



TRATAMENTO DE EFLUENTE DE PISCICULTURA PELA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

Nicolli Reck – nicolli.reck@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Engenharia Ambiental.
Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Liange Reck – liareck@hotmail.com

Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Hudson Damasceno Maia - hudsondmaia@gmail.com

Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca

Wladimir Ronald Lobo Farias - wladimir@ufc.br

Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca

Carlucio Roberto Alves - alvescr@pq.cnpq.br

Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Resumo: As microalgas apresentam potencial como agente biorremediador de efluentes com a possibilidade de diversas aplicações como, produção de proteína unicelular, lipídios, carotenoides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento da microalga *Chlorella vulgaris* no meio de cultivo Chu e em efluente de *Oreochromis niloticus* no intuito de avaliar a biorremediação de NO_3^- e PO_4 . O experimento foi realizado em biorreator erlenmeyer de 1L com volume final de 500mL. Para avaliação do crescimento de *C. vulgaris*, diariamente foi aferido sua densidade celular, igualmente, foram avaliados a remoção de NO_3^- e PO_4 . Conclui-se que a remoção de nutrientes e crescimento celular do sistema em estudo pode ser utilizado para tratamento de efluentes piscícolas.

Palavras-chave: Biorremediação; Biotecnologia; Biomassa.

PISCICULTURE WASTEWATER TREATMENT BY MICROALGAE *Chlorella vulgaris*

Summary: Microalgae have potential as wastewater bioremedial agent with the possibility of various applications as: single cell protein production, lipids, carotenoids, chlorophyll, enzymes, esters, antibiotics, hydrocarbons and vitamins. This study aimed to evaluate the development growth of microalgae *Chlorella vulgaris* in the Chu growth medium and *Oreochromis niloticus* wastewater in order to evaluate the bioremediation of NO_3^- and PO_4^- . The experiment was performed in erlenmeyers bioreactors of 1L and final volume of 500 mL. To evaluate the growth of *C. vulgaris*, the cell density was measured daily, also it was evaluated the removal of NO_3^- and PO_4^- . It is concluded that the removal of nutrients and cell growth system in study may be used for the treatment of fish wastewater.

Keywords: Bioremediation; Biotechnology; Biomass.



1. INTRODUÇÃO

Com a atual situação mundial, mediada pelos impactos causados ao meio ambiente, é truísmo que a poluição está diretamente associada a problemas ambientais causados pela economia global. O aumento da poluição, industrialização e rápido desenvolvimento econômico impuseram sérios riscos à disponibilidade e qualidade dos recursos hídricos.

Para tanto, busca-se potencial biotecnológico para alternativas de se reduzir impactos ambientais de forma sustentável e economicamente viável, principalmente, em ecossistemas de água doce. Microalgas para a biorremediação de efluentes vêm sendo o foco de estudos devido o baixo custo e ser uma tecnologia simples, sustentável e econômica.

As microalgas, sob o ponto de vista biotecnológico, não compõem grupo de microrganismos muito estudado. Dentre as dez mil espécies de microalgas existentes, pouco mais de mil estirpes são mantidas em coleções, sendo que, algumas centenas foram investigadas por seu conteúdo químico e somente pequena quantidade tem sido cultivada em escala industrial. Por serem pouco exploradas, representam elevada oportunidade para novas descobertas (OLAIZOLA, 2003).

A biotecnologia de microalgas demonstrou versatilidade em diferentes setores, atuando com potencial no tratamento de efluentes, biorremediando metais pesados, nitrogênio e fósforo que podem causar eutrofização quando descartados diretamente em lagos e rios. Além do mais, a biomassa produzida no processo de remediação pode servir como fonte de matéria-prima para produção de ração, fertilizantes, e até mesmo ser utilizada na indústria de química fina (DE LA NOÛE & DE PAUW, 1988).

O comércio em grande escala de culturas de microalgas iniciou em 1960 no Japão com a cultura de *Chlorella* sp. Em um período de aproximadamente 30 anos a biotecnologia industrial de microalgas teve um crescimento significativo. Sabe-se que a produção de biomassa microalgal aproxima-se de 5000 t por ano (SPOLAORE et al., 2006). Entretanto no Brasil, ainda é pouco explorada, assim sendo, grande parte da matéria-prima é importada de outros países.

As atividades piscícolas vêm crescendo em ritmo acelerado no Brasil, principalmente no nordeste do país, devido sua lucratividade e por ser uma alimentação rica em proteínas de primeira qualidade. Todavia, geram uma quantidade considerável de efluentes que geralmente são dispostos no ambiente sem nenhum tratamento prévio, trazendo consequências ambientais negativas aos corpos hídricos. Entretanto, os mesmos não deveriam ser lançados no ambiente sem o devido tratamento, logo há necessidade de promover a redução dos compostos presentes nestes efluentes, tornando-os mais adequados para o descarte nos ecossistemas (ASLAN; KAPDAN, 2006; XIN et al., 2010).

A descarga de efluentes piscícolas, com tratamento insuficiente em corpos de água receptores, pode resultar rigorosos problemas ambientais, deterioração dos meios naturais e morte de organismos não alvo. Atualmente tem sido crescente a preocupação com a remoção dos nutrientes das águas, baseada na necessidade de garantir qualidade do efluente, bem como, proteger corpos de água receptores.

O acúmulo de nutrientes em águas naturais pode causar eutrofização, conseqüentemente, proliferação de microalgas (algumas podendo liberar toxinas nocivas à saúde de animais e do homem), diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, problemas de odor e morte de peixes, dificultando a autodepuração do corpo hídrico receptor (KUMMER et.al., 2011). Deste modo, é fundamental exigências quanto à qualidade do efluente descartado a fim de preconizar a remoção de matéria orgânica e de nutrientes como prioridades dos tratamentos biológicos e físico-químicos disponíveis.

Cientistas, piscicultores, organizações ambientais e agências internacionais têm objetado a estas preocupações sugerindo maneiras para aprimorar o comprometimento sócio ambiental. A Resolução do CONAMA 357/2005 que retrata a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, está como exemplo, ainda que, há muito a perpetrar.

O tratamento de efluentes envolve altos custos, desta forma, há interesse na pesquisa e em estudos de novos processos para a remoção de nutrientes e matéria orgânica. A remoção de azoto (N) e fósforo (P) de efluentes de piscicultura, mediada por microalgas é indispensável para redução potencial da eutrofização de corpos de água que podem ser eficientemente recuperados e reciclados e, ainda, sua biomassa pode ser biotransformada para a produção de biocombustíveis, fertilizantes,



rações para alimentação animal, pigmentos, antioxidantes, bioplásticos e biocompósitos. Diante do exposto, objetivou-se neste estudo avaliar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, bem como determinar a remoção dos nutrientes nitrato (NO_3^-) e fosfato (PO_4^{3-}) de efluente de piscicultura em biorreatores.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As cepas utilizadas para este estudo foi de *Chlorella vulgaris* obtida no Centro de Biotecnologia Aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA) no laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC.

Os experimentos foram realizados em escala laboratorial em reatores tipo erlenmayer, ambos em batelada e triplicata. Para aclimação do inóculo, quinze dias precedente ao início dos experimentos, a microalga foi cultivada no meio de cultura conforme cada tratamento, efluente de *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como tilápia-do-nylo (Tabela 1) e meio de cultivo Chu (CHU, 1942), meio de cultivo padrão que corresponde a um meio sintético contendo todos os nutrientes necessários ao crescimento da microalga, sendo este o controle.

O meio de cultivo Chu foi selecionado como padrão por apresentar maior crescimento de biomassa para a microalga *C.vulgaris* em comparação a outros meios de cultivo testados em laboratório em erlenmayer de 50mL (meio Guillard, meio Jordan, meio Schlosser e meio Chu) através de contagem de células em microscópio óptico durante sete dias consecutivos. Na tabela 2 estão apresentados os compostos utilizados no preparo do meio Chu.

Tabela 1 – Caracterização do efluente de *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nylo) após 12h de alimentação dos animais.

DBO	4,2
Nitrato	14,9
Fosfato	8,9
pH	6,61
Alcalinidade	29,22
OD	9,55
Temperatura	27,2
Sólidos Suspensos	59

Tabela 2 - Preparo do meio de cultivo CHU.

Reagentes	Fórmula	Quantidade (mg)
	(NO_3) $2.4\text{H}_2\text{O}$	
Nitrato de cálcio tetra-hidratado	4.300	4.300
Bifosfato de potássio	K_2HPO_4 500	500
	$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	7.500	7.500
Cloreto de potássio	KCl 500	500
Carbonato de sódio	Na_2CO_3 2.000	2.000
Cloreto férrico hexa-hidratado	$\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ 50	50

Fonte: CHU (1942)

A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave a 121°C por 15 minutos conforme, APHA (2005). O primeiro inóculo foi realizado em tubos de ensaio no volume de 10 mL e posteriormente foram transferidos para frascos erlenmayer de 50mL, 125 mL, 250 mL, 500mL e por último 1L. O volume final do efluente e meio de cultivo CHU correspondem a 500mL e a concentração de inóculo correspondia sempre a 10% do volume final da cultura.

Os frascos foram mantidos em incubadora DBO com iluminação constante (fotoperíodo de 24h) (ZHANG et al., 2011), promovida por duas lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia” da marca Taschibra com 20 watts de potência cada, o que corresponde a uma intensidade luminosa igual a 56 μmol de fótons. m^{-2} . s^{-1} (JACOB LOPEZ, 2007), medidos pelo equipamento Luxímetro da marca Minipa modelo MLM 1010 (precisão de $\pm 4\%$), temperatura controlada por sensor, com *set point* para $25 \pm 0,5$ °C, o pH no meio entre 6 e 8 (RODRIGUES, 2004) e tempo de incubação de 13 dias correspondente a fase estacionária - não há incremento da população e a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade celular.

Para determinação da concentração celular, diariamente eram retirados 10 mL de amostra de cada unidade experimental assepticamente em câmara de fluxo laminar, conforme descrito por APHA (2005). A contagem celular foi realizada em triplicata com o auxílio de uma Câmara de Neubauer em microscópio com aumento de 400x (LOURENÇO, 2006).

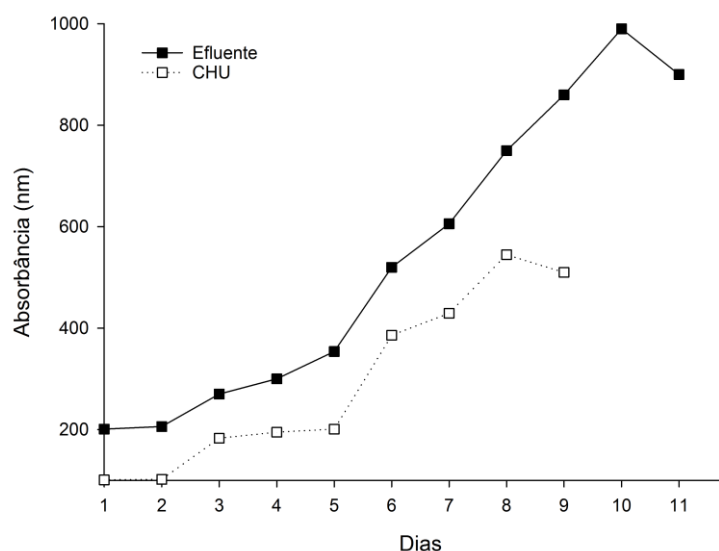
Também foi realizada a densidade óptica no comprimento de onda igual a 680 nm, em espectrofotômetro HACH DR 2700 valor recomendado para ler a cor verde, contra branco constituído pelo meio estéril, sem inóculo. As leituras dos valores de absorbância foram efetuadas em todas as amostras, sem qualquer preservação, imediatamente após a retirada de uma alíquota de cada amostra e transferência desta para a cubeta do espectrofotômetro.

Para as mensurações de NO_3^- e PO_4^{3-} foram retirados 50mL de amostra de cada unidade experimental, conforme descrito acima, a cada dois dias e determinados por espectrofotometria de leitura direta em espectrofotômetro HACH DR 2700 com os reagentes NitraVer® Nitrate 10mL e PhosVer® Phosphate 10mL, respectivamente. Os testes em cuvete da Hach são utilizados com equipamentos sensíveis, de modo a garantir a máxima confiança no procedimento analítico. O equipamento assim desenvolvido é manuseado de forma simples e sistemática, minimizando a ocorrência de erros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o cultivo da microalga *C. vulgaris* constatou-se o crescimento ao longo do tempo, atingindo uma absorbância final de 0,99nm para o efluente (Figura 1) e 0,545nm para o cultivo padrão Chu (Figura 1) sendo que iniciou em 0,201nm e 0,101nm, respectivamente. Na Figura 1 constatamos que a coleta de biomassa algal em efluente deve ser entre os dias 8 e 10, assim pode-se dar um destino à biomassa, dependendo do objetivo. Além do mais, nestes dias é necessário efetivar um aporte de nutrientes ao sistema, neste caso, repor efluente.

Figura 1 - Crescimento da microalga *C. vulgaris* por absorbância (680nm) em espectrofotômetro.



O crescimento da microalga promoveu a remoção de 67 % de NO_3^- (Figura 2) e 93 % de PO_4^{3-} (Figura 3) restando $4,9 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrato e $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de fosfato em efluente de tilápia demonstrando ser um sistema eficiente para remoção destes nutrientes, principalmente de PO_4^{3-} . Estudos com remoção de nutrientes em águas residuais domésticas com a utilização de *C. vulgaris* reportam eficiência na ordem de 100% na remoção de azoto (N) e de cerca de 95% na remoção de fósforo (LAU et al., 1998).

Estudos com tratamento de efluente de tilápia em tanques, utilizando aguapé, confirmaram remediação de 43% de nitrogênio inorgânico e 49% de fósforo (CREMA, 2005). Também, Henry-Silve e Camargo (2008) constataram remediação de efluente de carcinicultura através de *Eichhornia crassipes* e verificaram remoção de P em 71%, desta maneira, percebe-se que a microalga em estudo foi mais eficiente para remoção de nutrientes que plantas aquáticas.

Segundo Méndez (2003) *C. vulgaris* tem a capacidade de assimilar e incorporar fósforo e nitrogênio, em suas células, para utilizar nos processos de fotossíntese e respiração. Sendo que esses compostos são os principais requerimentos nutricionais para o crescimento e desenvolvimento microalgal. Logo, vai influenciar na composição bioquímica da biomassa microalgal, podendo servir como matéria-prima para indústria. Este estudo confirmou ser viável a produção de biomassa de *C. vulgaris* a partir de efluente de tilápia.

Os resultados neste estudo com a microalga *C. vulgaris* demonstraram-se satisfatório comparado a outros organismos utilizados para remoção dos nutrientes azoto e fósforo demonstrando ser um sistema eficiente, ainda que, carecem estudos futuros. O grupo está desenvolvendo tanques economicamente viáveis para que futuramente possam ser implantados em fazendas de peixes para o tratamento dos efluentes para aproveitamento de água, ou quando necessário descarte do efluente esteja adequado segundo a Resolução do CONAMA 357/2005.

Figura 2 - Remoção do nutriente nitrato (NO_3^-) em função do tempo para a microalga *C. vulgaris* em efluente piscícola e meio de cultivo padrão Chu.

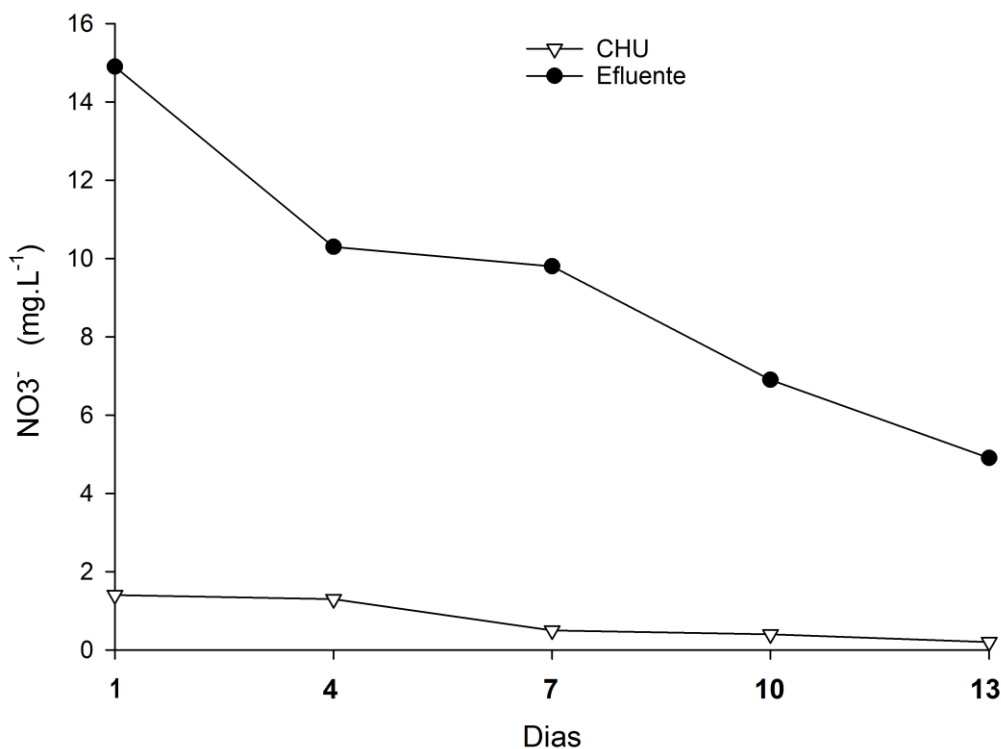
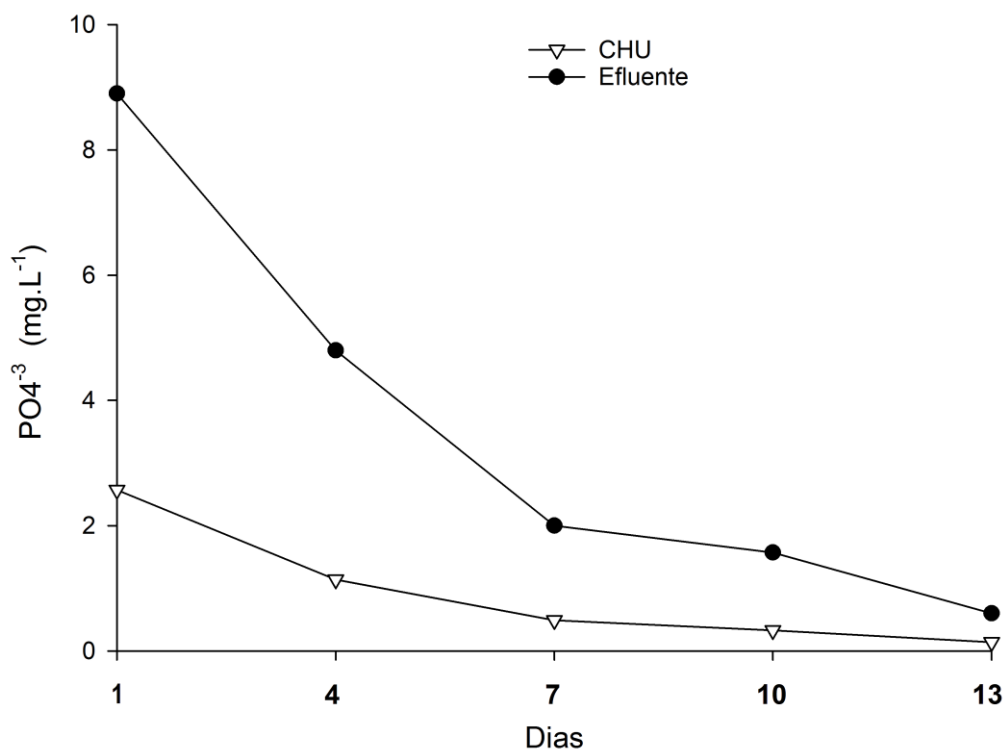


Figura 3 - Remoção do nutriente fosfato (PO_4^{-3}) em função do tempo para a microalga *C. vulgaris* em efluente piscícola e meio de cultivo padrão Chu.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microalga *C. vulgaris* cresceu em efluente de tilápia-do-nylo e promoveu a remoção dos nutrientes NO_3^- e PO_4^{-3} . A substituição do meio de cultivo por efluente orgânico pode ser explorada como forma de diminuir os custos para o crescimento das mesmas com consequente produção de biomassa.

Técnicas de biorremediação em biorreator com o uso de *C. vulgaris* se mostram viáveis, por melhorarem a qualidade de efluentes de piscicultura com vantagens de rápida adaptação, fácil manuseio e baixo custo, amenizando cargas de nutrientes dos efluentes a serem lançados e consequentemente, diminuindo processo de eutrofização de corpos receptores.

Durante esse trabalho foi possível observar algumas limitações e dificuldades. Com base nesses dados, conclui-se que há a necessidade de desenvolver mais experimentos com a obtenção de mais dados. Dentre as etapas futuras pode-se citar: realização de cultivos com períodos mais longos visando à redução completa dos nutrientes no meio e estimar a eficiência do processo em larga escala (biorreator e tanques).

Agradecimentos

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior, pela bolsa de doutorado concedida à coautora, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará e a Universidade Federal de Santa Maria, pelo financiamento de parte do projeto.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21th ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 2005.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological engineering**, n. 28, p. 64–70, 2006.

CHU, S. P. 1942. The influence of the miceral composition of the medium on the growth of planktonic algae. L-methods and culture media. **Journal of Ecology**, n 30, p.284-325.

CREMA, L.C. **Efluentes de tanques de criação de Tilápia do Nilo: Características limnológicas e eficiência de tratamento pelo Aguapé**. São Paulo, 63p, 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

DE LA NOÛE, J.; DE PAUW, N. The potencial of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. **Biotechnology Advances**, v.6, p.725-770, 1988.

FIERRO, S.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P.; COPALCÚA, C. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. **Bioresource Technology**, n.99, p.1274–1279, 2008.

JACOB LOPES, E. **Seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores**. Campinas, 2007. Dissertação (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

KUMMER, A.C., ANDRADE, L., GOMES, S.D., FAZOLO, A., HASAN, S.M., MACHADO, F. Tratamento de efluente de abatedouro de tilápia com adição de manipueira na fase anóxica. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.31, n.1, p.150-157, 2011.

LAU, P.S.; TAM, N.F.Y; WONG, Y.S. Operational optimization of batchwise nutrient removal from wastewater by carrageenan immobilized *Chlorella vulgaris*. **Water Science and Technology**, v.38, n.1, p: 185-192, 1998.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações**. Rima: São Carlos, 2006.

MARIN, A. R.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**. n.101, p. 58–64, 2010.

MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMENEZ, J. M.; YOUS, F. E.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, n.73, p. 263-272, 2000.

MÉNDEZ, N. J. Evaluacion de la remoción de fosforo y nitrogenio de aguas residuales por el alga *Chlorella ssp*. **Revista Institucional de la Facultad de Salud.Colombia**. 2, p. 41-46. 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, BRASIL. **Resolução CONAMA nº 357 de 03/2005**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.



OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

RODRIGUES, J. B. R. BELLI FILHO. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com uréia. **Biotemas**, n. 17, v.2, p.7-26, 2004.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Comercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience And Bioengineering**, p. 87-96, 2006.

XIN, L.; YING, H. H.; KE, G.; JIA, Y. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources **Ecological Engineering**, n. 36, p.379–381, 2010.

ZHANG, Y. ET. AL. Simultaneous organic carbon, nutrients removal and energy production in a photomicrobial fuel cell (PFC). **Energy Environment Science**, n. 4, p. 4340–4346, 2011.