



PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *SPIRULINA SP.* (LEB18) UTILIZADA COMO AGENTE PARA REMOÇÃO DE NUTRIENTES EM ÁGUA RESIDUAL DA AQUICULTURA

Ana Victória dos Santos Borges¹; Lucas Guimarães Cardoso²; Jessica Hartwig Duarte³; Jorge Alberto Vieira Costa³; Denilson de Jesus Assis³; Janice Izabel Druzian⁵; Fabio Alexandre Chinalia²; Karina Lizzeth Pedraza Galván⁵.

¹ Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador/Bahia; ana.b@outlook.com.br

² Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador/Bahia.

³ Laboratório de Engenharia Bioquímica, Faculdade de Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

⁴ Escola de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia da Informação, Universidade de Salvador, Salvador/Bahia.

⁵ Programa de Graduação em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Salvador/Bahia.

Resumo: O objetivo foi produzir *Spirulina sp.* (LEB 18) biomassa pela reutilização e tratamento de águas residuárias da aquicultura, determinando o melhor desempenho produtivo através de parâmetros cinéticos. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores (1L) com 100% de água residual de aquicultura suplementada com T-25, T-50, T-75. Não houve diferença significativa na concentração de biomassa nos tratamentos 50% (1,02 gL⁻¹), 25% (1,10 gL⁻¹) e controle (1,05 gL⁻¹). Assim, o tratamento com 25% representa uma alternativa eficiente, barata e sustentável para o setor de aquicultura, reduzindo os impactos das descargas de efluentes, produzindo biomassa de baixo custo com características diferenciadas e alto valor agregado.

Palavras-Chave: microalga; água residual; aquicultura.

GROWTH PARAMETERS OF *SPIRULINA SP.* (LEB18) USED AS AN AGENT FOR THE REMOVAL OF NUTRIENTS IN AQUACULTURE RESIDUAL WATER

Abstract: The objective was to produce *Spirulina sp.* (LEB 18) biomass by reuse and treatment of aquaculture wastewater, determining the best productive performance through kinetic parameters. Cultures were performed in photobioreactors (1L) with 100% residual aquaculture water supplemented with T-25, T-50, T-75. There was no significant difference in biomass concentration in the 50% (1.02 gL⁻¹), 25% (1.10 gL⁻¹) and control (1.05 gL⁻¹) treatments. Thus, the 25% treatment represents an efficient, cheap and sustainable alternative for the aquaculture sector, reducing the impacts of effluent discharges, producing low cost biomass with different characteristics and high added value.

Keywords: microalgae; wastewater; aquaculture.



1. INTRODUÇÃO

A aquicultura cresce a uma taxa constante de 4,5% ao ano. Em 2017, essa atividade industrial atingiu uma safra global total de 83,6 milhões de toneladas, representando 55% do total de peixes utilizados para consumo humano direto (FAO, 2018). Esse cultivo usa grande volume de água doce e limpa gerando águas residuais ricas em nutrientes [1].

Várias tecnologias foram desenvolvidas visando o tratamento de águas residuais da aquicultura sendo o cultivo de microalgas apontado como o tratamento contendo baixo custo, alcançando até 90% de remoção dos nutrientes orgânicos e inorgânicos com o benefício de produzir biomassa com baixo custo e alto valor agregado. Dentre as microalgas, a *Spirulina platensis* ocupa uma posição de destaque no mercado global, pois trata-se de uma microalga rica em proteínas (~ 70%), gorduras (3-9%), carboidratos (15 a 30%), β -caroteno (maior que cenouras) e vitaminas (incluindo B1, B2 e B12). Por esse motivo, a biomassa da *Spirulina* sp. é utilizada como suplemento alimentar para seres humanos e animais [1,2].

O crescimento da indústria de biomassa da *Spirulina* sp. e a aquicultura dependem diretamente da implementação de novos sistemas de cultivo destinados a reduzir custos e minimizar os impactos ambientais. Esta pesquisa visa aliar a produção de biomassa de *Spirulina* sp. através da reutilização e tratamento de águas residuais de aquicultura, determinando o melhor desempenho de produção através de parâmetros cinéticos. Para atingir tal objetivo, o efluente aquícola foi suplementado com diferentes quantidades de nutrientes para favorecer o melhor desempenho de produção.

2. METODOLOGIA

2.1 Água Residual da Aquicultura, Estirpe de Algas e Meio de Cultura

O efluente aquícola foi gentilmente cedido pela Bahia Pesca S/A, localizada na Fazenda Joanes II, em Camaçari - Bahia (Nordeste do Brasil, 12°41'51"S e longitude 38°19'27"W). A cepa de *Spirulina* foi isolada da Lagoa Mangueira, no sul do Brasil (latitude 32°32'05 "S e longitude 33°31'57" W) e mantida em meio de Zarrouk [4]. As cianobactérias *Spirulina* sp. (LEB 18) foi obtida da Coleção de Cultura do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

2.2 Preparação do Inoculo e Fluxograma Experimental

A água residual do cultivo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) foi primeiramente suplementada com diferentes porcentagens do meio sintético de Zarrouk (ZM) NaHCO_3 16.8 g/L; NaNO_3 2.5 g/L; NaCl 1.0 g/L; K_2HPO_4 0.5 g/L; K_2SO_4 1.0 g/L;



MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L; CaCl₂ 0.031 g/L; Na₂EDTA 0.08 g/L; FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L (Costa et al. 2004). Os experimentos foram realizados apenas com a água residual da aquicultura (T-0) e com os respectivos tratamentos 25, 50 e 75% dos nutrientes totais de Zarrouk (T-25, T-50 e T-75) seguindo proporções similares ao adotado por Kuo et al. (2015) e Daneshvar et al. (2018). Após a suplementação, cada tratamento foi inoculado com a *Spirulina sp.* (LEB 18) (no fim da fase exponencial). O crescimento foi monitorado por sete 7 dias, após o período a biomassa foi coletada para avaliar a produção. [5,6]

2.3 Desenho Experimental

A biomassa da *Spirulina sp.* (LEB18) foi obtida a partir de um tanque de pista (210 L) em cultura contínua (1,0 biomassa g/L) mantido com o meio Zarrouk. Os diferentes ensaios foram preparados em *Erlenmeyer* com um volume de trabalho de 1 L. A água residual de aquicultura (800 ml) foi inoculada com a *Spirulina sp.* (LEB18) com concentração de 0,3 g/L de biomassa viva. Os experimentos seguiram a metodologia proposta por Kuo et al. (2015) e Daneshvar et al. (2018)[5,6]

Os tratamentos experimentais (T-25, T-50 e T-75) foram preparados com o fornecimento de fotobiorreatores de 1L (água de aquicultura/inóculo) com 25, 50 e 75% do total de nutrientes médios de Zarrouk individualmente. O T-0 corresponde ao efluente aquícola sem suplementação de nutrientes e o controle ao meio sintético Zarrouk. A incubação foi realizada durante 7 dias a 30°C com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. O ar foi fornecido a todas as culturas e lâmpadas tubulares fluorescentes com uma intensidade de luz de 41,6 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foram usadas como fonte de energia.

2.4 Parâmetros de Crescimento e Determinação de pH

A concentração da biomassa de *Spirulina sp.* (LEB18) foi determinada diariamente, a partir da densidade óptica das culturas em espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS) no comprimento de onda de 670nm em ambos tipos de reatores. Uma curva padrão foi construída antes dos experimentos, relacionando a densidade óptica do inóculo com sua massa seca [7]. Parâmetros de crescimento foram determinados para cada dia de cultivo. A produtividade foi obtida pela Equação 1, onde X_t é a concentração de biomassa (gL^{-1}), $t(\text{d})$ tempo e X_0 a concentração de biomassa (gL^{-1}) no tempo t_0 (d) inicial.

$$P_x = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (1)$$

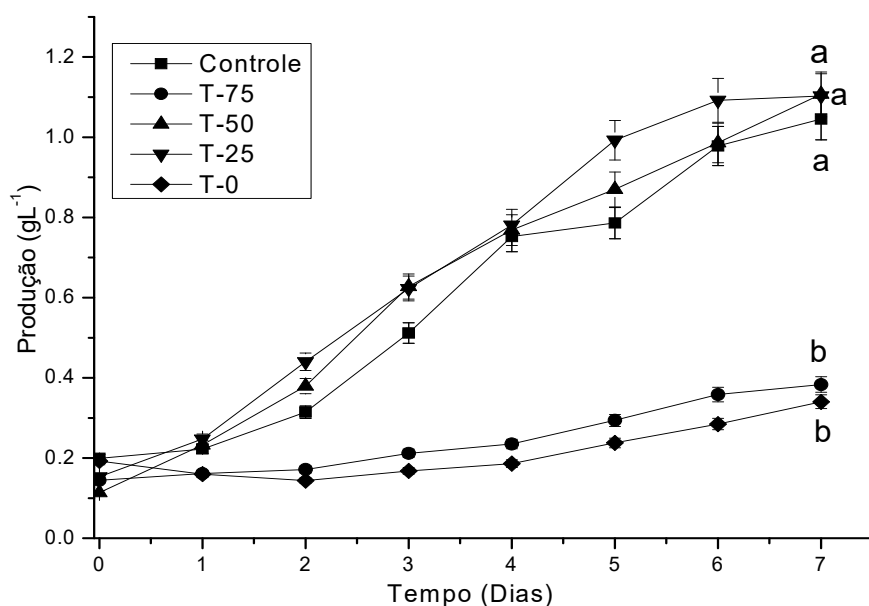
A taxa de crescimento específica (μ_{esp}) foi obtida a partir da regressão linear na fase log de cultivo. O pH também foi monitorado diariamente com o auxílio de um medidor digital de pH.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as águas residuais de aquicultura suplementadas com 25 e 50% de ingredientes Zarrouk (T-25 e T-50) favoreceram uma redução da fase de adaptação para a *Spirulina* sp. (LEB18) (Figura 1). O crescimento após um dia de cultivo revela que as microalgas se adaptaram bem às novas condições ambientais [4]. O potencial de fitorremediação das algas está intimamente ligado ao seu crescimento, maior crescimento de algas promoverá melhor remoção de nutrientes dos meios de cultivo [1]. Resultados semelhantes ao presente estudo foram relatados por Lu et al. (2019) usando *Zeólita* para mitigar a toxicidade de amônia em águas residuárias para a produção de *Spirulina* com valor agregado, não houve fase de adaptação em tratamentos contendo 42,5 e 127,5 mg/L de NH_4^+ . [8]

Figura 1. Monitoramento da produção de biomassa durante o cultivo de *Spirulina* sp. (LEB18) em 100% de água residual aquícola suplementada com diferentes concentrações de Zarrouk (T-75, T-50, T-25 e T-0) por 7 dias. Média \pm desvio padrão. Letras sobrepostas equivalentes (a) indicam que não houve diferença significativa entre os valores do nível de confiança de 95%.



Comparações estatísticas mostraram que a produção total obtida com T-25, T-50 e o controle com meio sintético (T-C) foram semelhantes após 7 dias de cultivo (Figura 1). Apesar do fato de que a taxa de produção de T-50 foi significativamente maior (Tabela 1) nos primeiros 6 dias, o tratamento T-25 apresentou maior produção de biomassa ($1,10 \text{ gL}^{-1}$) (Tabela 1). Zhou et al. (2017) relatou que a *Spirulina* sp. cultivada em água de esgoto misturado com água do mar (1: 0.7: 3.5: 5 e 3: 7, respectivamente) geraram um rendimento máximo de 0.81 gL^{-1} (5:5) dentro de 10 dias. Por outro lado, Zhang et al. (2019) avaliaram o crescimento de *Chlorella sorokiniana* em águas residuais de maricultura (MW) modificadas com resíduo de glutamato



monossódico (RGMS) ou NaNO_3 e K_2HPO_4 . A maior produção atingiu $0,5 \text{ gL}^{-1}$ na suplementação de água residual com RGMS. O cultivo foi realizado em Erlenmeyer de 1 litro por 10 dias, os resultados encontrados foram inferiores ao presente estudo, os autores atribuíram ao estresse no ambiente. [7,8]

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de produção (gL^{-1}), taxa de produção ($\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$), crescimento específico $\mu_{\text{esp.}}(\text{d}^{-1})$ e pH da *Spirulina* sp. (LEB18) cultivada em diferentes concentrações de Zarrouk (Controle, T-75, T-50, T-25, T-0) em 100% da água residual da aquicultura. Média \pm desvio padrão. Letras equivalentes sobrepostas (a-c) no mesmo tipo de coluna indicam que não houve diferença significativa entre os valores do nível de confiança de 95%.

Tratamento (%)	Produção (gL^{-1})	Taxa de Produção ($\text{P}(\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1})$)	$\mu_{\text{esp.}}(\text{d}^{-1})$	pH
Controle	1.05 ± 0.08^a	0.04 ± 0.01^{ab}	0.25 ± 0.01^a	10.30 ± 0.02^a
T-75	0.39 ± 0.01^b	0.04 ± 0.02^{bc}	0.25 ± 0.01^a	11.88 ± 0.01^c
T-50	1.02 ± 0.11^a	0.12 ± 0.04^a	0.33 ± 0.03^b	10.39 ± 0.01^a
T-25	1.10 ± 0.26^a	0.20 ± 0.05^{ab}	0.27 ± 0.04^a	11.06 ± 0.03^b
T-0	0.34 ± 0.04^b	0.03 ± 0.01^c	0.18 ± 0.11^c	10.22 ± 0.05^a

A amônia não foi detectada no efluente aquícola utilizado nesta pesquisa isto pode ter influenciado os resultados citados. Porque altas concentrações de amônio reduziria a produção de biomassa ou até mesmo causaria a falha do cultivo de algas, devido ao aumento do estresse oxidativo intracelular ou perturbando o sistema de transporte de elétrons [9]. Ramsundar et al. (2017) relataram o uso de águas residuais de aquicultura suplementadas com nitrogênio para o cultivo de *Chlorella sorokiniana*. A maior taxa de produção ($0,49 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$) foi observada com uma suplementação de nitrogênio de 400 mgL^{-1} . [10]

A taxa de crescimento e disponibilidade de nutrientes são dependentes dos valores de pH [3]. Variações nos valores de pH não foram significativas durante o cultivo e permaneceram nos níveis muito alcalinos durante todo o período de incubação. Os valores iniciais de pH foram 8–9 e aumentaram para 10–11, podendo ser atribuído a esterilização, que decompõe algumas substâncias devido às altas temperaturas produzirem OH^- portanto, aumentando o pH [11]. Existe uma vantagem significativa de cultivar *Spirulina* sp. em valores altos de pH. Evita a contaminação ou o desenvolvimento de cultivos mistos de algas. Contaminação por outras microalgas em cultivos de *Spirulina* sp. culturas podem diminuir a produção de biomassa em aproximadamente 75%. [11]

Alguns autores relataram que a alta concentração de matéria orgânica pode inibir o crescimento de microalgas [11], justificando o baixo crescimento em T-0 e o baixo rendimento em T-75. Porque a concentração de sólidos dissolvidos totais, matéria orgânica e o meio Zarrouk (rico em sais) adicionado 75% podem afetar a disponibilidade de nutrientes na água. Pois alguns processos químicos, como a precipitação química, podem remover parte do nitrogênio e do fósforo das águas residuais. [13]



O maior crescimento específico ($\mu_{\text{esp.d}^{-1}}$) foi relatado no tratamento T-50 ($0,33 \mu_{\text{esp.d}^{-1}}$) e T-25 ($0,27 \mu_{\text{esp.d}^{-1}}$). Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Luo et al. (2016) em *Coelastrella* sp. QY01 cultivada em efluente de suinocultura tratado com diluição de 20 a 100%, na fase exponencial da cultura batelada, as taxas de crescimento específicas variaram de $0,269$ a $0,325 \text{ dia}^{-1}$. De acordo com os resultados dos parâmetros cinéticos, os tratamentos (T-25 e T-50) podem ser aplicados no sistema de recirculação de aquicultura (RAS) segundo Egloff et al. (2018) esses sistemas limitam as densidades atingíveis de biomassa de microalgas a $1-2 \text{ g dw}^{-1}$, depois que os níveis de nitrogênio estão esgotados e assumindo que o nitrogênio é o nutriente limitante e ocorre a uma concentração de aproximadamente 100 mgL^{-1} em um RAS. [13,14]

4. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou o desempenho de crescimento da *Spirulina* sp. (LEB18) em águas residuais de aquicultura suplementadas com quantidades distintas de nutrientes. Os melhores resultados foram obtidos usando 25% dos ingredientes gerais descritos no meio sintético Zarrouk. Assim, a *Spirulina* sp. (LEB18) cultivada em água residual do cultivo de *Oreochromis niloticus* suplementado com 25% de Zarrouk, representa uma alternativa sustentável para obtenção de biomassa utilizando água residual da aquicultura.

Agradecimentos

Todos os autores agradecem o apoio da FAPESB - Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia no projeto CNPQ (400710 / 2014-5), MCTIC (Ministério da Ciência e Tecnologia da Informação e Comunicação) - Brasil e Bahia Pesca.

5. REFERÊNCIAS

- ¹ Wuang, S. C. Khin, M. C. Chua, P. Q. D. Luo, Y. D. (2016). Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Res*, 15, 59–64.
- ² Ferreira, J. G. L. Falconer, J. Kittiwonich, L. Ross, C. Saurel, K. Wellman, C. B. Z. P. Suvanacha. (2015). Analysis of production and environmental effects of Nile tilapia and white shrimp culture in Thailand. *Aquac. Res* 447, 23–36.
- ³ Salama, E. Byong-Hun, J. B. Chang, W. S. Lee, S. Roh, H. Yang, I. (2017). Interactive effect of indole-3-acetic acid and diethyl aminoethyl hexanoate on the growth and fatty acid content of some microalgae for biodiesel production. *J. Clean. Prod*, 168, 1017–1024.



- ⁴ Costa, J.A.V. Colla, L.M. Duarte Filho, P. Kabke, K. Weber, A. (2004). Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J Ind Microbiol Biotechnol*, 18, 603-607.
- ⁵ Kuo, C. Chen, T. Lin, T. Kao, C. Lai, J. Chang, J. Lin, C. (2015). Cultivation of *Chlorella* sp., GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. *Bioresour. Technol*, 194, 326–333.
- ⁶ Daneshvar, E. Antikainen, L. Koutrac, E. Kornarosc, M. Bhatnagara, A. (2018). Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. *Bioresour. Technol*, 255, 104–110.
- ⁷ Zhou, W. Yanting, L. Goa Y. Haixia Z. (2017). Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol*, 245, 10–17.
- ⁸ Xu, X. Wang, J. Zhang, T. Dao, G. Wu, G. Hu, H. (2017). Attached microalgae cultivation and nutrients removal in a novel capillary-driven photo-bio film reactor. *Algal Res*, 32, 198-205.
- ⁹ Lu, W. Alam, M.A. Luo, W. Asmatulu, E. (2019). Integrating *Spirulina platensis* cultivation and aerobic composting exhaust for carbon mitigation and biomass production. *Bioresour. Technol*, 271, 59-65.
- ¹⁰ Ramsundar, P. Abhishek G, Singh P. Pillay, K. Bux, F. (2017). Evaluation of waste activated sludge as a potential nutrient source for cultivation of *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res*, 28, 108-117.
- ¹¹ Yang, F. Xiang, W. Fan, J. Wu, H. Li, T. Long, L. (2016). High pH-induced flocculation of marine *Chlorella* sp. for biofuel production. *J Appl Phycol*, 28, 747–756.
- ¹² Cheirsilp, B and Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol*, 110, 510–516.
- ¹³ Luo, L. He, H. Yang, C. Wen, S. Zeng, G. Wu, M. Zhou, Z. Lou, W. (2016). Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresour. Technol*, 216, 135–141.
- ¹⁴ Egloff, S. Tschudi, F. Schmutz, Z. Refardt, D. (2018). High-density cultivation of microalgae continuously fed with unfiltered water from a recirculating aquaculture system. *Algal Res*, 34, 68-74.