNO_3 , ou até mesmo o NaNO_3 , pela uréia, gera grandes vantagens como o menor preço da uréia e ainda, seu uso como fonte de nitrogênio fornece um ganho energético devido à sua hidrólise espontânea à amônia, em meio alcalino, que então é facilmente assimilada pela *Arthrospira*. No caso do nitrato, os microrganismos precisam reduzi-lo a nitrito (através da enzima nitrato redutase) e depois à amônia (através da nitrito redutase), e este processo requer gasto energético (Hatori, 1996).

Ainda considerando os nutrientes, Raoof *et al.* (2006) afirmam que o fósforo é um dos principais elementos para o crescimento de algas e que *Arthrospira* sp. pode utilizar com sucesso o fósforo na forma de P_2O_5 (pentóxido de fósforo), que esta presente na formulação do superfosfato triplo utilizado no experimento.

Espécies do gênero *Arthrospira* e *Spirulina* apresentam maior crescimento quando o pH varia na faixa de 9,0 a 10,0, (Belkin & Boussiba, 1991), desde que nesta faixa o íon bicarbonato seja a principal fonte de carbono inorgânico dissolvido. Richmond *et al.* (1982) e Vonskak *et al.* (1983) salientam que espécies do gênero *Arthrospira* necessitam de grande quantidade de bicarbonato para manter a condição alcalina do meio de cultura, vital para o desenvolvimento das células e que também constitui uma barreira para o desenvolvimento de outros microrganismos. Raoof *et al.* (2006), observaram que o uso de bicarbonato de sódio comercial, em comparação com o bicarbonato de sódio analítico, não afeta a

composição bioquímica das cianobactérias, como teor proteico, quantidade de clorofila, e biomassa, sendo, portanto uma alternativa de baratear ainda mais os custos de produção.

No experimento 2, nos tratamentos onde o meio Fertilizante foi suplementado com bicarbonato de sódio comercial (FB₅, FB₁₀ e FB₁₅), o pH dos cultivos se manteve ideal para a espécie, em torno de 9,0; enquanto que no tratamento sem adição de bicarbonato (FB₀) o pH ficou em torno de 8,0, abaixo do recomendado para as espécies do gênero *Arthrospira*. Além de elevar e manter o pH ideal ao longo dos 10 dias de cultivo, o tratamento com 15 g L⁻¹ de NaHCO₃ gerou maior biomassa que os demais tratamentos com menor adição de bicarbonato, o que indicaria que a cianobactéria utiliza o bicarbonato como fonte de carbono para crescimento celular (Lanlan *et al.* 2015).

No presente estudo, o valor máximo de biomassa de *Arthrospira sp.* obtida no meio Z (1,275 g L⁻¹ no 10º dia de cultivo) é inferior ao valor relatado por Rafiqul *et al.* (2005) (2,7 g L⁻¹ no 20º dia de cultivo), porém, quanto ao meio FB₁₅ proposto neste estudo, o valor máximo de biomassa (2,04 g L⁻¹ ;10º dia de cultivo) é similar. Por outro lado, este valor de biomassa obtido foi quatro vezes superior ao obtido por Raoof *et al.* (2006), que relataram uma biomassa de 0,565 mgmL⁻¹ em 18 dias de cultivo, e Devonathan & Ramathan (2013), que obtiveram valores máximos de biomassa de 0,362 mgmL⁻¹, no meio Zarrouk, e 0,334 mgmL⁻¹ no meio contendo água do mar enriquecida. De outro modo, Andrade & Costa (2008), quando cultivaram *Spirulina platensis* em meio Zarrouk diluído (20% v/v) complementado com 0,50 g L⁻¹ de melão líquido obtiveram um valor máximo de biomassa de 2,83 g L⁻¹.

Além da eficiência na produção de biomassa, o meio de cultivo proposto neste estudo mostrou-se economicamente viável, visto que o custo para se preparar 1000 L do meio Zarrouk equivalem a U\$163,30, enquanto que para elaboração de 1000 L do meio Fertilizante com a adição de 15g L⁻¹ de bicarbonato de sódio comercial são necessários U\$0,52. Assim, o meio FB₁₅ proposto neste estudo é cerca de 300 vezes mais barato que o meio Zarrouk, sendo então, uma alternativa economicamente viável para a produção de *Arthrospira sp.* em larga escala.

O desenvolvimento de meios de cultivo simples e de baixo custo é de extrema relevância, uma vez que a produção de microalgas em larga escala só será possível se os custos de produção forem significativamente reduzidos. Os resultados deste trabalho mostram que meios de cultivo mais simples e baratos podem gerar níveis de produção adequados, além de reduzirem significativamente o preço da produção de biomassa de microalgas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, MR & JAV COSTA. 2008. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. Ciênc. agrotec., Lavras, 32 (5): 1551-1556.

ARAÚJO, KG L, AD FACCHINETTI & CP SANTOS. 2003. Influência da ingestão de biomassas de *Spirulina (Arthrospira sp.)* sobre o peso corporal e consumo de rações em ratos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 23:6-9.

BARANOWSKI, JD, CA DOMINGUEZ & PC MAGARELLI. 1984. Effects of drying on selected qualities of *Spirulina platensis* protein. Journal agric. Food Chem., 32: 1385-1387.

BECKER, EW, LV VENKATARAMAN. 1984. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. Biomass, 4: 105-125.

BELAY, A, T KATO & Y OTA. 1996. *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement. J. Appl. Phycol. 8:303– 311.

BELKIN, S & S BOUSSIBA. 1991. Resistance of *Spirulina platensis* to Ammonia at High pH Values. Plant Cell Physiol, 32(7): 953-958.

DANESI, EDG, C DE O RANGEL-YAGUI, JCM DE CARVALHO & S SATO. 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Biomass & Bioenergy, 23:261-269.

DEVANATHAN, J & N RAMANATHAN. 2013. Utilization of seawater as a medium for mass production of *Spirulina platensis* – a novel approach. International Journal of Recent Scientific Research, 4(5): 597-602.

HABIB, MAB, M PARVIN, TC HUNTINGTON & RM HASAN. 2008. A Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish, FAO Fisheries and Aquaculture Circular, 1034:1-41.

HALAWLAW, YI. 2014. *Spirulina* microalga: A food for future. Pinnacle Biotechnology, 1(2):249-255.

HATTORI, A & J MYERS. 1996. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. I. Reduction of nitrite to ammonia. Journal Plant Physiology, 41:1031-1036.

JIMENEZ, C, BR COSSIO & FX NIELL. 2003. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: A predictive model of algal yield. Aquaculture, 221:331–345.

MACIAS-SANCHO, J, LH POERSCH, W BAUER, LA ROMANO, W WASIELESKY & MB TESSER. 2014. Fishmeal substitution with *Arthrospira (Spirulina platensis)* in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. Aquaculture, 426–427:120–125.

MADKOUR, FF, A EL-W KAMIL & HS NASR. 2012. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. Egyptian Journal of Aquatic Research, 38:51-57.

PELIZER, LH, EDG DANESI, CO RANGEL, CEN SASSANO, JCM CARVALHO, S SATO & MORAES, I.O. 2003. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. Journal of Food Engineering, 56:371-375.

RAFIQUL, I M, KCA JALAL & MZ ALAM. 2005. Environmental factors for optimisation of *Spirulina* biomass in laboratory culture. Biotechnology, 4: 19-22.

RAOOF, B, BD KAUSHIKA & R PRASANNA. 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass & Bioenergy*, 30:537-542.

RAVELONANDRO, PH, DH RATIANARIVO, C JOANNIS-CASSAN & A ISAMBERT. 2008. Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*,83:842–848.

RICHMOND, A, S KARG & S BOUSSIBA. 1982. Effects of Bicarbonate and Carbon Dioxide on the Competition between *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Plant & Cell Physiol.*, 23(8): 1411-1417.

SASSANO, CEN, LA GIOIELLIA, KA ALMEIDAA, S SATOA, P PEREGOB, A CONVERTI & JCM CARVALHO. 2007. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass & Bioenergy*, 31:593-598.

SCHLÖSSER, UG. 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 95:181-276.

SESHADRI, CV & S THOMAS. 1979. Mass culture of *Spirulina* using low-cost nutrients, *Biotechnol. Lett.*, 1:287-91.

STRICKLAND, JDH & TS PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd ed. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada.

UTERMÖHL, H. 1958. Zur Vervollkommnung ver quantitativen Phytoplankton-Methodic. *Mitt. Int. Verein. Limnol.*, 9: 1-38.

VONSHAK, A, A ABELIOVICH, S BOUSSIBA, S ARAD & A RICHMOND. 1982. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2: 175–185.

VONSHAK, A. 1997. *Spirulina*, Growth, Physiology and Biochemistry. In: Vonshak, A. (ed) *Spirulina Platensis (Arthospira) Physiology, Cell biology and Biotechnology*. London: Taylor and Francis, 43–65.

WU, B, CK TSENG & W XIANG. 1993. Large-scale Cultivation of *Spirulina* in Seawater Based Culture Medium. *Botanica Marina*, 36: 99-102.

YAMASHITA C, MAGALHÃES PMDS. 1984. Método simples para o cultivo da alga *Tetraselmis chuii*. EMPARN, Boletim de Pesquisa, 1:20.

ZAR, JH. 2010. Biostatistical analysis. Upper Saddle River: Prentice Hall.

ZARROUK, C. 1966. Contribution a l'etude d'une Cyanophycee: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*. Thesis (Ph.D) - Université Des Paris, Paris.

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós Graduação em Aquicultura
Instituto de Oceanografia

CAPÍTULO II

Avaliação do potencial biorremediador de *Arthrospira sp.* no tratamento de efluentes de cultivo intensivo de camarões marinhos

RESUMO

Em um primeiro experimento avaliou-se o crescimento de *Arthrospira* sp. por um período de 12 dias em diferentes diluições (100%, 10%, 1%) do efluente proveniente da produção de *L. vanammei* em sistema BFT e no meio Fertilizante (controle), a fim de verificar em que condições seria possível o melhor aproveitamento dos nutrientes presentes no efluente, bem como saber a diluição ideal para o crescimento da microalga neste efluente. Ao final do experimento o tratamento EFLU 100% apresentou uma densidade celular significativamente mais elevada que o controle, que por sua vez foi maior que no tratamento EFLU 10%. Todos os tratamentos apresentaram aumento na densidade celular ao longo do experimento, exceto o tratamento EFLU 1%. Este incremento na densidade no tratamento EFLU 100%, foi de cerca de 15,75 vezes a densidade inicial, enquanto no tratamento CONTROLE esse incremento foi de 9,72 vezes e no tratamento EFLU 10% de 5,23 vezes. Um segundo experimento, com duração de 20 dias, foi realizado com o intuito de avaliar o crescimento e potencial biorremediador da microalga no efluente proveniente da produção de *L. vanammei* em sistema BFT com (EFLU DEC) e sem tratamento (EFLU) prévio (remoção dos sólidos suspensos totais por decantação). Não houve diferença estatística entre os tratamentos, mas observou-se um incremento na densidade celular ao longo do experimento. Este aumento foi cerca de 25 vezes no tratamento EFLU e cerca de 19 vezes no tratamento EFLU DEC. A biomassa final no tratamento EFLU foi $0,50 \pm 0,59 \text{ g L}^{-1}$ e de $0,18 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$ no tratamento EFLU DEC. Ambos os tratamentos removeram cerca de 90% do fosfato do efluente (EFLU $90,20 \pm 5,18 \%$ e EFLU DEC $89,4 \pm 5,64\%$). Os níveis de nitrogênio amoniacal total foram praticamente zerados na primeira semana de cultivo. Os valores de nitrito foram menores no tratamento EFLU quando comparado ao EFLU DEC. Os valores de nitrato permaneceram oscilando ao longo de todo o experimento. Com base nos resultados obtidos é possível o cultivo da *Arthrospira* sp. no efluente proveniente da produção de *L. vanammei*, sem a necessidade de tratamento prévio do efluente.

ABSTRACT

A first experiment evaluated the growth of *Arthrospira* sp. for 12 days at different dilutions (100%, 10%, 1%) of effluent from production of *L. vanammei* in BFT system and in the Fertilizer's medium (CONTROL) in order to determine ideal dilution for the growth of microalgae in the effluent. At the end of the experiment 100% EFLU treatment showed a significantly higher cell density than the CONTROL, which in turn was greater than 10% EFLU treatment. All treatments showed increased cell density throughout the experiment, except the treatment EFLU 1%. This increase in density in the treatment EFLU 100% was about 15.75 times the initial density. In the control treatment this increase was 9.72 times while in treatment EFLU 10% was 5.23 times. A second experiment with 20 days duration, was conducted in order to evaluate the growth and biorremediador potential of the microalgae in the effluent from the production of *L. vanammei* in BFT system with removal of total suspended solids by decantation (EFLU DEC) and untreated (EFLU). There was no statistical difference between treatments, but there was an increase in cell density throughout the experimente in both. This increase was about 25 times in EFLU treatment and 19 times in EFLU DEC treatment. The final biomass in EFLU treatment was $0.50 \pm 0.59 \text{ g L}^{-1}$ and $0.18 \pm 0.14 \text{ g L}^{-1}$ in EFLU DEC treatment. Both treatments have removed 90% of the effluent phosphate (EFLU $90.20 \pm 5.18\%$ and 89.4 ± 5.64 EFLU DEC%). The total ammonia nitrogen levels were practically used in the first week of cultivation. The nitrite values were lower in EFLU treatment when compared to EFLU DEC. Nitrate values stayed oscillating throughout the experiment. Based on the results obtained, it is possible the cultivation of *Arthrospira* sp. in the effluent from production of *L. vanammei* without pretreatment of the effluent.

1. INTRODUÇÃO

A produção aquícola mundial continua a crescer, alcançando 90,4 milhões de toneladas em 2012 (FAO, 2014). Este crescimento enfrenta, no entanto, algumas limitações devido a pouca disponibilidade de locais adequados para a produção dos organismos (Troell *et al.* 2006), além do lançamento de efluentes com grande potencial de poluição das águas naturais.

A busca pelo aumento da produtividade, e por uma aquicultura ambientalmente amigável, tem conduzido ao surgimento de novas tecnologias como o cultivo de organismos em sistema de bioflocos (*Biofloc Technology System* - sistema BFT). O sistema BTF promove a conversão dos nutrientes (compostos nitrogenados) gerados pelo cultivo em biomassa microbiana (bioflocos), mediante adição de carbono e forte aeração. Os bioflocos formados são consumidos pelos camarões produzidos, não havendo, assim, necessidade de renovar água e, conseqüentemente, não há geração de efluente (Wasielesky *et al.* 2006).

Porém, em alguns casos há a necessidade de renovação de água, quando, por exemplo, ocorre o aumento de nutrientes como o nitrito, que em altas concentrações é tóxico para as espécies cultivadas (Campos *et al.* 2012), ou até mesmo quando há presença de microalgas indesejadas no sistema. O fósforo, componente presente nas rações comerciais, é outro nutriente que vai acumulando no sistema BFT e é retirado dele via renovação de água. Se por um lado em viveiros de cultivo tradicionais o fósforo é retirado do sistema por trocas de água, absorção pelo fitoplâncton presente no sistema, ou fica absorvido ao sedimento. Por outro, no sistema BFT essas saídas do fósforo não estão presentes, já que não existe contato com sedimento (por conta da geomembrana) e nem florações de microalgas (meio heterotrófico), fazendo com que esse nutriente acumule no sistema.

As cianobactérias e clorófitas filamentosas são um exemplo destas microalgas, que em elevadas densidades pode ocasionar obstrução das brânquias dos camarões implicando,

muitas vezes na morte dos organismos cultivados. A renovação da água gera, então, efluentes com altas taxas de nutrientes, como o fosfato e matéria orgânica, que se lançados no ambiente sem tratamento prévio podem gerar danos ambientais como a eutrofização dos corpos d'água receptores.

A eutrofização de ambientes aquáticos por efluentes de cultivo, a introdução de espécies exóticas e a utilização de proteína de origem marinha são apontadas como os maiores impactos produzidos pela aquicultura (Avnimelech, 2006). Efluentes agroindustriais, como os provenientes da aquicultura, devido às elevadas concentrações de nutrientes podem ser utilizados como meio de cultivo de microalgas. As principais vantagens de se cultivar microalgas de modo geral em efluentes de produção animal são: sua elevada eficiência na remoção de nutrientes inorgânicos dos efluentes com baixos custos (Tam & Wong, 2000), além de gerar uma biomassa de alto valor econômico, reduzindo significativamente os custos do meio de cultivo, que consiste no segundo maior componente dos custos de produção (Vonshak, 1997).

A cianobactéria *Arthrospira* sp. apresenta em sua composição química elevado teor de proteína (até 70%), juntamente com quantidades elevadas de ácidos graxos, aminoácidos essenciais, minerais, vitaminas (especialmente B12), pigmentos antioxidantes (ficobiliproteínas e carotenóides) e polissacáridos (Belay *et al.* 1993). Com todas essas características, a produção comercial de *Arthrospira* ganhou a atenção do mundo para uso em suplementos alimentares humanos, alimentação animal e indústria farmacêutica. Seus pigmentos (principalmente a ficocianina) são extraídos e usados na indústria alimentícia, como um corante para alimentos e em cosméticos. Além suas propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias e antivirais, seu efeito redutor do colesterol, controle da tensão pré-menstrual e principalmente, como um poderoso antioxidante (Vonshak & Richmond, 1998; Spolaore *et al.* 2006; Estrada *et al.* 2001; Bermejo *et al.* 2008).

Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento de *Arthrospira* sp. no efluente de produção de camarões marinhos em sistema de bioflocos,

bem como avaliar o potencial biorremediador da cianobactéria na remoção dos compostos nitrogenados e fosfato deste efluente.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Condições de Cultivo

A cepa de *Arthrospira* sp. utilizada neste estudo foi obtida no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (LEB-FURG), onde os cultivos eram mantidos em meio Zarrouk (Zarrouk, 1966). Na Estação Marinha de Aquicultura “Professor Marcos Alberto Marchiori”, Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (EMA/IO/FURG), o inoculo foi cultivado em meio com Fertilizantes, composto por Sulfato de amônio (30 g L^{-1}), Uréia ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) Superfosfato triplo de cálcio (5 g L^{-1}) (Yamashita & Magalhães, 1984). Dessa solução estoque utilizam-se 5 mL L^{-1} para a o meio de cultivo e com a adição de bicarbonato de sódio (15 g L^{-1}), conforme os resultados obtidos no Capítulo I desta dissertação. Os cultivos da cianobactéria foram mantidos em bancada no laboratório, em salinidade 15, pH em torno de 9,5, temperatura em torno de 25°C , intensidade luminosa de 1500 lux, fotoperíodo de 24h claro e aeração constante.

2.2.Desenho Experimental

2.2.1. Experimento 1

Em um primeiro avaliou-se o crescimento de *Arthrospira* sp. em diferentes diluições do efluente decantado proveniente da produção de *L. vanammei* em sistema BFT, a fim de verificar em que condições seria possível o melhor aproveitamento dos nutrientes presentes no efluente, bem como saber a diluição ideal para o crescimento da microalga neste efluente. Este experimento teve duração de 12 dias. Foram utilizados carboys transparentes com 4,5 L de volume útil. O experimento contou com 4 tratamentos, em triplicata, distribuídos aleatoriamente, sendo estes:

- 1. meio Fertilizante (CONTROLE):** O cultivo da microalga *Arthrospira* sp. foi realizado em meio Fertilizante de acordo com Yamashita & Magalhães (1984);
- 2. Efluente 100% (EFLU 100%):** O cultivo da microalga foi realizado no efluente decantado (com a remoção dos sólidos suspensos totais por decantação) proveniente de cultivo de *L. vannamei* em sistema BFT;
- 3. Efluente 10% (EFLU 10%):** O cultivo da microalga foi realizado no efluente do sistema BFT decantado, diluído em 90%;
- 4. Efluente 1% (EFLU 1%):** O cultivo da microalga foi realizado no efluente do sistema BFT decantado, diluído em 99%.

O efluente do cultivo de *L. vannamei* em sistema BFT foi decantado por cerca de 1 hora, até a completa sedimentação dos sólidos (flocos microbianos). Após isso, somente a porção superficial do efluente foi utilizado como meio de cultivo para a microalga *Arthrospira* sp. Para diluição do efluente, nos tratamentos EFLU10% e EFLU 1%, e para formulação do meio Fertilizante no tratamento FERT, foi utilizada água do mar, previamente filtrada com o auxílio de um filtro cartucho (CUNO® – 5m de poro), tratada com 0,2 mL L⁻¹ de hipoclorito de sódio à 5% e neutralizada, após 24 horas, com 75 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

Em todos os tratamentos, foi inoculado 450 mL do cultivo de *Arthrospira* sp. em 4,05 L de água (água do mar + Fertilizante ou efluente), a fim de obter uma concentração média de biomassa entre 50 a 100 mg L⁻¹ após a inoculação (Pelizer *et al.* 2003), totalizando 4,5L de volume em todos os tratamentos. A cada três dias foram coletadas amostras (10 mL), fixadas em lugol para posterior contagem celular da cianobactéria, na câmara de Utermöhl, em microscópio invertido (Utermöhl, 1958). Os cultivos foram mantidos em fotoperíodo de 24h claro e aeração constante. As variáveis abióticas, pH, temperatura e salinidade, foram mensuradas a cada três dias por meio de um multiparâmetro portátil modelo YSI 556 (Yellow Springs Instrument, OH, USA).

2.2.2. Experimento 2

A partir do melhor resultado do Experimento 1, um segundo experimento foi realizado com o intuito de avaliar o crescimento e o potencial biorremediador da microalga no efluente proveniente da produção de *L. vanammei* em sistema BFT sem nenhum tratamento prévio, a fim de verificar a necessidade da eliminação dos sólidos suspensos totais do efluente. Este experimento foi realizado, no período de 13 de novembro a 03 de dezembro de 2014, tendo duração de 20 dias, foi realizado em uma estufa agrícola, na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) (Figura 1), onde os cultivos foram mantidos em tanques com volume total de 1000L, sendo os cultivos realizados em volume de 300L, divididos em dois tratamentos, em triplicata, distribuídos aleatoriamente:

- 1) **EFLU:** Neste tratamento, o cultivo da microalga se deu no efluente do sistema BFT, sem nenhum tratamento prévio. O bombeamento do efluente foi feito diretamente dos tanques de produção de camarões para as caixas de cultivo da microalga;
- 2) **EFLU DEC:** O cultivo da microalga foi realizado no efluente após decantação dos sólidos suspensos. O efluente foi bombeado dos tanques de produção de camarões, para outro tanque dentro da estufa, onde foi decantado por cerca de 1h, então foi bombeada a porção superficial do efluente para as caixas de cultivo da microalga.

Os cultivos foram mantidos em temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo naturais. A cada dois dias, amostras (10 mL) foram coletadas dos cultivos, e fixadas em lugol para posterior contagem na câmara de Utermöhl, em microscópio invertido. Para a quantificação dos nutrientes dissolvidos – nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e fosfato - amostras de água (100mL) foram coletadas e armazenadas a cada dois dias, em frascos plásticos, filtradas com auxílio de bomba à vácuo, em filtros de fibra de vidro (GFA/50 5µm) e congeladas para posterior análise. As análises de nitrito (N-NO₂), nitrato (N-NO₃) e ortofosfato (P-PO₄³⁻) seguiram metodologia descrita em Baumgarten *et al.* (1996). Já a análise de nitrogênio amoniacal (N-NH₃ + NH₄) seguiu o método de Azul de Indofenol da

UNESCO (1983). Ao final do experimento foram coletadas amostras de ambos os tratamentos (100 mL) para quantificação da biomassa de *Arthrospira* sp. através de medidas de peso seco.

As variáveis abióticas, pH, temperatura e salinidade, foram mensuradas a cada dois dias através de um multiparâmetro portátil modelo YSI 556 (Yellow Springs Instrument, OH, USA).

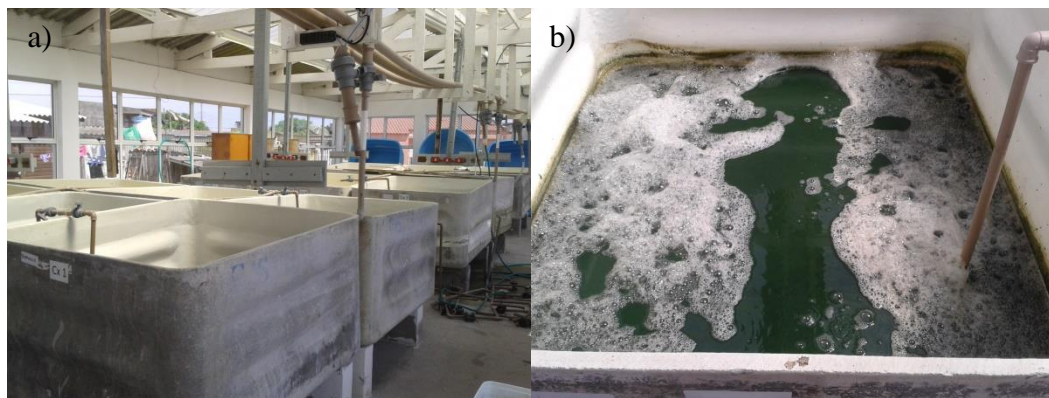


Figura 1. Sistema experimental de cultivo de *Arthrospira* sp. no efluente de produção de camarões em sistema BFT; a) Visão geral da estufa onde foram realizados os cultivos no experimento 2, localizada na Estação Marinha de Aquicultura (EMA/FURG) b) Unidade de cultivo.

2.3. Caracterização do efluente

Para a realização do Experimento I e II foi utilizado efluente de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, mantidos em sistema BFT. O tanque de cultivo continha reprodutores de *L. vannamei*, com peso médio de 30 gramas, cultivados em densidade de 50 camarões m^{-2} . Durante este cultivo, os camarões foram alimentados com ração comercial Guabi[®] com 38% de proteína, em quantidade correspondente a 1% da biomassa do tanque. O tanque recebeu aplicação de melão como fontes de carbono foram utilizados melão líquido a fim de manter uma relação C:N de aproximadamente 18:1 no início do cultivo para manutenção da qualidade da água dos tanques. Além disso, foi adicionado cal hidratada, semanalmente, para manutenção da alcalinidade acima de 100 mg L^{-1} . Ao longo

de todo período experimental não foi adicionado nenhum produto ao efluente utilizado como meio de cultivo para as microalgas.

Os resultados das análises físico-químicas das amostras do efluente do cultivo de camarões em sistema BFT, utilizado como meio de cultivo para *Arthrospira* sp. no experimento 1 apresentados na Tabela 1 e os dados do efluente utilizado no experimento 2, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos do efluente utilizado como meio de cultivo para *Arthrospira* sp.

Parâmetros	
Temperatura (°C)	24,3
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	6,60
pH	8,06
Salinidade	30
Alcalinidade	95
Sólidos Suspensos Totais (mg L ⁻¹)	265
TAN (mg L ⁻¹)	0,01
NO ₂ (mg L ⁻¹)	0,03
NO ₃ (mg L ⁻¹)	31,20
PO ₄ ⁻³ (mg L ⁻¹)	3,0

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos do efluente proveniente do cultivo de *L. vannamei* em sistema BFT, utilizado como meio de cultivo para *Arthrospira* sp.

Parâmetros	
Temperatura (°C)	24,5
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	6,80
pH	8,06
Salinidade	27,0
Alcalinidade (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	95,0
Sólidos Suspensos Totais (mg L ⁻¹)	265
TAN (mg L ⁻¹)	0,06
NO ₂ (mg L ⁻¹)	0,02
NO ₃ (mg L ⁻¹)	28,0
PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	3,00

2.4. Análises estatísticas

Os dados de ambos os experimentos foram analisados por testes paramétricos. Para verificar a homogeneidade das variâncias foi realizado o teste de Levene. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando um destes pressupostos não foram atendidos foram realizadas as devidas transformações matemáticas. Os dados do Experimento 1 e II foram submetidos à ANOVA dois fatores. Em ambos os casos, o teste de Tukey foi aplicado para detectar diferenças significativas entre as médias dos tratamentos. Os dados de densidade celular e dos parâmetros de qualidade da água (dentro de cada dia experimental) e biomassa final do experimento 2 foram submetidos ao teste t para dados não pareados. As análises foram conduzidas com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$) (Zar, 2010).

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

3.1.1. Parâmetros de qualidade da água

As médias dos resultados obtidos para intensidade luminosa (lux), temperatura (°C), salinidade e pH durante o período experimental nos diferentes tratamentos estão apresentadas na Tabela 2. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para os parâmetros de intensidade luminosa, temperatura e salinidade entre os quatro tratamentos.

A temperatura dos cultivos variou de $24,86 \pm 0,20$ a $25,36 \pm 0,30$ ° C no tratamento CONTROLE, $24,23 \pm 0,05$ a $25,66 \pm 0,15$ ° C no tratamento EFLU 100%, $24,76 \pm 0,05$ a $25,66 \pm 0,23$ ° C no tratamento EFLU 10% e $24,50 \pm 0,2$ a $25,73 \pm 0,15$ ° C no tratamento EFLU 1%. A salinidade mínima foi registrada no dia 0 e a máxima no 12° dia de cultivo em todos os tratamentos, variando de $29,54 \pm 0,10$ a $31,29 \pm 0,24$ no tratamento CONTROLE, de $29,61 \pm 0,08$ a $31,92 \pm 0,50$ no tratamento EFLU 100%, de $29,54 \pm 0,10$ a $31,29 \pm 0,24$ no tratamento EFLU 10% e de $29,59 \pm 0,04$ a $31,70 \pm 0,12$ no tratamento EFLU 1%.

Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos da água (médias \pm desvio padrão) intensidade luminosa (lux), temperatura (°C), salinidade e pH, nos tratamentos CONTROLE, 100% do efluente, 10% do efluente e 1% do efluente, durante o cultivo de *Arthrospira* sp no efluente de produção de *L. vannamei* em sistema BFT.

Tratamentos	Intensidade luminosa	Temperatura	Salinidade	pH
CONTROLE	$1760,0 \pm 242,69^a$	$24,9 \pm 0,44^a$	$30,30 \pm 0,77^a$	$8,11 \pm 0,12^b$
EFLU 100%	$1726,6 \pm 200,08^a$	$25,0 \pm 0,51^a$	$30,61 \pm 1,07^a$	$8,63 \pm 0,26^a$
EFLU 10%	$1776,6 \pm 80,820^a$	$25,1 \pm 0,43^a$	$30,63 \pm 0,80^a$	$8,67 \pm 0,08^a$
EFLU 1%	$1746,6 \pm 100,16^a$	$25,1 \pm 0,60^a$	$30,57 \pm 0,86^a$	$8,59 \pm 0,09^a$

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os valores ($p < 0,05$).

Como se pode observar na Tabela 2, apenas o tratamento CONTROLE apresentou valores de pH significativamente menores ($p < 0,05$) do que os demais tratamentos. O pH dos cultivos variou de $7,94 \pm 0,02$ a $8,22 \pm 0,11$ no tratamento CONTROLE, de $8,25 \pm 0,04$ a $8,89 \pm 0,03$ no tratamento EFLU 100%, de $8,62 \pm 0,08$ a $8,67 \pm 0,13$ no tratamento EFLU 10%, de $8,42 \pm 0,01$ a $8,68 \pm 0,02$ no tratamento EFLU 1% (Figura 2).

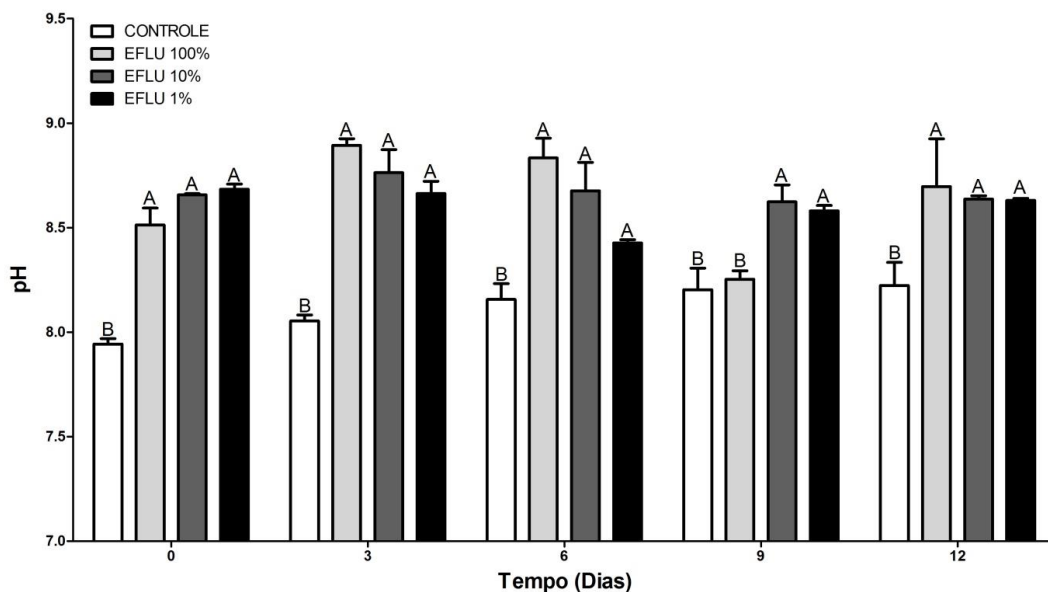


Figura 2. Evolução do pH (médias \pm desvio padrão) no cultivo de *Arthrospira* sp. ao longo dos 12 dias de cultivo nos tratamentos CONTROLE (meio Fertilizante) e EFLU 100% (100% do efluente decantado), EFLU 10% (10% do efluente decantado), EFLU 1% (1% do efluente decantado) no Experimento 1. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os valores ($p < 0,05$).

3.1.2. Densidade celular

Na Figura 3 estão representados os valores de abundância celular para o Experimento 1. O número de filamentos no tratamento CONTROLE variou de $8,59 \pm 0,83 \times 10^5$ a $8,3 \pm 0,67 \times 10^6$ filamentos L^{-1} ; no tratamento EFLU 100%, a densidade celular variou de $8,44 \pm 1,77 \times 10^5$ a $1,33 \pm 0,12 \times 10^7$ filamentos L^{-1} ; No tratamento EFLU 10% variou de $8,29 \pm 0,93 \times 10^5$ a $4,34 \pm 0,67 \times 10^5$ filamentos L^{-1} ; enquanto que no tratamento EFLU 1%

variou de $8,65 \pm 0,00006 \times 10^5$ a $6,66 \pm 0,32 \times 10^5$ filamentos L^{-1} , valores estes variando do dia 0 ao último dia de experimento (20º dia).

Diferenças estatísticas significativas foram detectadas entre os tratamentos a partir do 2º dia de experimento, com o tratamento EFLU 100% apresentando valores médios mais elevados ($2,13 \pm 0,11 \times 10^6$ filamentos L^{-1}) quando comparados com os demais tratamentos ao longo de todos os dias de cultivo, com exceção do 6º dia, onde os valores de densidade celular entre os tratamentos EFLU 100% ($2,93 \pm 0,75 \times 10^6$ filamentos L^{-1}) E EFLU 10% ($3,28 \pm 0,57 \times 10^6$ filamentos L^{-1}) não apresentaram diferença estatística. O tratamento EFLU 10% apresentou valores estatisticamente iguais ao controle em todos os dias, exceto no dia 12, quando a densidade foi mais baixa. O tratamento EFLU 1% diferiu significativamente dos demais tratamentos com efluente a partir do dia 6, sendo diferente também do controle nos dias 9 e 12.

Todos os tratamentos apresentaram aumento na densidade celular ao longo do experimento, exceto o tratamento EFLU 1%. O tratamento EFLU 100% apresentou aumento de densidade já no terceiro dia de experimento, enquanto os tratamentos EFLU 10% e o controle somente a partir do dia 6. Estes três tratamentos atingiram as densidades mais elevadas no dia 12 de cultivo. Este incremento na densidade foi maior no tratamento EFLU 100%, no qual ocorreu um aumento de aproximadamente 15,75 vezes a densidade inicial, enquanto no tratamento CONTROLE esse incremento foi de 9,72 vezes e no tratamento EFLU 10% de 5,23 vezes.

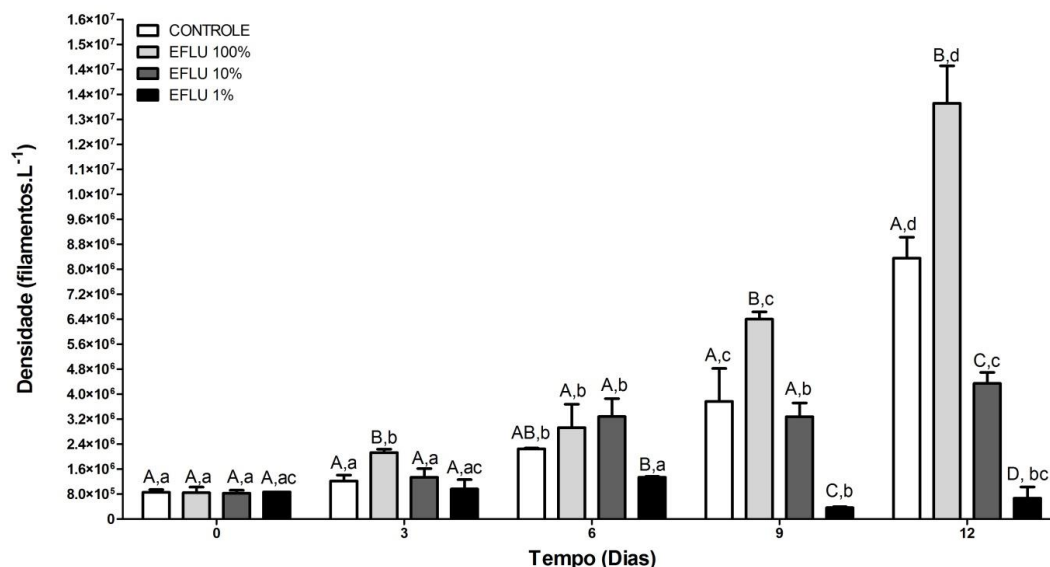


Figura 3. Densidade celular de *Arthrospira* sp. ao longo dos 12 dias de cultivo nos tratamentos CONTROLE (meio Fertilizante) e EFLU 100% (100% do efluente decantado), EFLU 10% (10% do efluente decantado), EFLU 1% (1% do efluente decantado) no Experimento 1. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os valores e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os dias de cultivo ($p < 0,05$).

3.2. Experimento 2

3.2.1. Parâmetros de qualidade da água

As médias dos resultados obtidos para temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidade e pH durante o período experimental nos diferentes tratamentos estão apresentadas na tabela 4. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para estes parâmetros entre os tratamentos. A temperatura dos cultivos variou de $23,73 \pm 0,20$ (1^o dia) a $30,43 \pm 0,45$ $^{\circ}\text{C}$ (6^o dia) no tratamento EFLU e de $24,06 \pm 0,13$ (4^o dia) a $30,63 \pm 1,00$ $^{\circ}\text{C}$ (6^o dia) no tratamento EFLU DEC. A salinidade mínima foi registrada no dia 0 e a máxima no 20^o dia em ambos os tratamentos, variando de $25,64 \pm 0,10$ a $32,30 \pm 0,46$ no tratamento EFLU e de $25,56 \pm 0,15$ a $33,29 \pm 1,26$ no tratamento EFLU DEC. O pH nos cultivos teve seu valor máximo no 4^o dia de experimento ($8,71 \pm 0,08$ no tratamento EFLU e $8,70 \pm 0,05$ no tratamento EFLU DEC) e

seu valor mínimo no 18º dia de experimento para os dois tratamentos EFLU ($8,50 \pm 0,10$) e EFLU DEC ($8,56 \pm 0,08$).

Tabela 5 – Valores médios (médias \pm desvio padrão) dos parâmetros físicos e químicos da água: temperatura (°C), salinidade e pH, nos tratamentos EFLU e EFLU DEC, durante o cultivo de *Arthrospira* sp no efluente de produção de *L. vannamei* em sistema BFT.

Tratamentos	Temperatura	Salinidade	pH
EFLU	$26,23 \pm 2,03^a$	$29,00 \pm 2,27^a$	$8,60 \pm 0,08^a$
EFLU DEC	$26,29 \pm 2,23^a$	$29,21 \pm 2,72^a$	$8,62 \pm 0,069^a$

3.2.2. Densidade Celular

A densidade celular no Experimento 2 apresentou valores iniciais de $1,2 \pm 0,18 \times 10^5$ filamentos L^{-1} no tratamento EFLU e $1,2 \pm 0,39 \times 10^5$ filamentos L^{-1} no tratamento EFLU DEC, sem diferença estatística entre os valores no dia 0 e ao longo de todo período experimental. A densidade celular máxima foi constatada no 20º dia experimental para o tratamento EFLU ($3,1 \pm 1,3 \times 10^6$ filamentos L^{-1}), enquanto que no tratamento EFLU DEC a densidade celular máxima foi observada no 16º dia experimental ($2,5 \pm 1,9 \times 10^6$ filamentos L^{-1}). Como se pode observar na Figura 4, houve um incremento na densidade celular ao final do cultivo (20º dia) quando comparado com o dia 0, nos dois tratamentos, com um aumento de cerca de 25 vezes a densidade inicial no tratamento EFLU e cerca de 19 vezes a densidade inicial no tratamento EFLU DEC. A Figura 5 apresenta os valores da biomassa em peso seco ($g L^{-1}$) no último dia de experimento (20º dia de cultivo). Observa-se que a biomassa final no tratamento EFLU foi de $0,50 \pm 0,59 g L^{-1}$ e $0,18 \pm 0,14 g L^{-1}$ no tratamento EFLU DEC, porém sem diferença estatística entre os tratamentos.

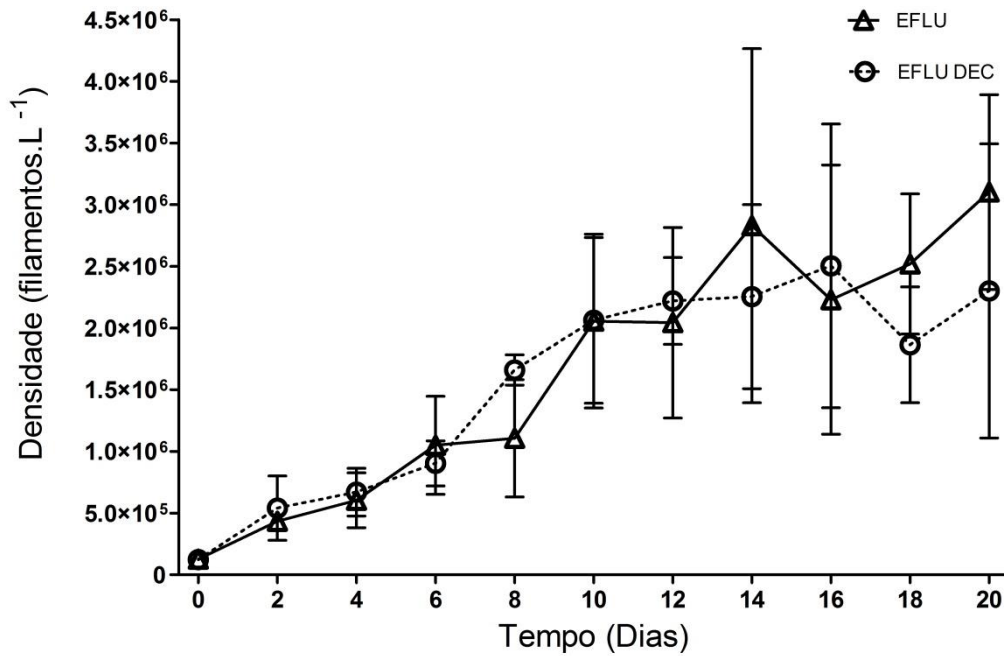


Figura 4. Densidade celular de *Arthrospira* sp. ao longo dos 20 dias de cultivo nos tratamentos EFLU (efluente do sistema BFT sem nenhum tratamento prévio) e EFLU DEC (efluente do sistema BFT decantado) no experimento 2. Valores representados em média \pm erro padrão (n=3).

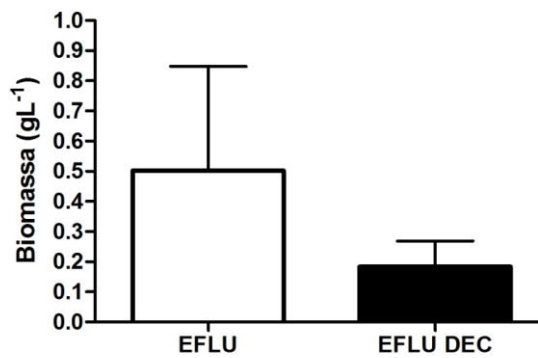


Figura 5. Biomassa (médias \pm desvio padrão) final em peso seco (g L⁻¹) de *Arthrospira* sp. cultivada no efluente de cultivo de *L. vannamei* no sistema BFT no 20º dia de cultivo nos tratamentos EFLU e EFLU DEC, no experimento 2.

3.2.3. Nutrientes

O nitrogênio amoniacal total (TAN) apresentou valores iniciais (dia 0) sem diferença estatística entre os tratamentos (EFLU: $0,57 \pm 0,10$ e EFLU DEC: $0,54 \pm 0,09$ mg L⁻¹), assim como no 4º (EFLU: $0,01 \pm 0,01$ e EFLU DEC: $0,04 \pm 0,07$ mg L⁻¹), 6º (EFLU: $0,03 \pm 0,02$ e EFLU DEC: $0,007 \pm 0,01$ mg L⁻¹), 8º (EFLU: $0,007 \pm 0,01$ e EFLU DEC: $0,01 \pm 0,01$ mg L⁻¹), 16º (EFLU: $0,08 \pm 0,03$ e EFLU DEC: $0,17 \pm 0,20$ mg L⁻¹) e 18º dia (EFLU: $0,04 \pm 0,02$ e EFLU DEC: $0,16 \pm 0,20$ mg L⁻¹). No 2º dia o tratamento EFLU DEC ($0,76 \pm 0,27$ mg L⁻¹) apresentou valores significativamente mais elevados que o EFLU ($0,18 \pm 0,13$ mg L⁻¹), o que se repetiu no 10º (EFLU: $0,03 \pm 0,03$ e EFLU DEC: $1,03 \pm 0,02$ mg L⁻¹) e 12º dia (EFLU: $0,18 \pm 0,13$ e EFLU DEC: $0,89 \pm 0,30$ mg L⁻¹). Já nos dias 14 (EFLU: $1,01 \pm 0,05$ e EFLU DEC: $0,18 \pm 0,11$ mg L⁻¹) e 20 (EFLU: $0,75 \pm 0,04$ e EFLU DEC: $0,09 \pm 0,04$ mg L⁻¹), os valores mais elevados foram observados no tratamento EFLU (Figura 6).

Também foi detectada diferença estatística para os níveis de TAN ao longo dos dias de experimento, em ambos os tratamentos. No tratamento EFLU houve redução nos níveis de TAN mantendo os valores praticamente zerados até o 10º dia, onde os níveis de TAN seguiram oscilando ao longo do período experimental. O tratamento EFLU DEC também demonstrou padrão semelhante, apresentando níveis de TAN praticamente zerados até o 8º dia de cultivo, a partir daí os níveis de nitrogênio amoniacal variaram ao longo dos dias.

Os valores de nitrito (N-NO₂) no dia 0 foram significativamente mais elevados no tratamento EFLU ($0,07 \pm 0,005$ mg L⁻¹) quando comparado com o tratamento EFLU DEC ($0,02 \pm 0,05$ mg L⁻¹). A partir do 4º e até o 18º, os níveis de nitrito foram significativamente mais elevados no EFLU DEC. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos apenas no 2º e 20º dia de experimento, onde os valores de nitrito foram $0,09 \pm 0,07$ no tratamento EFLU e $0,09 \pm 0,03$ no tratamento EFLU DEC; e $0,02 \pm 0,01$ no tratamento EFLU e $0,08 \pm 0,06$ mg L⁻¹ no tratamento EFLU DEC, respectivamente. Com relação a variação ao longo dos dias experimentais, no tratamento EFLU DEC houve diferença estatística apenas entre o dia 0 ($0,02 \pm 0,005$ mg L⁻¹) e o dia 4 ($0,25 \pm 0,1$ mg L⁻¹),

enquanto no tratamento EFLU, o dias 6 ($0.003\pm 0,005 \text{ mg L}^{-1}$) e 8 ($0.003\pm 0,005 \text{ mg L}^{-1}$) diferiram dos dias 0 ($0.08\pm 0,005 \text{ mg L}^{-1}$) e 2 ($0.09\pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 7).

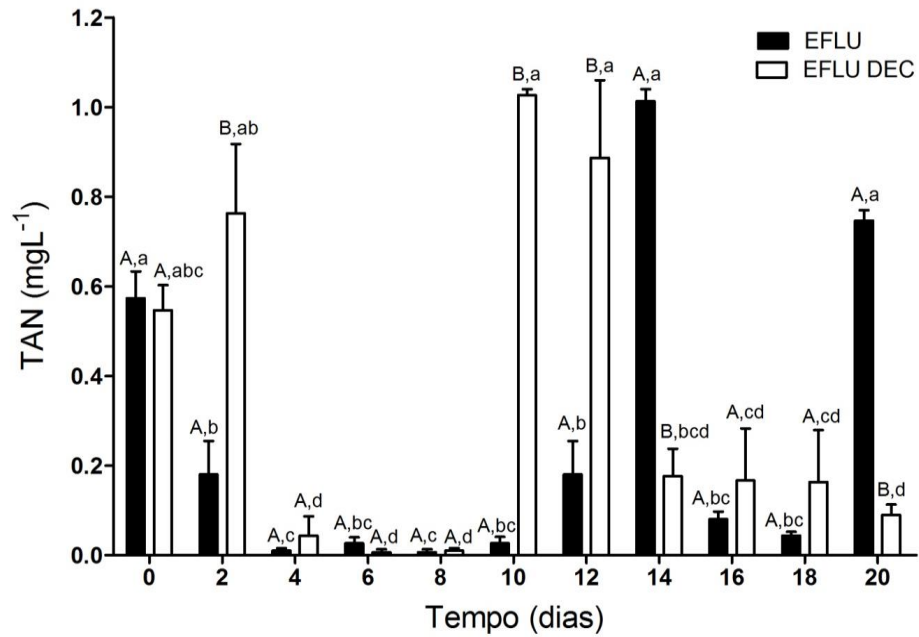


Figura 6. Concentração de nitrogênio amoniacal total (N-TAN mg L⁻¹) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média \pm erro padrão (n=3). EFLU (efluente do sistema BFT sem nenhum tratamento prévio) e EFLU DEC (efluente do sistema BFT decantado) no experimento 2.

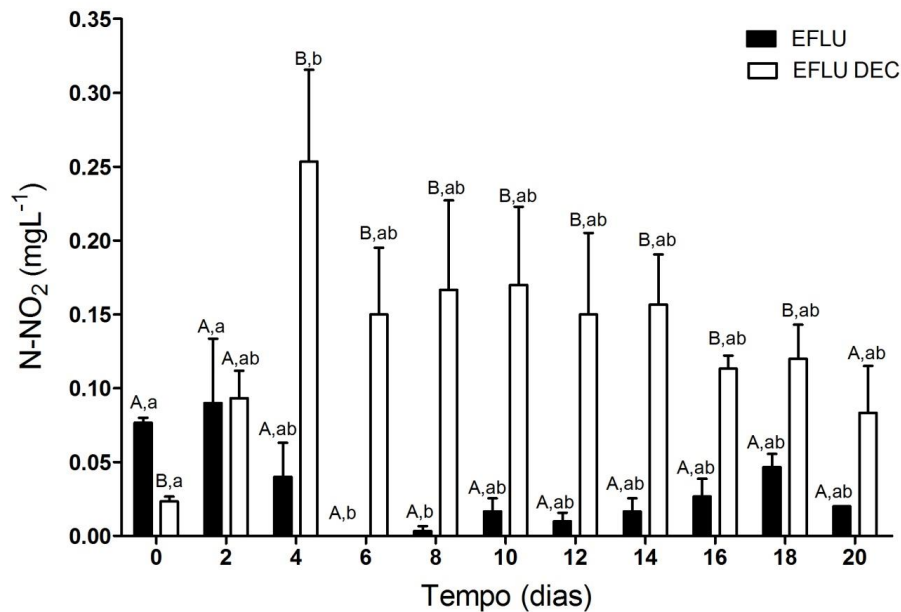


Figura 7. Concentração de nitrito (N-NO_2 mg L^{-1}) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média \pm erro padrão ($n=3$). EFLU (efluente do sistema BFT sem nenhum tratamento prévio) e EFLU DEC (efluente do sistema BFT decantado) no experimento 2. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre o tempo (dias) em cada um dos tratamentos.

Os valores de Nitrato (N-NO_3) não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos nem ao longo do tempo amostral. O tratamento EFLU apresentou valores de nitrato de $25,41 \pm 3,10$ mg L^{-1} no dia 0 e $21,18 \pm 9,15$ mg L^{-1} no dia 20, enquanto que o tratamento EFLU DEC apresentou valores de $25,46 \pm 5,53$ mg L^{-1} no dia 0 e $20,82 \pm 9,77$ mg L^{-1} no vigésimo dia experimental (Figura 8).

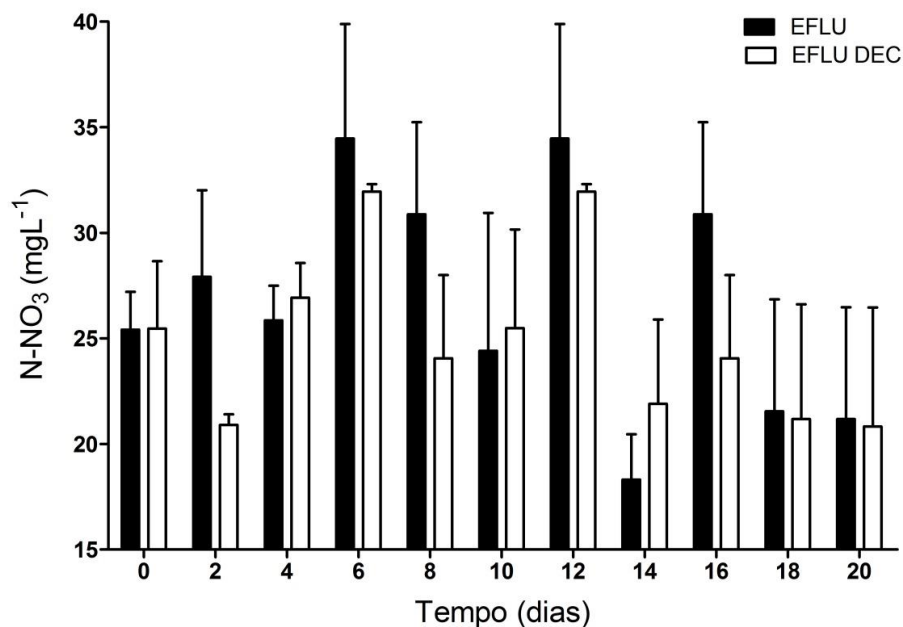


Figura 8. Concentração de nitrato (N-NO₃ mg L⁻¹) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média ± erro padrão (n=3). EFLU (efluente do sistema BFT sem nenhum tratamento prévio) e EFLU DEC (efluente do sistema BFT decantado) no Experimento 2.

Com relação aos níveis de fosfato (P-PO₄³⁻), não houve diferença estatística entre os tratamentos, ao longo de todo o período experimental. Houve uma redução dos níveis entre o dia 0 (EFLU = 2,78±0,60; EFLU DEC = 2,42±0,27 mg L⁻¹) e o 10º dia (EFLU = 0,32±0,09 ; EFLU DEC = 0,37±0,09 mg L⁻¹), permanecendo estabilizado até o fim do experimento. No 20º dia de experimento, os níveis de ortofosfato apresentaram valores de 0,68±0,66 mg L⁻¹ no tratamento EFLU e 0,47±0,48 mg L⁻¹ no tratamento EFLU DEC. Ambos os tratamentos removeram cerca de 90% do fosfato do efluente (EFLU 90,20±5,18 % e EFLU DEC 89,4±5,64%), com uma taxa de remoção diária de 0,12±0,02 mg L⁻¹dia⁻¹ no tratamento EFLU, e 0,10±0,01 mg L⁻¹dia⁻¹ no tratamento EFLU DEC (Figura 9).

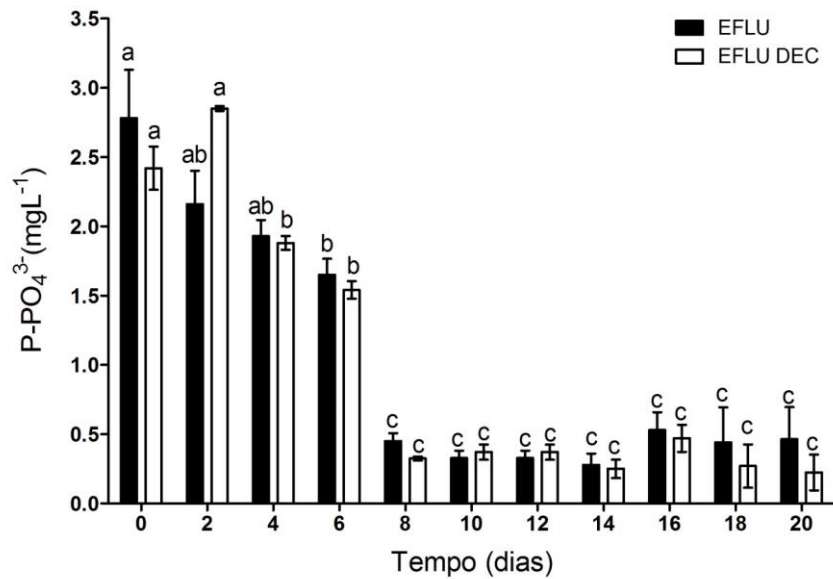


Figura 9. Concentração de ortofosfato ($P-PO_4^{3-}$), ao longo do tempo (dias). Valores representados em média \pm erro padrão ($n=3$). EFLU (efluente do sistema BFT sem nenhum tratamento prévio) e EFLU DEC (efluente do sistema BFT decantado) no experimento 2. Letras diferentes representam diferença estatística entre os dias de cultivo, para cada um dos tratamentos.

4. DISCUSSÃO

A biomassa de *Arthrospira* é uma commodity (Grove, 2013), representando a segunda espécie de microalga mais comercializada no mundo, após *Chlorella* spp. (Raouf *et al.* 2006). O seu potencial econômico decorre de sua composição, que consiste em até 70% de proteínas, vitaminas, β -caroteno e ácidos graxos (Jiménez *et al.* 2003; Ravelonandro *et al.* 2011).

Por apresentarem um excelente perfil nutricional as cianobactérias pertencentes ao gênero *Arthrospira* são ideais para serem utilizadas como suplemento alimentar na dieta de organismos produzidos na aquicultura, pois substituem satisfatoriamente as fontes artificiais de nutrientes, por combinar diversos constituintes de maneira equilibrada (Belay *et al.* 1996; Ambrosi *et al.* 2008) Segundo Macias-Sancho *et al.* (2014) a *Arthrospira* pode substituir até 75% da farinha de peixe em uma dieta típica para o camarão *L. vannamei*, promovendo ainda uma melhora na resposta imunológica desta espécie.

Além disso, estas cianobactérias também são utilizadas com eficácia no tratamento de águas residuais. Diversos estudos realizados demonstram a utilização de microalgas, bem como de espécies do gênero *Arthrospira* na biorremediação de águas residuais, manutenção da qualidade da água e produção de biomassa (Laliberté *et al.* 1997; Dumas *et al.* 1998; Chuntapa *et al.* 2003; Olguín *et al.* 2003; Bertolin *et al.* 2005; Silva *et al.* 2005; Kamilya *et al.* 2006; Queiroz *et al.* 2007; Chunbarn & Peerapornpisal, 2010; Rose & Dunn, 2013; Halfhide *et al.* 2014; Magnotti *et al.* 2015). Tam & Wong (2000) sugerem o uso de microalgas na remoção de nutrientes inorgânicos de efluentes devido aos baixos custos do processo e da alta eficiência verificada.

O gênero *Arthrospira* apresenta grande tolerância à variação de fatores ambientais. (Jiménez *et al.* 2003; Tambieue *et al.* 2011) Os dados de qualidade da água nos dois experimentos seguiram os mesmos padrões, com valores semelhantes de temperatura, salinidade e pH. A temperatura se manteve abaixo do recomendado para a espécie de acordo com Ogbonda *et al.* (2007), que estudando a influência da temperatura na produção de biomassa de *Arthrospira platensis* chegaram a conclusão que a temperatura de 30°C

rendeu além de uma maior biomassa, uma elevada quantidade de proteína e teor de aminoácidos quando comparado com valores de temperaturas inferiores. Entretanto, Vonshak e Tomaselli (2000) têm mostrado que diferentes linhagens de *Arthrospira* podem ter diferentes temperaturas ótimas de crescimento, variando entre 24 e 42 °C.

A faixa ideal de salinidade para espécies do gênero *Arthrospira* é variada. Vonshak (1997) relata que para este gênero a resposta ao estresse causado pela salinidade consiste na inibição do crescimento, o que não foi observado no presente estudo. Segundo Warr *et al.* (1985) a capacidade de *A. platensis* para suportar salinidades elevadas parece ser um fator importante que lhe permite sobreviver e crescer em lagos alcalinos e de outras águas semelhantes. O desenvolvimento de *Arthrospira* sp. em salinidades mais elevadas, demonstra a importância deste organismo como biorremediador de efluentes de águas salgadas. Além disso, seu cultivo juntamente com outras espécies pode atuar no controle de qualidade da água nos sistemas, como relatado pelo estudo de Chuntapa *et al.* (2003), onde a cianobactéria *Spirulina platensis* foi co-cultivada com o camarão tigre (*Penaeus monodon*).

Espécies do gênero *Arthrospira* necessitam de grande quantidade de bicarbonato, que além de fonte de carbono, auxilia a manter a condição alcalina do meio de cultura, vital para o cultivo desse gênero e constitui barreira para o desenvolvimento de outros micro-organismos (Richmond *et al.* 1982; Vonskak *et al.* 1983). No Experimento 1 as médias dos valores de pH para os tratamentos girou em torno de 8,1 a 8,6 , enquanto que no experimento 2 em torno de 8,6. Esses valores estão abaixo dos valores recomendados pela literatura. Porém, Farigi *et al.* (2013) demonstraram elevadas taxas de crescimento, em uma faixa de pH entre 7-8, baixa alcalinidade, luminosidade entre 1500 e 2500 lux e temperatura entre 25 e 35 °C.

Segundo Pinho *et al.* (2010) para utilização de efluentes provenientes da produção animal no cultivo de *Arthrospira* sp. geralmente é necessário tratamento prévio por digestão anaeróbica, alta diluição do resíduo, temperatura em torno de 30°C e suplementação com bicarbonato de sódio. No presente estudo a suplementação por

bicarbonato de sódio não foi realizada, visto que, em cultivos em larga escala a aplicação do bicarbonato de sódio como fonte de carbono se torna inviável do ponto de vista econômico para o produtor.

A fertilização orgânica pela adição de melão e a correção semanal da alcalinidade com hidróxido de cálcio no sistema BFT são fontes de carbono e nutrientes para *Arthrospira* sp. Possivelmente a microalga utilizou essa fonte de carbono para crescimento celular, depois de decomposta pelas bactérias presentes no sistema BFT, visto que no Experimento 1, a densidade celular no tratamento EFLU 100%, onde o cultivo da cianobactéria foi realizado somente no efluente do sistema BFT foi maior quando comparado com o CONTROLE, onde o cultivo da cianobactéria foi realizado no meio Fertilizante.

Andrade & Costa (2008), estudando o crescimento de *A. platensis* em meio de cultivo complementado com melão, observaram que a biomassa no tratamento com adição de 0,50 g L⁻¹ de melão líquido foi maior e alcançou 2,83 g L⁻¹, quando comparado ao tratamento controle, utilizando meio Zarrouk, padrão para cultivo desta cianobactéria.

A partir do 9º dia de cultivo, a densidade celular no tratamento EFLU 100% foi mais elevada que no CONTROLE, apesar do meio Fertilizante conter a fonte de nitrogênio preferencial pela microalga, a amônia. O tratamento EFLU 100% tem como fonte de nitrogênio o nitrato, onde a alga gasta energia para reduzi-lo à amônia (Hatori, 1996). Essa densidade celular mais elevada pode estar relacionada com a diferença na proporção de N:P entre os meios de cultivo nos diferentes tratamentos. O meio Fertilizante apresenta uma relação de N:P de 5:1, enquanto que o efluente apresenta uma relação N:P de 10:1, mais próximo o ideal para cianobactérias (Kebeb & Algren, 1996). Além disso, a adição de melão durante a produção dos camarões faz com que o efluente e assim, a água utilizada no tratamento EFLU 100% seja um pouco turva (Figura 10), fazendo com que a luz disponível para a microalga seja um pouco reduzida em comparação com a água do mar

utilizada no tratamento CONTROLE, essa menor luminosidade talvez favoreça o crescimento da *Arthrospira* sp. (Ravelonandro *et al.* 2011).



Figura 10. a) Água do mar; b) Água proveniente da produção de camarões em sistema BFT, utilizada como meio de cultivo para *Arthrospira* sp.

O cultivo no tratamento EFLU 10% também apresentou crescimento celular, porém este foi menor que no tratamento CONTROLE. Já no tratamento EFLU 1% não houve crescimento celular, visto que não houve aumento da densidade celular ao longo dos doze dias de cultivo. Estes resultados estão ligados à baixa disponibilidade de nutrientes nesses dois tratamentos, além de reforçar a viabilidade do crescimento de *Arthrospira* sp. no efluente puro (100%).

Uma diferença na coloração dos cultivos nos diferentes tratamentos foi observada no Experimento 1. A coloração amarelada foi observada nos cultivos do tratamento EFLU 1% a partir do 6º dia de experimento e no tratamento EFLU 10% a partir do 9º dia de experimento (Figura 11), onde a concentração do efluente e conseqüente concentração dos nutrientes era menor. Isso indica que uma deficiência na assimilação de nitrogênio conduz uma redução na clorofila produzida, uma vez que esta molécula apresenta nitrogênio em sua composição (Bogorad, 1962). Havendo então um déficit de nitrogênio, *Arthrospira* sp. pode utilizar o pigmento ficocianina, que lhe confere a coloração verde-azulada característica, como composto de reserva de nitrogênio (Boussiba & Richmond, 1980).



Figura 11. Variação da coloração dos cultivos nos diferentes tratamentos CONTROLE (meio Fertilizante) e EFLU 100% (100% do efluente decantado), EFLU 10% (10% do efluente decantado), EFLU 1% (1% do efluente decantado) no Experimento 1, no 6º dia experimental.

Os valores de densidade celular de *Arthrospira* sp. no experimento 2, não diferiram entre os tratamentos EFLU e EFLU DEC, comprovando assim a viabilidade do crescimento da cianobactéria no efluente sem nenhum tratamento prévio, reduzindo significativamente os custos com meios de cultivo, possibilitando o tratamento do efluentes provenientes da produção de camarões marinhos e a obtenção de um novo produto para comercialização.

Ao longo do experimento foi observado que os flocos microbianos presentes no efluente no tratamento EFLU foram se desintegrando. Essa afirmação é corroborada pelo fato de não haver diferença significativa na densidade celular (filamentos mL^{-1}), nem na biomassa em peso seco (g L^{-1}) entre o cultivo da cianobactéria no efluente decantado (EFLU DEC) e no efluente puro (EFLU). Desta forma, a biomassa obtida no final do experimento equivale apenas a *Arthrospira* sp, e não aos flocos microbianos.



Figura 12. Biomassa de *Arthrospira* sp. cultivada no efluente de produção de *L. vannamei* em sistema BFT, sem nenhum tratamento prévio (EFLU) no 20º dia do experimento 2.

Observa-se que a partir do quarto dia de cultivo até o oitavo dia houve absorção do nitrogênio amoniacal total (TAN) quase que por completo, que provavelmente se deu por parte da cianobactéria, visto que a amônia é a fonte de nitrogênio usada preferencialmente pela *Arthrospira* sp. (Jha *et al.* 2007; Ferreira, *et al.* 2010). Esse consumo de amônia até o oitavo dia culminou com os menores valores de fosfato também no oitavo dia, e o início da estagnação do crescimento da cianobactéria (fase estacionária). Cianobactérias necessitam de uma razão N:P de 10:1, para crescimento celular, enquanto que as algas eucariontes necessitam de uma taxa de N:P de aproximadamente 16:1 (Redfield,1958). É na fase estacionária que o crescimento celular atinge um equilíbrio, havendo crescimento e morte celular simultaneamente no cultivo, o que explica a oscilação na concentração de nitrogênio amoniacal ao longo do período experimental.

Quando se compara os valores de TAN no primeiro e último dia de experimento, não há remoção do nitrogênio amoniacal por parte da *Arthrospira*, porém, já na primeira semana de cultivo os valores de TAN foram praticamente zerados. Este fato destaca a importância de se levar em consideração o tempo colheita da microalga. Se a colheita da *Arthrospira* fosse realizada no 8º dia de cultivo, por exemplo, o produtor teria os níveis de TAN zerados e ainda uma elevada biomassa microalgal, com elevado valor econômico.

A elevada concentração inicial de nitrato (28 mg L^{-1}) no efluente de cultivo parece ter sido a causa da não detecção do consumo de nitrato por parte da cianobactéria. Esse

elevado valor já era esperado, visto que o nitrato muitas vezes acumula em sistemas que funcionam sem troca de água (Kuhn *et al.* 2010). Essa concentração inicial de nitrato foi superior à concentração encontrada em outros trabalhos. Chuntapa *et al.* (2006) afirmam o potencial de manutenção da qualidade da água no cultivo integrado de *A. platensis* e *P. monodom*, com valores de nitrato não excedendo 16 mg L⁻¹. Kamilya *et al.* (2006) demonstram uma assimilação de 50,39% de nitrato do efluente de cultivo de peixes pela *A. platensis* e 14,17% pela cianobactéria *N. muscorum*, com uma concentração inicial de 1,27 mg L⁻¹ de N-NO₃. Klein (2010) avaliando o potencial biorremediador de *A. platensis* em efluente de cultivo de *L. vannamei* obteve remoção de 88,6% com concentração inicial de 1,14 mg L⁻¹ de N-NO₃. Magnotti *et al.* (2015) utilizando microalgas para remoção de nutrientes do efluente de cultivo de *L. vannamei* em sistema BFT decantado e clorado, observaram assimilação de 87% para *Tetraselmis chuii*, de 83% para *Nannochloropsis oculata*, com uma concentração inicial 19,31 mg L⁻¹ de N-NO₃. Com esses elevados valores de nutrientes, as unidades experimentais de produção de *Arthrospira* neste estudo poderiam ser maiores, visando assim uma maior absorção por parte das microalgas, e conseqüentemente uma maior produção de biomassa, gerando assim um maior retorno financeiro para o produtor. Ou mesmo o valor do inoculo inicial poderia ter sido mais elevado, proporcionando uma maior geração de biomassa no mesmo tempo experimental.

Valores mais elevados de nitrito foram observados no tratamento EFLU DEC na maior parte do período experimental. Esse fato está provavelmente associado com a remoção de grande parte dos flocos microbianos pela decantação dos sólidos no tratamento EFLU DEC, e a conseqüente remoção de bactérias nitrificantes do efluente. Entretanto, em ambos os tratamentos os níveis de nitritos permaneceram sempre baixos.

A nitrificação é um processo sequencial de duas etapas (NH₄⁺ ➡ NO₂⁻ ➡ NO₃⁻), onde a oxidação da amônia a nitrito é mediada pelas bactérias do grupo *Nitrossomonas* e a oxidação do nitrito a nitrato é realizada pelas bactérias do gênero *Nitrobacter*, que estão sempre mantendo a qualidade da água controlada, oxidando a amônia, e a transformando em nitrato (da Silva, 2009).

A concentração de fosfato foi inversamente proporcional à densidade celular. No presente estudo, ambos os tratamentos removeram cerca de 90% do fosfato do efluente (EFLU 90,20±5,18 % e EFLU DEC 89,4±5,64%), evidenciando assim o potencial biorremediador de *Arthrospira* sp. para esse nutriente. Os valores de remoção do fosfato neste estudo foi superior aos resultados encontrados por Kamilya *et al.* (2006), onde a remoção de fosfato por *A. platensis* foi de 47,76% , já a assimilação por parte de *N. moscorum* foi de 41,79% em efluente de produção de peixes, com concentração inicial de 0,67 mg L⁻¹. Cheunbarn & Peerapornpisal (2010) observaram uma remoção de 67% de fosfato pela *A. platensis* com concentração inicial de 34,26 mg L⁻¹, no efluente de produção de suínos.

Nos viveiros de cultivo tradicionais, o fósforo é removido pela troca de água no sistema e, principalmente, pela adsorção e acumulação deste no sedimento. O sistema BFT é projetado para usar pouca ou nenhuma troca de água, dificultando a eliminação do fósforo pela renovação da água. Além disso, o fósforo não é perdido para atmosfera, ao contrário do nitrogênio (desnitrificação e volatilização de amônia). Portanto, o aumento da concentração de fósforo orgânico e inorgânico é esperado para qualquer sistema de produção sem trocas de água (Silva *et al.*, 2013), corroborando assim, a importância da *Arthrospira* sp. na remoção do fósforo em excesso.

O acúmulo de fósforo no sistema BFT, não afeta diretamente o desenvolvimento dos animais cultivados, mas pode desencadear condições favoráveis para a floração de outras cianobactérias, que produzem toxinas, obstruem as brânquias dos camarões (Wasielesky *et al.* 2006), descaracterizam o gosto dos camarões (“off-flavor”) (Tucker, 2000), além de interferir no desenvolvimento do floco microbiano prejudicando o bom desenvolvimento da produção (Silva, 2009).

Os dados do presente estudo demonstraram que é possível o cultivo da cianobactéria *Arthrospira* sp no efluente proveniente da produção de camarão *L. vannamei* em sistema BFT. A partir dos resultados desse trabalho abre-se um leque de possibilidades para utilização da *Arthrospira* integrada ao cultivo de camarões marinhos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, MR & JAV COSTA. 2008. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. Ciênc. agrotec. Lavras,32 (5): 1551-1556.
- AVNIMELECH, Y. 2006. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. Aquacultural Engineering ,34 :172–178.
- BAUMGARTEN, MGZ, MJB ROCHA, LF NIENCHESK. 1996. Oceanografia Química - Manual de Análises em Oceanografia Química. Rio Grande, 132 p.
- BELAY A. 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. J Appl Phycol, 5: 235–240.
- BERMEJO, P, E PIÑERO, ÁM VILLAR. 2008. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. Food Chem., 110: 436–445.
- BOGORAD, L. 1962. Chlorophylls in RA LEWIN, (ed.) Physiology and Biochemistry of Algae. Academic Press, Inc., New York. 398-417.
- CAMPOS BR, KCF MIRANDA, F D'INCAO, L POERSCH & W WASIELESKY. 2012. Toxicidade aguda da amônia, nitrito e nitrato sobre os juvenis de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Decapoda). Atlântica, Rio Grande, 34(1): 75-81.
- CHEUNBARN, P & Y PEERAPORNPISAL. 2010. Cultivation of *Spirulina platensis* using Anaerobically Swine Wastewater Treatment Effluent. Int. J. Agric. Biol., 12: 586–590.
- CHUNTAPA, B, S POWTONGSOOK & P MENASVETA. 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. Aquaculture, 220: 355-366.
- DA SILVA, KR, WASIELESKY WJ, ABREU PC. 2013. Journal of the world aquaculture society, 44(1): 30-41.

- ESTRADA, JEP, PB BESCÓS, AM VILLAR DEL FRESNO. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *IL Farmaco*, 56: 497-500.
- FAGIRI YMF, A SALLEH, SAF EL-NAGERABI. 2013. Impact of physico-chemical parameters on the physiological growth of *Arthrospira (Spirulina platensis)* exogenous strain UTEXLB2340. *African Journal of Biotechnology*, 12 (35): 5458-5465.
- FAO. 2014. Food and Agriculture Organization of United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA).
- FERREIRA LS, MS RODRIGUES, A CONVERTI, S SATO, JCM CARVALHO. 2010. A New Approach to Ammonium Sulphate Feeding for Fed-Batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* Cultivation in Tubular Photobioreactor. *Biotechnol. Prog.* 26: 1271-1277.
- GROVE, FM. 2013. The beneficiation of carbonate rich coal seam water through the cultivation of *Arthrospira maxima (Spirulina)*. Dissertação de mestrado em ciências. 164 p.
- HALFHIDE, T, A AKERSTROM, OI LEKANG, HR GISLEROD, SJ ERGAS. 2014. Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. *Algal Research* 6: 152–159.
- JHA, P, A AHMAD & N RAGHURAM. 2007. Nitrate-Induction of Nitrate Reductase and its Inhibition by Nitrite and Ammonium Ions in *Spirulina platensis*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 13(2): 163-167.
- KAMILYA, D, S SARKAR, TK MAITI, S BANDYOPADHYAY, BC MAL. 2006. Growth and nutrient removal rates of *Spirulina platensis* and *Nostoc muscorum* in fish culture effluent: a laboratory-scale study. *Aquaculture Research*. 37: 1594-1597.
- KLEIN, A. P. 2010. Aplicação da cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* como biorremediador de efluente da carcinocultura marinha. Monografia de graduação em oceanografia. 37p.
- KUHN DD, AL LAWRENCE, GD BOARDMAN, S PATNAIK, L MARSH, GJ FLICK JR. 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish

effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 303: 28-33.

LALIBERTÉ, G, J OLGUÍN & J DE LA NOUE. 1997. Mass cultivation and wastewater treatment using *Spirulina*. In: Vonshak, A. (ed) *Spirulina Platensis (Arthrospira)* Physiology, Cell biology and Biotechnology. London: Taylor and Francis, 1-15.

KABEB, A & G AHLGREN. Optimum growth conditions and light utilization efficiency of *Spirulina platensis (Arthrospira fusiformis)* (Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. *Hydrobiologia*, 223:99-109.

MACIAS-SANCHO, J, LH POERSCH, W BAUER, LA ROMANO, W WASIELESKY & MB TESSER. 2014. Fishmeal substitution with *Arthrospira (Spirulina platensis)* in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture*, 426–427:120–125.

MAGNOTTI, C, R LOPES, R DERNER & L VINATEA. 2015. Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. Part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production. *Aquaculture Research*, 1–9.

OGBONDA, KH, RE AMINIGO & GO ABU. 2007. Influence of aeration and lighting on biomass production and protein biosynthesis in a *Spirulina* sp. isolated from an oil-polluted brackish water marsh in the Niger Delta, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 6(22):2596-2600.

OLGUÍN, EJ, S GALICIA, G MERCADO & T PÉREZ. 2003. Annual productivity of *Spirulina (Arthrospira)* and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal. Appl. Phycol.*, 15: 249-257

PELIZER, LH, EDG DANESI, CO RANGEL, CEN SASSANO, JCM CARVALHO, S SATO & MORAES, I.O. 2003. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of Food Engineering*, 56:371-375.

PINHO, MA, RCO TORRES & ES SANT'ANNA. Fontes alternativas de nutrientes para o cultivo de *Arthrospira (Spirulina)* spp.

QUEIROZ, MI, EJ LOPES, LQ ZEPKA, RG BASTOS & R GOLDBECK. 2007. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*, 98 : 2163–2169

RAOOF, B, BD KAUSHIKA & R PRASANNA. 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass & Bioenergy*, 30:537-542.

RAVELONANDRO, PH, DH RATIANARIVOVA, C JOANNIS-CASSAND, A ISAMBERTC & M RAHERIMANDIMBYA. 2011. Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. *Food and Bioproducts Processing*,8: 209–216.

RICHMOND, A, S KARG & S BOUSSIBA. 1982. Effects of Bicarbonate and Carbon Dioxide on the Competition between *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Plant & Cell Physiol*, 23(8): 1411-1417.

ROSE, P & K DUNN. 2013. A high rate ponding unit operation linking treatment of tannery effluent and *Arthrospira (Spirulina)* biomass production. 1: Process development. *Biomass & Bioenergy*, 51: 183-188.

REDFIELD, AC. 1958. The biological controlo f chemical factors in the environmental. *American Scientist*, 46:205-221.

SILVA, K.R. 2009. Dinâmica do nitrogênio e do fósforo no cultivo superintensivo dos camarões *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus paulensis* sem renovação de água. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande do Sul, Brasil. 68p.

SPOLAORE P, JOANNIS-CASSAN C, DURAN E & ISAMBERT A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101:87–96.

- STRICKLAND, JDH & TS PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 310p.
- TAM, NFY & TS WONG. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, 107: 145-151.
- BERTOLIN, TBP, JAV COSTA, TA BERTOLIN, LM COLLA & M HEMKEMEIER. 2005. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 29(1): 118-125.
- TROELL, M, D ROBERTSON-ANDERSSON, RJ ANDERSON, JJ BOLTON, G MANEVELDT, C HALLING & T PROBYN. 2006. Abalone farming in South Africa: an overview with perspectives on kelp resources, abalone feed, potential for on-farm seaweed production and socio-economic importance. *Aquaculture*, 257: 266–281.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and guides. 12. Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France.
- VONSHAK, A & A RICHMOND. 1998. Mass Production of the Blue-green Alga *Spirulina*: An Overview. *Biomass*,15:233-247.
- VONSHAK, A & L TOMASELLI. 2000. *Arthrospira* (*Spirulina*) systematics and ecophysiology. In: Whitton B.A., Potts M., Editors. The ecology of cyanobacteria the Netherlands: Kluwer academic publishers.
- VONSHAK, A. 1997. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). Physiology, Cell-biology and Biotechnology. Taylor & Francis, London. ISBN 0-2035-8670-0.
- WARR SRC, RH REED, JA CHUDEK, R FOSTER & WDP STEWART. 1985. Osmotic adjustment in *Spirulina platensis*. *Planta*. 163:424-429.
- WASIELSKY, WJR, H ATWOOD, A STOKES, CL BROWDY. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258: 396–403.

YAMASHITA, C, PMDS MAGALHÃES. 1984. Método simples para o cultivo da alga *Tetraselmis chuii*. EMPARN Boletim de Pesquisa, 1-20.

ZAR, JH. 2010. Biostatistical analysis. Upper Saddle River: Prentice Hall. 944p.

ZARROUK, C. 1966. Contribution a l'etude d'une Cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina máxima*. Tese – Universidade de Paris.

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Os efeitos negativos de tal sobrecarga de nutrientes nos sistemas receptores incluem “blooms” de algas, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, morte de organismos aquáticos, mudanças de pH indesejáveis, e produção de toxinas por algumas espécies de microalgas (Christenson & Sims, 2011). Alguns tratamentos químicos e físicos conseguem remover esses nutrientes em excesso, porém, consomem muita energia e produtos químicos, tornando-os onerosos (Tchobanog Lous e Burton, 1991).

De acordo com Gupta *et al.* (2012) atualmente, o tratamento de águas residuais é dividido em tratamento primário, secundário e terciário. O tratamento primário inclui processos físicos e químicos de purificação, enquanto o tratamento secundário incluem os processos biológicos de tratamento de águas residuais. Também conhecido como biorremediação, este processo utiliza sistemas biológicos para degradar, ou transformar vários produtos químicos tóxicos em formas menos nocivas. A biorremediação é um método econômico e eficiente de descontaminação que têm se tornado cada vez mais usual para reduzir a poluição ambiental.

Novas tecnologias estão sendo propostas para tornar acessível o tratamento das águas residuais, e o uso de microalgas tem se mostrado bastante eficiente. Sendo conversores solares eficientes, as microalgas podem produzir grandes quantidades de metabolitos úteis, tais como lipídios e ácidos graxos, vitaminas, proteínas, polissacáridos, pigmentos entre outros, durante o crescimento celular. As microalgas não são apenas úteis para gerar metabólitos e sintetizar os biocombustíveis, mas também apresentam grande capacidade de capturar CO₂ atmosférico, além de gerar uma biomassa com alto valor agregado (Mallick, 2002; Singh & Dhar, 2011; Singh & Ahluwalia, 2013).

Apesar de documentos relatarem o uso de microalgas e cianobactérias como fonte alternativa de alimento pelos chineses a cerca de 2000 anos atrás, somente nos últimos 50 anos tem ocorrido a exploração comercial de algas. Inicialmente voltada para produção de biomassa como fonte de proteínas, compostos bioativos e de produtos farmacêuticos (Harwood & Guschina, 2009).

Mesmo com a grande variedade de aplicações, a produção de microalga ainda não é economicamente viável (Barros *et al.* 2015). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para melhorar a economia do processo produtivo (Christenson & Sims, 2011; Dassey & Theegala, 2013).

Do valor total do custo da produção de biomassa de algas, aproximadamente 35% é gasto para produzir o meio de cultivo (Grima *et al.* 2003). Uma das formas de se reduzir o custo da produção de microalga é a elaboração de meios de cultivos baratos e de fácil preparação. Como proposto nesse estudo, o meio Fertilizante se adequa a essas características, sendo um meio onde são usados Fertilizantes agrícolas simples, fáceis de encontrar e de baixo custo.

O meio Fertilizante já é empregado no cultivo massivo de algumas espécies de microalgas na Estação Marinha de Aquicultura (EMA/FURG), como *Nannochloropsis oculata* (Roselet *et al.* 2013), *Conticribra weissflogii* (Meinerz *et al.* 2009) bem como cultivo de *Chaetoceros muelleri* e *Tetraselmis chuii* usadas na larvicultura de peneídeos na EMA.

Como foi visto no Capítulo I deste trabalho, o cultivo de *Arthrospira* sp. em meio Fertilizante reduz os custos com meio de cultivo em até 300 vezes, quando comparado com meio de cultivo padrão para esta espécie, tornando uma alternativa viável para a implementação do cultivo desta cianobactéria em qualquer empreendimento de aquicultura. Porém, algumas questões ainda precisam ser consideradas com o desenvolvimento dos métodos de cultivo massivo de microalgas. Por exemplo, se houver uma grande produção de microalgas, o consumo de Fertilizantes para preparação do meio de cultivo entrará em “choque” com uso destes elementos para produção de alimentos pela agricultura, além do uso de água doce (Diana *et al.* 2013). O cultivo de espécies marinhas vem sanar a questão do uso de água doce, porém ainda temos o problema da possível concorrência com a agricultura pelo usos de Fertilizantes.

Os efluentes industriais, agrícolas ou domésticos, são excelentes meios de cultivo para algas, pois apresentam em sua composição elementos essenciais para o crescimento da

microalga, dentre eles, fósforo e nitrogênio. O uso de efluentes acabaria com a possível competição por Fertilizantes agrícolas, e ainda contribuiria para a sustentabilidade ambiental, evitando assim o lançamento de nutrientes em corpos de água naturais, contribuindo para redução de possíveis impactos ambientais como eutrofização, hipóxia e surgimento de espécies tóxicas.

Savage (2011) afirma em seu estudo que milhares de dólares estão sendo investidos no desenvolvimento de tecnologias para o cultivo de microalgas. Toda essa atenção voltada para as algas é uma prova inequívoca de seu potencial. Esses organismos podem ser cultivados em tanques artificiais, sobre a terra inadequada para a agricultura, diminuindo a competição por espaço. As algas reproduzem-se rapidamente, aumentando em número ao longo de um corpo de água em poucas horas. Além disso, seu crescimento poderia sanar problemas como a redução da grande concentração de nutrientes nas águas residuais (efluentes) e ainda a utilização do dióxido de carbono gerado pela atividade humana e que causa o “efeito estufa”.

Finalmente, deve-se investir em pesquisas que busquem novas técnicas para colheita das microalgas, pois essa etapa de produção representa 20-30% nos custos da produção de biomassa (Christenson & Sims, 2011). A *Arthrospira* apresenta uma grande vantagem em relação às demais microalgas: pode ser colhida por simples filtração, tornando seu cultivo ainda mais facilitado.

Do ponto de vista ambiental, verificou-se que *Arthrospira* pode ser utilizada no tratamento do efluente oriundo do sistema BFT sem nenhum tratamento prévio. Esse resultado é de extrema relevância, visto que a intensificação dos sistemas de produção, como é o caso do sistema BFT, gera resíduos e conseqüente sólidos, que devem ser mantidos numa concentração de 500 mg L⁻¹ (Samocha *et al.* 2007) para um bom funcionamento do sistema como um todo. O uso de clarificadores como proposto por Gaona *et al.* (2011) é eficaz para manutenção dos sólidos suspensos nessa concentração adequada. Porém, essa prática gera resíduos que se não forem tratados geram impactos ambientais. Estudos futuros devem ser realizados com o intuito de avaliar o uso dos flocos

microbianos em excesso removidos do sistema BFT como ‘Fertilizantes’ para formulação de meio de cultivo alternativos para *Arthrospira* sp., bem como avaliar a qualidade e composição da biomassa produzida.

Do ponto de vista do produtor, as lagoas de decantação ou bacias de sedimentação, que vêm sendo utilizadas nas fazendas aquícolas com propósito de melhorar a qualidade da água residual, poderiam ser utilizadas como área de produção massiva de *Arthrospira* sp., possibilitando o tratamento dos efluentes e geração de biomassa com elevado valor econômico, que pode aumentar a lucratividade da atividade, e tornando essa prática mais atrativa para o produtor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, AI, AL GONÇALVES, M SIMÕES & JCM PIRES. 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41: 1489–1500.

CHRISTENSON L & SIMS R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29: 686–702.

DASSEY, AJ & CS THEEGALA. 2013. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresour Technol*, 128:241–5.

DIANA, JS, HS EGNA, T CHOPIN, MS PETERSON, L CAO, R POMEROY, M VERDEGEM, WT SLACK, MG BONDAD-REANTASO & F CABELLO. 2013. Responsible Aquaculture in 2050: Valuing Local Conditions and Human Innovations Will Be Key to Success. *BioScience*, 63(4):255-262.

GAONA, CAP, LH POERSCH, D KRUMMENAUER, GK FOES & WJ WASIELESKY. 2011. The Effect of Solids Removal on Water Quality, Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System. *Int. Journal of Recirculating Aquaculture*, 12:54-73.

GRIMA, EM, EH BELARBI, FGA FERNÁNDEZ, AR MEDINA & Y CHISTI. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20:491-515.

GUPTA, VK, I ALI, A TAWFIK, TA SALEH, A NAYAK & S AGARWAL. 2012. Chemical treatment technologies for waste-water recycling—an overview. *RSC Adv.*, 2:6380–6388.

HARWOOD, JL & IA GUSCHINA. 2009. The Versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91: 679 – 684.

MALLICK, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*, 15: 377–390.

- MEINERZ, LI, ELC BALLESTER, LJ VAZ & WJ WASIELESKY. 2009. Efeitos da temperatura sobre a absorção de nutrientes e crescimento celular da microalga *Thalassiosira weissflogii*. *Atlântica*, Rio Grande, 31(2):209-212.
- ROSELET, F, P MAICÁ, T MARTINS & PC ABREU. 2013. Comparison of open-air and semi-enclosed cultivation system for massive microalgae production in sub-tropical and temperate latitudes. *Biomass & Bioenergy*, 59: 418-423.
- SAMOCHA, TM, S PATNAIK, M SPEED, AM ALI, JM BURGER, RV ALMEIDA, Z AYUB, M HARISANTO, A HOROWITZ & DL BROOK. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vanammei*. *Aquacultural Engineering* 36: 184-191.
- SAVAGE, N. 2011. Algae: the scum solution. *Nature*, 474(7352): S15- S166.
- SINGH, N & D DOLLY. 2011. Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy Sust. Developm.*, 31:605–629.
- SINGH, UB & AS AHLUWALIA. 2013. Microalgae: a promising tool for carbon sequestration. *Mitig Adapt Strateg G Lob Change*, 18:73–95.
- TCHOBANOG LOUS, G & FL BURTON. 1991. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*, New York, 1334 p.

ANEXOS

Tabela 1 - Composição do Meio de Cultivo Zarrouk (Zarrouk 1966) para *Arthrospira* sp.

Solução de Trabalho	Quantidades
1. KNO ₃	15,0 g em 200 mL
2. NaCl	33,0 g em 200 mL
3. MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,50 g em 200 mL
4. K ₂ HPO ₄	1,50 g em 200 mL
5. CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,58 g em 200 mL
6. Na ₂ EDTA	6,40 g em 100 mL
7. FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,50 g em 100 mL
8. H ₃ BO ₃	1,142 g em 100 mL
9. Solução mista	*
Solução mista	Quantidades
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,049 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,144 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,882 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0157 g
MoO ₃	0,071 g
Água destilada	100mL
Para preparação de 1 litro de meio de cultura (água destilada)	
A - Dissolver em 600 ml de água destilada 15,0 g de NaHCO ₃ e 2,0 g de Na ₂ CO ₃ ;	
B - Acrescentar 10,0 ml das soluções 1, 2, 3, 4 e 5;	
C - Acrescentar 1,0 ml das soluções 6, 7, 8 e 9;	
D - Completar o volume a 1.000 ml.	

Tabela 2 - Composição do meio f/2 modificado de Guillard (1975).

Nutrientes	Quantidades
Para formulação da solução padrão	
NaNO ₃	150 g L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	9 g L ⁻¹
Para formulação de 1L do meio de cultivo utiliza-se 1 mg L ⁻¹ desta solução padrão	

Tabela 3 – Composição de nutrientes para formulação do meio Fertilizante proposto por Yamashita e Magalhães (1984).

Nutrientes	Quantidades
Para formulação de 1L de meio de cultivo	
Sulfato de amônio comercial	150 mg L ⁻¹
Uréia	7,5 mg L ⁻¹
Superfosfato triplo de cálcio	25 mg L ⁻¹