



PRODUÇÃO DE *Spirulina* sp. (LEB18) COM ELEVADOS TEORES DE PROTEÍNA E FICOCIANINA, UTILIZANDO ÁGUA RESIDUAL DA AQUICULTURA.

Isabella Borges dos Anjos da Silva¹; Lucas Guimarães Cardoso²; Jessica Hartwig Duarte³; Jorge Alberto Vieira Costa³; Denilson de Jesus Assis⁴; Janice Izabel Druzian⁵; Fabio Alexandre Chinalia²; Karina Lizzeth Pedraza Galván⁵

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia; Salvador/BA; isaanjos99@hotmail.com

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

³Laboratório de Engenharia Bioquímica, Faculdade de Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande; Rio Grande/RS

⁴Escola de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia da Informação, Universidade de Salvador; Salvador/BA

⁵Programa de Graduação em Ciências dos Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia; Salvador/BA

Resumo: O objetivo foi produzir biomassa de *Spirulina* sp. (LEB 18) utilizando água residual da aquicultura como meio alternativo e avaliar a composição da biomassa. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores (1L) com 100% de água residual de aquicultura suplementada com T-25, T-50, T-75. O tratamento T-25 apresentou maiores valores de proteína (65,73%) e ficocianina (16,60 mg/mL). Assim, o tratamento com 25% representa uma alternativa eficiente, barata e sustentável para o setor de aquicultura, produzindo biomassa de baixo custo com características diferenciadas e alto valor agregado.

Palavras-Chave: *Spirulina*; aquicultura; proteína.

PRODUCTION OF *Spirulina* sp. (LEB18) WITH HIGH PROTEIN AND PHYCHOCYANINE CONTENT USING AQUACULTURE RESIDUAL WATER.

Abstract: The objective was to produce biomass of *Spirulina* sp. (LEB 18) using aquaculture wastewater as an alternative means and to evaluate the biomass composition. Cultures were performed in photobioreactors (1L) with 100% residual aquaculture water supplemented with T-25, T-50, T-75. Treatment T-25 presented higher values of protein (65.73%) and phycocyanin (16.60 mg/mL). Thus, the 25% treatment represents an efficient, cheap and sustainable alternative for the aquaculture sector, producing low cost biomass with different characteristics and high added value.

Keywords: *Spirulina*; aquaculture; protein.



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 [1]. O Relatório do Banco Mundial estima que a aquicultura produza metade da oferta mundial de pescado até 2030 [2]. Segundo Wuang et al. [3], a aquicultura intensiva utiliza grandes quantidades de água doce limpa e gera fluxos de águas residuais ricas em nutrientes que podem causar a eutrofização das águas costeiras e impactar negativamente as comunidades biológicas a jusante.

Várias tecnologias foram identificadas para o tratamento de águas residuais de aquicultura [4, 5, 6 e 7]. Conforme Kuo et al. [8], o cultivo de microalgas é frequentemente sugerido como a melhor abordagem custo-efetiva a ser aplicada em tais casos. Desta forma, Salama et al. [9] consideram que o cultivo de microalgas é um processo que pode alcançar mais de 90% de remoção de nutrientes inorgânicos com a vantagem de produzir biomassa com baixo custo e alto valor agregado. Sendo assim, Zhang et al. [10] conceituam como insumos para a produção de uma ampla gama de produtos de base biológica, no qual impulsionaria a adoção de microalgas pela indústria para a produção de alimentos para animais e aquicultura. Portanto, a *Spirulina platensis* ocupa uma posição de destaque no mercado global por ser 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.

Alguns autores, como Pokhrel et al. [11], consideram a biomassa de *S. platensis* como um superalimento, sendo amplamente cultivada em todo o mundo, movimentando aproximadamente 30 e 60 bilhões de dólares anualmente. Diante disso, o objetivo foi produzir biomassa de *Spirulina* sp. (LEB18) utilizando água residual da aquicultura como meio alternativo e avaliar a composição da biomassa.

2. METODOLOGIA

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

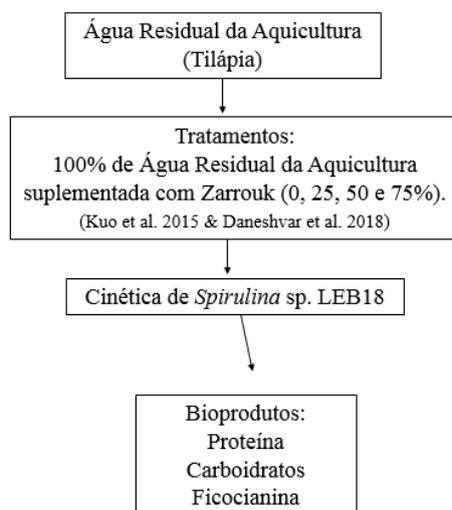
O efluente aquícola foi gentilmente cedido pela Bahia Pesca S/A, localizada na Fazenda Joanes II, em Camaçari - Bahia (Nordeste do Brasil, 12°41'51"S e longitude 38°19'27"O). A cepa de *Spirulina* foi isolada da Lagoa Mangueira, no sul do Brasil (latitude 32°32'05 "S e longitude 33°31'57"O) e mantida em meio de Zarrouk conforme a metodologia de Costa et al. [12]. 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



O diagrama da Figura 1 mostra os passos metodológicos adotados nesta pesquisa. 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; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L; CaCl_2 0.031 g/L; Na_2EDTA 0.08 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L [12]. Devido ao seu reconhecido equilíbrio nutricional, este meio de alga é o comumente utilizado para o cultivo da *Spirulina* sp. A Figura 1 mostra que 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. [8] e Daneshvar et al. [13]. Após a suplementação, cada tratamento foi inoculado com *Spirulina* sp. (LEB 18) (no fim da fase exponencial). O crescimento foi monitorado por 7 dias, após o período a biomassa foi coletada para avaliar a produção, caracterização de biomassa (proteína, lipídios e carboidratos) e eficiência da remoção de nutrientes (utilizado para quantificar o efeito potencial do tratamento causado pelo crescimento de *Spirulina* sp. (LEB18)). O lipídeo extraído da biomassa foi caracterizado e a qualidade potencial do biodiesel a ser produzido foi estimada.

Figura 1. Delineamento experimental mostrando preparações médias com quantidades distintas de nutrientes e o respectivo controle com as análises subsequentes.



2.3. Desenho Experimental

A biomassa da *Spirulina* sp. (LEB18) foi obtida a partir de um tanque de pista (210 L) em cultura contínua (0,1 biomassa g/L) mantido com o meio Zarrouk. Os diferentes ensaios foram preparados em Erlenmeyer com um volume de trabalho de 1 L por meio da utilização da água residual de aquicultura (800 ml) 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. [8] e Daneshvar et al. [13].



Os tratamentos experimentais (T-25, T-50 e T-75) foram preparados com o fornecimento de fotobiorreatores de 1 L (água de aquacultura/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 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foram usadas como fonte de energia.

2.4. Composição de Biomassa e Determinação de Ficocianina

A biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (4.400 rpm, 4 °C por 3 min), lavada com água destilada e novamente centrifugada para remoção total de sais. Posteriormente, as amostras foram congeladas em ultracongelador, liofilizadas e mantidas a -20°C até sua caracterização. As proteínas foram determinadas pelo método colorimétrico elaborado por Lowry et al. [14] através da utilização de albumina de soro bovino como padrão, a partir do pré-tratamento térmico e alcalino da biomassa de microalgas. Os carboidratos foram determinados pelo método do fenol-sulfúrico desenvolvido por Dubois et al. [15] por meio da utilização de uma curva padrão de glicose. Os lipídios foram determinados pelo método de Folch et al. [16]. O método e quantificação de ficocianina seguiram método espectrométrico (densidades ópticas - OD: 652 e 620 nm) sugerido por Prates et al. [17].

O método e quantificação de ficocianina determinado a partir da equação proposta por Bennett et al. [18] e Andrade et al. [19].

$$\text{Ficocianina (mg/mL)} = \text{OD}_{620} - 0.474 (\text{OD}_{652}) / 5.34 \quad (1)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

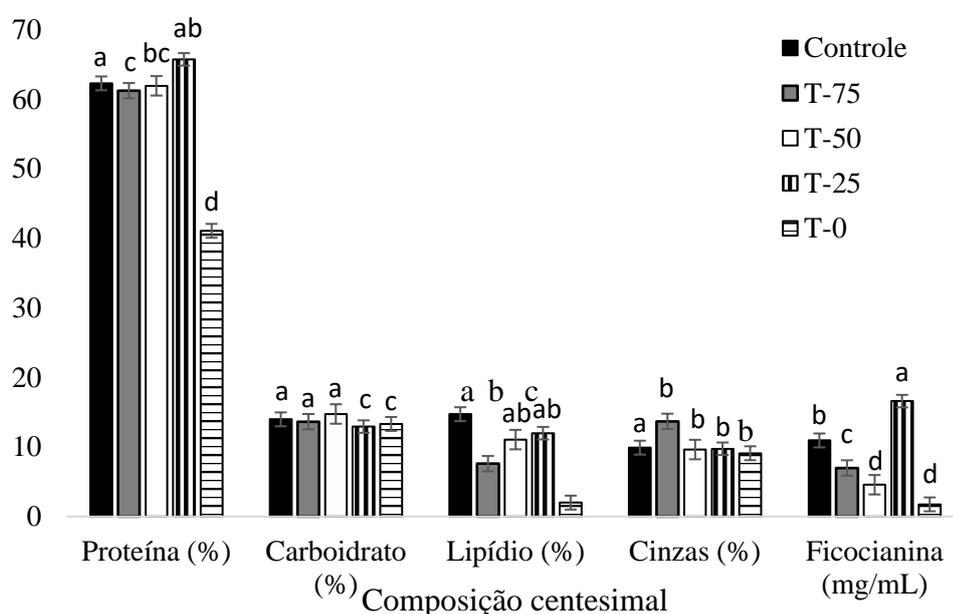
A biomassa microalgal obtida no tratamento T-25 apresentou conteúdo elevado de proteína e ficocianina (65 e 16%) quando comparado com o controle (Figura 2). Segundo Perez-garcia et al. [20], isto ocorre porque as proteínas possuem alta afinidade pelo transporte de nitrato/nitrito presente no cloroplasto. Por outro lado, Wuang et al. [3] relataram que *Spirulina* sp. produziu 75% menos proteína quando cultivada em águas residuais de aquicultura suplementada com 30 g/L de NaCl. No entanto, para Ramsundar et al. [21], o teor de proteína de *Spirulina* sp. foi significativamente maior do que o obtido com *Chlorella sorokiniana* (25%) cultivada em águas residuais semelhantes. De acordo com Marchão et al. [22], o teor de proteína encontrado foi 50,09% para a microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada a partir de água residual de cervejaria, utilizando fotobiorreatores de coluna de bolhas.

Por conseguinte, Xu et al. [23] pressupõem que as microalgas tendem a sintetizar lipídios como compostos de armazenamento de energia devido alto



estresse ambiental, não aplicado ao presente estudo. De outro ponto de vista, Alva et al. [5] preveem que seja resultado da fase de crescimento logarítmico devido a presença de nitrogênio e fósforo em quantidades suficientes no meio de cultura para o crescimento das microalgas. Este resultado sugeriu que a suplementação de águas residuais da aquicultura com 25% e 50% dos ingredientes de Zarrouk não afetou a produção de lipídios dos tratamentos.

Figura 2. Composição centesimal em base seca (DW) e ficocianina de *Spirulina* sp. (LEB18) cultivada em 100% da água residual da aquicultura em diferentes concentrações de Zarrouk (Controle, T-75, T-50, T-25, T-0).



À vista disso, no tratamento T-75 o excesso de nitrogênio e fósforo possivelmente ocorreu, criando uma condição de estresse para microalgas. A presença de baixos nutrientes em T-0 pode ter reduzido a síntese lipídica. Para Mayers et al. [24], o menor teor de proteína em ambos os tratamentos está associado ao acúmulo de carboidratos devido à capacidade de manter a fixação de carbono sob estresse severo. Por outro lado, se houver alguma limitação de nitrogênio a *Spirulina* sp. irá acumular carboidratos [13]. Sendo assim, Wuang et al. [3] consideram que o menor acúmulo de carboidratos ($\leq 15\%$) pode ter associação às limitações do zinco.

A produção de ficocianina foi maior no tratamento com T-25 (Figura 2). Os resultados mostram uma produção de 0,014 g, que é 16 vezes maior que a observada por Zeng et al. [25] em condições semelhantes. Este pigmento está diretamente associado à disponibilidade de nitrogênio e carbono durante o cultivo. Frequentemente, alta produção é observada se não houver limitação de nenhum dos compostos. Além do aspecto nutricional, Manirafasha et al. [26] observaram que a microalga é influenciada por mecanismos de hiperacumulação metabólica e expressão gênica. Ademais, para Chow et al [27], a capacidade intracelular é considerável para armazenar nitrogênio como nitrogênio solúvel e moléculas orgânicas de forma que podem ser regulada e limitada de acordo com a absorção de



nitrogênio. A ficocianina é uma das fontes intracelulares de nitrogênio que pode ser reduzida e utilizada pelas células para persistência durante os períodos de estresse limitantes [26]. Isso explica os resultados nos outros tratamentos.

O teor de cinzas diminuiu nos tratamentos T-50, T-25 e T-0 em relação ao controle. Conteúdo de cinzas semelhante ao presente estudo foi encontrado por Vardon et al. [28] em *Spirulina* cultivada em liquefação hidrotérmica de matérias-primas de efluentes (10 - 12%). De acordo com Huang et al [29], estes resultados podem se aplicar à exploração de biomassa pois as microalgas com baixo teor de lipídios e cinzas e alto teor de proteína podem ser efetivamente convertidas em bio-óleo.

Segundo Zhang et al. [10], as tecnologias integradas como a Aquicultura Multitrófica Integrada (AMTI) são baseadas na aplicação de microalgas para o tratamento e reutilização de efluentes da aquicultura, que podem ser usados para obter biomassa para fins comerciais. Uma possível aplicação do tratamento T-25 aqui apresentado seria sua integração em um sistema AMTI, onde a biomassa de microalgas é posteriormente usada como alimento para outros organismos aquáticos. Estes subprodutos representam enormes potenciais como fontes alternativas de proteína aquática, devido à sua abundância, preços muito acessíveis e perfis nutricionais saudáveis para o crescimento dos peixes e também para as larvas de peixes.

Conforme Nam et al. [30], os resultados da composição química mostraram que as microalgas têm a capacidade de sofrer mudanças programáticas na partição de carbono, e assim as composições celulares, particularmente nas quantidades relativas de proteínas, lipídios e carboidratos, ocorrem em resposta às mudanças nas condições de cultivo.

4. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou o desempenho de crescimento da *Spirulina* sp. (LEB18) em águas residuais de aquicultura suplementadas com quantidades distintas de nutrientes. No tratamento contendo 25% dos ingredientes gerais descritos no meio sintético Zarrouk, foram observados altos teores de proteína e ficocianina. Assim, a *Spirulina* sp. (LEB18) cultivada em água residual do cultivo de *Oreochromis niloticus* suplementado com 25% de Zarrouk, representa uma alternativa sustentável para melhorar as condições ambientais da prática aquícola, reduzindo os impactos das descargas de águas residuais e obtendo biomassa com baixo custo, propriedades diferenciadas e de alto valor agregado.

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

¹FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture. **Meeting The Sustainable Development Goals**, Rome, 223 p., 2018.

²WORLD BANK REPORT. Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. **The World Bank**, Washington, DC, n. 83177, dez. 2013.

³WUANG, S. C. CHUA, P. Q. D. KHIN, M. C. LUO, Y. D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p. 59–64, abr. 2016.

⁴MARKOU, G. CHATZIPAVLIDIS, I. GEORGAKAKIS, D. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in olive-oil mill wastewater treated with sodium hypochlorite. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 234–241, fev. 2012.

⁵ALVA, S. PABELLO, M. L. MANUEL, V. LEDESMA, O. et al. Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes. **Algal Research**, v. 34, p. 97–103, set. 2018.

⁶AZIANABIHA, K. H. A. YAAKOB, Z. ABDULLAH, S. R. S. TAKRIFF, M. S. Analysis of the elemental composition and uptake mechanism of *Chlorella sorokiniana* for nutrient removal in agricultural wastewater under optimized response surface methodology (RSM) conditions. **Journal of Cleaner Production**, v. 210, n. 14, p. 673-686, fev. 2019.

⁷FREIRE, I. CORTINA-BURGUEÑO, A. GRILLE, P. ARIZCUN, M. A. et al. *Nannochloropsis limnetica*: A freshwater microalga for marine aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 459, p. 124-130, jun. 2016.

⁸KUO, CM. CHEN, TY. LIN, TH. KAO, CY. et al. Cultivation of *Chlorella* sp., GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 326–333, out. 2015.

⁹SALAMA, E. BYONGHUN, J. SOONWOONG, C. SANGHUN, L. et al. Interactive effect of indole-3-acetic acid and diethyl aminoethyl hexanoate on the growth and fatty acid content of some microalgae for biodiesel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 168, p. 1017–1024, dez. 2017.

¹⁰ZHANG, L. PEI, H. YANG, Z. WANG, X. et al. Microalgae nourished by mariculture wastewater aids aquaculture self-reliance with desirable biochemical composition. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 205-213, abr. 2019.

¹¹POKHREL, A. Soni, P. Performance analysis of different rice-based cropping systems in tropical region of Nepal. **Journal of Environmental Management**, v. 197, p. 70–79, jul. 2017.

¹²COSTA, J. A. V. COLLA, L. M. FILHO, P. D. KABKE, K. et al. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2004.



- ¹³DANESHVAR, E. ANTIKAINEN, L. KOUTRA, E. KORAROS, M. et al. Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. **Bioresource Technology**, v. 255, p. 104–110, jan. 2018.
- ¹⁴LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N. J. FARR, A. L. RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, nov. 1951.
- ¹⁵DUBOIS, M. GILLES, K. A. HAMILTON, J. K. REBERS, P. A. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, mar. 1956.
- ¹⁶FOLCH, J. LEES, M. STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, mar. 1957.
- ¹⁷PRATES, D. F. RADMANN, E. M. DUARTE, J. H. DE MORAIS, M. G. et al. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 38–43, mai. 2018.
- ¹⁸BENNETT, A. BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.
- ¹⁹ANDRADE, B. B. CARDOSO, L. G. ASSIS, D. J. COSTA, J. A. V. et al. Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 340-348, jul. 2019.
- ²⁰PEREZ-GARCIA, O. DE-BASHAN, L. E. ESCALANTE, F. BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, ago. 2010.
- ²¹RAMSUNDAR, P. ABHISHEK, G. SINGH, P. PILLAY, K. et al. Evaluation of waste activated sludge as a potential nutrient source for cultivation of *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 28, p. 108-117, 2017.
- ²²MARCHÃO, L. M. A. DA SILVA, T. L. GOUVEIA, I. H. REIS, A. Microalgae-mediated brewery wastewater treatment: effect of dilution rate on nutrient removal rates, biomass biochemical composition, and cell physiology. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 1583–1595, dez. 2017.
- ²³Xu, XQ. WANG, JH. ZHANG, TY. DAO, GH. et al. Attached microalgae cultivation and nutrients removal in a novel capillary-driven photo-bio film reactor. **Algal Research**, v. 32, p. 198-205, nov. 2017.
- ²⁴MAYERS, J. MALMHALL-BAH, E. ALCAIDE-SANCHO, J. Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. **Algal Research**, v. 31, p. 430-442, mai. 2018.
- ²⁵ZENG, X. DANQUAH, M. K. ZHANG, S. ZHANG, X. et al. Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 192–197, fev. 2012.
- ²⁶MANIRAFASHA, E. MURWANASHYAKA, T. NDIKUBWIMANA, T. RASHID, A. N. et al. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira*



(*Spirulina*) platensis by metabolic stress and nitrate fed-batch. **Bioresource Technology**, v. 255, p. 293-301, mai. 2018.

²⁷CHOW, F. **Nitrate assimilation: the role of in vitro nitrate reductase assay as nutritional predictor. In: Agricultural and Biological Sciences.** São Paulo: Applied Photosynthesis, mar. 2012, v. 14, p. 105–120.

²⁸VARDON, D. R. SHARMA, B. K. SCOTT, J. YU, G. et al. Chemical properties of biocrude oil from the hydrothermal liquefaction of *Spirulina* algae, swine manure, and digested anaerobic sludge. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8295-8303, set. 2011.

²⁹HUANG, Y. CHEN, Y. XIE, J. LIU, H. et al. Bio-oil production from hydrothermal liquefaction of high-protein high-ash microalgae including wild *Cyanobacteria* sp. and cultivated *Bacillariophyta* sp. **Fuel**, v. 183, p. 9-19, nov. 2016.

³⁰NAM, K. LEE, H. H. HEO, SW. CHANG, Y. K. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* with swine wastewater and potential for algal biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 1171–1178, dez. 2016.