

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



**CULTIVO DA MICROALGA MARINHA *Nannochloropsis oculata* EM
EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE CAMARÃO EM SISTEMA BFT**

CAMILA BESOLD

RIO GRANDE-RS, 2015

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

**CULTIVO DA MICROALGA MARINHA *Nannochloropsis oculata* EM
EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE CAMARÃO EM SISTEMA BFT**

CAMILA BESOLD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura da Universidade Federal de Rio Grande.

Orientador: Dr. Paulo Cesar Oliveira Vergne de Abreu

Rio Grande, março de 2015

ATA DE APROVAÇÃO

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	8
Referências Bibliográficas.....	13
CAPÍTULO I.....	19
Resumo.....	20
Abstract.....	21
1. Introdução.....	22
2. Material e métodos.....	24
2.1 Obtenção do inóculo e efluente.....	24
2.2 Delineamento experimental.....	24
2.3 Parâmetros abióticos.....	26
2.4 Parâmetros bióticos.....	26
2.5 Floculação da biomassa e quantificação de lipídios e dos ácidos graxos na biomassa.....	27
2.6 Análise estatística.....	28
3. Resultados.....	28
3.1 Experimento 1.....	28
3.2 Experimento 2.....	29
4. Discussão.....	36
5. Referências Bibliográficas.....	42
DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS DE FUTURAS PESQUISAS.....	49
Referências Bibliográficas.....	53

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Paulo César Abreu pela orientação e pela oportunidade de trabalhar com um profissional como você. Aprendi com você coisas que vou levar para toda minha vida. Muito obrigada por todo tempo dedicado a mim, por sua disponibilidade, por estar presente em todos os momentos da realização desse trabalho, por compartilhar sua experiência e conhecimento. Suas palavras de incentivo me fizeram crescer profissionalmente e melhorar como pessoa, não há palavras que possam expressar minha gratidão.

Agradeço a banca examinadora desse trabalho pelas contribuições.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande em especial ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura por todos os professores e servidores.

Muito obrigada Mariana Holanda por toda ajuda na realização dos experimentos, pela troca de ideias, de artigos, de angústias, pelas longas conversas (psicológicas) e por tantas risadas (We believe in our system!) e aos demais colegas e amigos do laboratório cultivo de microalgas: Stela, Bruno, Lucélia, Carol, Fábio, Ricardo e Wladimir, obrigada por todo tipo de ajuda e pelo conhecimento que compartilharam comigo durante esses dois anos.

Agradeço ao projeto camarão por ceder o efluente com bioflocos e ao laboratório Kolbe pela ajuda nas análises de lipídios e ácidos graxos.

Agradeço aos meus pais Edmar e Haide Inêz por tudo que fizeram por mim desde sempre, pela vida, pela educação, pelos valores passados, pelo exemplo de luta e trabalho. Vocês são meus alicerces. Aos meus irmãos Vagner e Vinicius por sempre terem me apoiado em qualquer circunstância, muito obrigada por terem me dado os tesouros da minha vida: Êmili, Mateus e Yasmin (Sou a tia mais feliz do mundo!) e por me trazer de presente duas “irmãs” Madalena e Fernanda, sem palavras para agradecer tudo que fizeram por mim e para qualquer lugar que eu vá eu sei que sempre poderei voltar pra casa.

Agradeço a todos meus amigos pela motivação e apoio e por tornarem minha vida ser mais leve.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, muito obrigada.

RESUMO

A produção massiva de microalgas está limitada por vários aspectos técnicos, dentre estes destaca-se a necessidade de meios de cultivo mais baratos. Efluentes da aquicultura, que contém altas concentrações de nutrientes podem ser uma alternativa mais econômica aos meios de cultivos convencionais. O objetivo desse estudo foi utilizar o efluente da produção de camarão em meio com bioflocos (sistema BFT - *Biofloc Technology System*) como um meio de cultivo para a microalga marinha *Nannochloropsis oculata*. Em um primeiro experimento, laboratorial verificou-se o crescimento da microalga em diferentes concentrações do efluente integral (25, 50, 75 e 100%). No segundo experimento realizado em estufa agrícola, num volume de 5L, em condições ambientais cultivou-se a microalga no efluente integral e comparou-se com os meios f/2 e um meio com fertilizantes químicos. Os dois experimentos foram realizados em triplicata e os dados submetidos à análise para verificação de diferenças estatísticas pelo teste ANOVA (one way) e posterior teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados do primeiro experimento demonstraram que os maiores crescimentos celulares ocorreram nos tratamentos com 75% ($219 \pm 34,4$ céls. $\times 10^6$ mL^{-1}) e 100% ($192,4 \pm 27,7$ céls. $\times 10^6$ mL^{-1}). Estes foram significativamente maiores do que os demais tratamentos, mas semelhantes entre si. No segundo experimento, a máxima abundância celular foi registrada no tratamento com meio BFT (T-BFT: $25,57 \pm 0,17$ céls. $\times 10^6$ mL^{-1}), porém não houve diferença estatística dos demais. A maior porcentagem de lipídios foi registrada no tratamento com bioflocos ($34,76 \pm 5,8\%$), mas da mesma forma este resultado não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Diferenças no perfil dos ácidos graxos foram detectadas entre os tratamentos BFT e fertilizante, com maiores percentuais dos ácidos graxos C18:1t, C18:1c e C18:2 no tratamento BFT, possivelmente devido às diferentes fontes de nitrogênio nos meios. *N. oculata* removeu $27,95$ mg L^{-1} de nitrato e $4,78$ mg L^{-1} do fosfato em doze dias de experimento. A redução do nitrogênio amoniacal ao final do cultivo parece ter resultado principalmente da ação de bactérias nitrificantes presentes no tratamento BFT. Conclui-se que o efluente BFT puro pode ser usado como um meio para o cultivo massivo de *N. oculata*, produzindo as mesmas biomassas, quantidades de lipídios e composição de ácidos graxos que os outros meios normalmente utilizados. Além disso, o crescimento

desta microalga neste meio removeu grande quantidade de nutrientes que podem causar eutrofização do corpo d'água receptor e do próprio sistema de aquicultura com bioflocos, demonstrando a grande capacidade de depuração de efluentes de *N. oculata*.

ABSTRACT

The massive production of microalgae is limited by many technical features, among these the necessity to use cheaper culture medium has had great attention. Effluents of aquaculture have high concentrations of dissolved inorganic nutrients and they represent a cheaper alternative to conventional culture medium normally used. The objective of this study was to test effluent with bioflocs (BFT- *Biofloc Tecnology System*) as a culture media to the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. In a first laboratorial experiment we verified the microalga cell growth in different concentrations of the effluent (25, 50, 75 e 100%). In the second experiment, which was done at a greenhouse, in a volume of the 5 L, we cultivated the microalga in pure effluent and compared its growth and other characteristics with cells raised in f/2 and fertilizers medium. The two experiments were done in triplicate and the data submitted to the ANOVA (one way) and Tukey ($p < 0,05$) post hoc analyses. The results the first experiment demonstrated that the highest increase in cell numbers occurred in treatments with 75% ($219 \pm 34,4$ cells. $\times 10^6$ mL⁻¹) and 100% ($192,4 \pm 27,7$ cells. $\times 10^6$ mL⁻¹) effluents. They were significantly higher than other treatments, but similar to each other. Differences in the fatty acid profile were detected between BFT treatments and fertilizer media, with higher percentages of fatty acids C18:1t, C18:1c and C18:2 in BFT treatment, possibly because of the different sources of nitrogen in the culture medium. *N. oculata* removed 27, 75 mg L⁻¹ of the nitrate and 4,78 mg L⁻¹ of the phosphate in twelve days of experiment. The reduction of ammonia nitrogen at the end of cultivation seems to be the result of the action of nitrifying bacteria present in the BFT treatment. We conclude that pure BFT effluent can be used as a culture medium for massive cultivation production of *N. oculata*, generating the same biomasses and amounts of lipid and fatty acid composition than the other tested culture medium. In addition, the growth this microalga in this media removed large amount of nutrients that can cause eutrophication in the receiving water body and BFT system, showing the great depuration capacity of *N. oculata*.

INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura está em ascensão no mundo todo, principalmente devido à exaustão dos estoques pesqueiros, à procura de alimentos biosseguros e à preocupação com a escassez dos recursos aquáticos. A produção de peixes, crustáceos e moluscos em água doce e em sistemas marinhos cresceu a uma taxa média anual de 7,8% em todo o mundo entre 1990 e 2010 (FAO 2014). Atualmente, cerca de metade do peixe consumido em todo o mundo já é fornecida pela aquicultura e sua participação deverá aumentar no futuro (Troell *et al.* 2014). Dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (2012) evidenciam que a participação brasileira nesse segmento está aumentando de forma gradual com um incremento de 51,2% na produção durante o triênio 2009-2011.

Organismos aquáticos são fontes de alimentos, de elevado valor nutricional, pois produzem proteína de alta qualidade, são ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeias longas e ainda podem ser comercializados como muitos outros produtos como suplementos alimentares ou fármacos (Olsen *et al.* 2014). Mas para garantir a sustentabilidade da produção aquícola são necessárias algumas medidas, como a diminuição da utilização dos recursos terrestres e de água doce, a expansão da aquicultura de baixo nível trófico, redução da utilização de recursos pesqueiros e insumos de petróleo, desenvolvimento de sistemas de produção integrada e práticas de gestão ambientalmente saudáveis (Naylor *et al.* 2000).

A carcinicultura é um dos ramos da aquicultura que está desenvolvendo sistemas de produção mais sustentáveis. Hoje já é possível produzir de forma superintensiva utilizando-se a tecnologia de bioflocos (*Biofloc Technology System - BFT*) (Krummenauer *et al.* 2011). Esse sistema caracteriza-se pela pouca ou ausência de renovação de água e pela absorção de compostos nitrogenados como a amônia (que é tóxica para peixes e crustáceos) pelos microrganismos que os transformam em biomassa e formam agregados. Estes também servem como suplemento alimentar para os animais produzidos (Crab *et al.* 2012).

O manuseio dos níveis de carbono e nitrogênio na água permite a formação de flocos microbianos e o crescimento de uma comunidade bacteriana que atua na ciclagem especialmente de elementos nitrogenados como amônia e nitrito, que são tóxicos a peixes e camarões. De maneira geral, estes nutrientes são mantidos em baixas

concentrações, mas o nitrogênio orgânico dissolvido e principalmente o fosfato se acumulam neste sistema atingindo valores muito elevados (Silva *et al.* 2013), ao longo de sucessivos ciclos de produção (Krummenauer *et al.* 2014), devido a isso, o sistema BFT reduz drasticamente a renovação de água. Porém, quando ocorre a despesca dos organismos produzidos grande parte dos nutrientes como fosfato, nitrito e nitrato podem estar em elevadas concentrações, impedindo seu reuso e podendo gerar efluentes capazes de acelerar a eutrofização dos ecossistemas naturais (Schneider *et al.* 2005; Krummenauer *et al.* 2012).

O tratamento de efluentes gerados pela aquicultura é um dos desafios a serem enfrentados na produção aquícola. Assim como na indústria e na agricultura, as águas residuais são ricas em compostos com capacidade de alterar drasticamente o equilíbrio do ecossistema onde são lançadas (Ghaly *et al.* 2005). Mudanças nas proporções entre os nutrientes, ocasionadas pela descarga de elevados níveis de fósforo ou nitrogênio, podem mudar a composição das espécies no ambiente natural, causando prejuízos irreparáveis como modificação na estrutura trófica, surgimento de espécies produtoras de toxinas e formação de regiões hipóxicas, ou anóxicas (Ryther & Dunstan, 1991).

Uma das alternativas para solucionar este problema é o tratamento desses efluentes por organismos capazes de absorver o excesso de nutrientes havendo, ainda, a geração de biomassa e de elementos de interesse comercial. O uso de microalgas tem sido apontado como um eficiente mecanismo depurador de efluentes da aquicultura. Seu uso como microrganismo biorremediador vem sendo estudado desde 1957 (Pittman *et al.* 2010). Trabalhos que vêm sendo realizados mostram a viabilidade desse processo, como o de Jiang *et al.* (2011) que testaram o tratamento de esgoto com *Nannochloropsis* sp. e Cai *et al.* (2013) que cultivaram *Nannochloropsis salina* usando a digestão anaeróbica de efluentes, como fonte de nutrientes para a produção de biocombustíveis.

Microalga é um termo sem valor taxonômico, que serve como denominação de um grupo muito heterogêneo de organismos unicelulares e microscópicos, eucariontes e procariontes que possuem clorofila e realizam a fotossíntese, processo pelo qual fixam o carbono atmosférico, produzem a maior parte do oxigênio da atmosfera e convertem a luz solar natural em energia química armazenada em várias formas químicas (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos) (Lembi & Waaland 1988; Formighieri *et al.* 2012).

Além de atuar na depuração de efluentes, o cultivo de microalgas se apresenta como uma atividade promissora para fornecer matéria prima para a indústria farmacêutica, alimentícia, ou na geração de combustíveis renováveis (Patil & Anil 2005; Derner *et al.* 2006). Por exemplo, as microalgas podem apresentar elevados níveis de lipídios e ácidos graxos de importância comercial como o eicosapentaenoico, docosahexaenoico (Vazhappilly & Chen 1998; Harun *et al.* 2010), linoleico (Campos *et al.* 2010), além de outras substâncias com um alto valor comercial, tais como, enzimas, biomassa, polímeros, pigmentos (Araujo *et al.* 2011), vitamina E (Carballo-Cárdenas *et al.* 2003), riboflavina (Brown & Farmer 1994), xantofilas (Lee *et al.* 2006).

Atualmente tem sido proposto o uso de microalgas como matéria-prima do biodiesel, biocombustível renovável e ambientalmente sustentável (Sivakumar *et al.* 2012). Além de todas as vantagens citadas acima, o crescimento de microalgas leva a absorção de gás carbônico da atmosfera (Hsueh *et al.* 2009), podendo atuar como sequestradoras de carbono, auxiliando na diminuição dos gases de efeito estufa, que levam ao aquecimento do planeta (Borges *et al.* 2007; Chiu *et al.* 2011). E ainda, esses microrganismos são responsáveis por 60% da produção primária da terra (Ryther, 1969).

Na aquicultura espécies de diferentes táxons já são utilizadas para a produção de biomassa como, por exemplo, a diatomácea *Conticribra weissflogii* (Martins *et al.* 2014). As algas azuis, ou cianobactérias, como as dos gêneros *Arthrospira* e *Spirulina*, há muito tempo são produzidas e utilizadas para vários fins, por apresentar altos valores de proteína e vitaminas (Vonshak *et al.* 2014).

A espécie *Duaniella salina* que é cultivada para obtenção de pigmentos (Melis *et al.*, 1999) faz parte do grupo das algas verdes ou clorófitas, espécies que possuem clorofila a e b. Também destaca-se o gênero *Chlorella*, representado por espécies de água doce e salgada com grande potencial como fonte de lipídios (Surendhiran *et al.* 2014) e o gênero *Nannochloropsis*, representando espécies com alta porcentagem de lipídios e ácidos graxos de cadeia longa (Sukenik *et al.* 1993).

Nannochloropsis oculata (Droop) D.J.Hibberd, 1981 é uma alga unicelular marinha pertencente à classe Eustigmatophyceae. É uma das microalgas mais cultivadas devido a sua rusticidade e rapidez de crescimento (Spolaore *et al.* 2006), alto teor energético e de lipídios (Renauld *et al.* 1991; Takagi *et al.* 2006). Devido à isso esta microalga está sendo utilizada como fonte de lipídios para a geração de biocombustíveis (Converti *et*

al. 2009), bem como ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da série ω -3, com cadeias longas. Devido às grandes concentrações de PUFA produzidos por *N. oculata* esta microalga vem sendo utilizada na aquicultura como alimento para rotíferos (Lourenço 2006) ou na alimentação direta de larvas de camarão (Belettini *et al.* 2011) e na criação de fármacos para a prevenção e tratamento de uma ampla gama de doenças e distúrbios humanos, além de serem reconhecidos como compostos alimentares importantes (Zitelli *et al.* 1999).

Entretanto, a viabilidade do cultivo em larga escala de microalgas passa pela solução de problemas tecnológicos e a diminuição dos custos de produção. (Norsker *et al.* 2011) Para que isso ocorra, estudos estão sendo realizados com o intuito de definir os melhores métodos de cultivo e geração de metabólitos, a colheita da microalga e também as buscas por meios de cultivo mais baratos (D'Oca *et al.* 2011; Köning *et al.* 2014; Sales & Abreu, 2014). Além disso, culturas em larga escala levará certamente a uma demanda muito grande de fertilizantes químicos, podendo ocorrer uma competição com o uso de fertilizantes para a produção agrícola. Dessa forma, a utilização de meios alternativos de cultivo, como uso de efluentes poderá contribuir para o barateamento dos custos de produção destes microrganismos.

Nesta dissertação testou-se o uso de efluentes de sistemas de aquicultura com bioflocos (*Biofloc Technology – BFT*) como meio de cultivo massivo da microalga marinha *Nannochloropsis oculata*, em comparação com outros meios de cultivo utilizados em escala de bancada (Meio f/2; Guilard, 1975) e em cultivos massivos de maior volume (Meio Fertilizante; adaptado de Yamashita e Magalhães, 1984).

Objetivo geral

Determinar se a possibilidade de cultivar *Nannochloropsis oculata* no efluente do cultivo de camarão em sistema de bioflocos.

Objetivos específicos

- Determinar o crescimento da microalga em diferentes concentrações de efluente;
- Comparar o crescimento da microalga no efluente com os meios de cultivo f/2 e com um meio com fertilizantes químicos;
- Quantificar a porcentagem de lipídios e de ácidos graxos na biomassa formada;

-Medir a eficiência da microalga na remoção dos compostos nitrogenados e de fosfato.

Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, GS, LJM MATOS, LRB GONÇALVES, FAN FERNANDES & WRL FARIAS, 2011. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, 102: 5248–5250.
- BELETTINI, F, RB DERNER & LA VINATEA, 2011. Utilização das microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Nannochloropsis oculata* no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistemas de berçários, sem renovação de água. *Atlântica*, 33: 101-114.
- BHATTACHARYA, D & L MEDLIN. 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant physiol*, 116: 9–15.
- BORGES, L, BM, FARIA, C, ODEBRECHT & PC, ABREU. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. *Atlântica*, 29, 35–46.
- BROWN, MR & CL, FARMER. 1994. Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 6 : 61-65.
- CAI, T, SY, PARK, R, RACHARAKS & Y, LI. 2013. Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production. *Applied Energy*, 108: 486–492.
- CAMPOS, VB, E, BARBARINO & SO, LOURENÇO. 2010. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*, 40: 339-347.
- CARBALLO-CÁRDENAS, EC, PM TUAN, M JANSSEN & RH WIJFFELS. 2003. Vitamin E (a-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20:139-147.
- CHIU, SY, CY KAO, TT HUANG, CJ LIN, SC ONG, CD CHEN, JS CHANG & CS LIN. 2011. Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella* sp. cultures. *Bioresource Technology*, 102: 9135–9142.

- CONVERTI , A, AA CASAZZA, EY ORTIZ, P PEREGO & MD BORGHI. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical engineering and processing*, 48: 1146–1151.
- CRAB, R, T DEFOIRDT, P BOSSIER & W VERSTRAETE. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356–357: 351–356.
- DERNER, RB, S OHSE, M VILLELA, SM CARVALHO & R FETT. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência rural*, 36(6): 1959-1967.
- D'OCA, MGM, CV VIÊGAS, JS LEMÕES, EK MIYASAKI, JA MORÓN-VILLARREYES, EG PRIMEL & PA, ABREU. 2011. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass bioenergy*, 35: 1533–1538.
- FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture, Food and Agriculture Organization Of The United Nations ed. Roma.
- FORMIGHIERI, C, F FRANCK & R BASSI. 2012. Regulation of the pigment optical density of an algal cell: filling the gap between photosynthetic productivity in the laboratory and in mass culture *J. Biotechnol*, 162: 115–123.
- GHALY, AE, M KAMAL & NS MAHMOUD. 2005. Phytoremediation of aquaculture wastewater for water recycling and production of fish feed. *Environment International*, 31: 1–13.
- GUILLARD, RR L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M. H. ed. *Culture of marine invertebrate animals*. New York., pp. 26 -60.
- HARUN, R, MS GARETH, GA FORDE & MK, DANQUAH. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 1037–1047.
- HSUEH, HT, WJ LI, HH CHEN & H CHU. 2009. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of photochemistry and photobiology b: biology*, 95: 33–39.

- JIANG, L, S LUO, X FAN, Z YANG & R GUO. 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied Energy*, 88: 3336-3341.
- KÖNIG, RB, R SALES, F ROSELET & PA, ABREU. 2014. Harvesting of the marine microalga *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyceae) by cationic polymeric flocculants. *Biomass and bioenergy*, 68, 1-6.
- KRUMMENAUER, D, S PEIXOTO, RO CAVALLI, LH POERSCH & W WASIELESKY JUNIOR. 2011. Superintensive Culture of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities. *Journal of the world aquaculture society*, 42: 726-733.
- KRUMMENAUER, D, CA SEIFERT JUNIOR, LH POERSCH, GK FOES, GR LARA & W WASIELESKY JUNIOR. 2012. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: Análise da reutilização da água. *Atlântica*, 34(2): 103-111.
- LEE, MY, BS MIN, CS, CHANG & E JIN. 2006. Isolation and Characterization of a Xanthophyll Aberrant Mutant. *Marine biotechnolog*, 8 : 238–245.
- LEMBI, CA & JR WAALAND. *Algae and Human Affairs*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
- LOURENÇO, S. *O cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações*. Brasil: RiMa, 2006.
- MARTINS, TG, C ODEBRECHT, LV JENSEN, MGM D’OCA & W WASIELESKY JR. 2014. The contribution of diatoms to bioflocs lipid content and the performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT culture system. *Aquaculture Research*, 1–12.
- MELIS, A, J NEIDHARDT & JR BENEMANN. 1999. *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Phycology*, 10: 515–525.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. 2012. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010*. Brasília, 2012.

- NAYLOR, RL, RJ GOLDBURG, JH PRIMAVERA, N KAUTSKY, MCM BEVERIDGE, J CLAY, C FOLKE, J LUBCHENCOI, H MOONEY & M TROELL. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405: 1017-1024.
- NORSKER, NH, MJ BARBOSA, MH VERMUË & RH WIJFFELS. 2011. Microalgal production-a close look at economics. *Biotechnol Adv.*, 29: 24–27.
- OLSEN, RL, J TOPPE & I KARUNASAGAR. 2014. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, 36: 144-151.
- PATIL, JS & AC ANIL. 2005. Biofilm diatom community structure: influence of temporal and substratum variability. *Biofouling*, 21: 189–206.
- PITTMAN, JK, AP DEAN & O OSUNDEKO. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102: 17–25.
- RENAUD, SM, DL PARRYLA, LV THINH, C KUO, A PADOVANLA & N SAMMY. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 3:43-53.
- RYTHER, JH & WM DUNSTAN. 1991. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 171, 1008-1013.
- SALES, R & PA ABREU. 2014. Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Appl Biochem Biotechnol.*, 1-8.
- SCHNEIDER, O, V SERETI, EH EDING & JAJ VERRETH. 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering.*, 32: 379–401.
- SILVA, KR, W WASIELESKY JUNIOR & PC ABREU. 2013. Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society.*, 44: 30–41.

- SIVAKUMAR, G, J XU, RW THOMPSON, Y YANG, PR SMITH & PJ, WEATHERS. 2012. Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. *Bioresource Technology*, 107: 1–9.
- SPOLAORE, P, CJ CASSAN, E DURAN & A ISAMBERT. 2006. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 1049–1056.
- SUKENIK, A, O ZMORA & YCARMELI. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*, 117: 313–326.
- SURENDRHIRAN, D, M VIJAY & AR SIRAJUNNISA. 2014. Biodiesel production from marine microalga *Chlorella salina* using whole cell yeast immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Environmental Chemical Engineering.*, 2: 1294–1300.
- TAKAGI, M, KARSENIO & T YOSHIDA. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of bioscience and bioengineering.*, 101: 223–226.
- TROELL, M, RL NAYLORC, M METIAN, M BEVERIDGED, PH TYEDMERSE, C FOLKEA, KJ ARROWF, S BARRETTG, AS CRÉPINA, PR EHRLICHH, A GRENA, N KAUTSKYI, SA LEVINJ, K NYBORGK, H ÖSTERBLOM, S POLASKYL, M SCHEFFERM, BH WALKERN, T XEPAPADEASO & A ZEEUWP. 2014. Does aquaculture add resilience to the global food system? *PNAS*, 111 (37): 13257–13263.
- VAZHAPPILLY, R & F CHEN. 1998. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *JAACS*, 75: 393–397.
- VONSHAK, A, S LAORAWAT, B BUNNAG & M TANTICHAROEN. 2014. The effect of light availability on the photosynthetic activity and productivity of outdoor cultures of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). *J Appl Phycol.*, 26: 1309–1315.
- YAMASHITA, C & PMDS, MAGALHÃES. 1984. Método simples para o cultivo da alga *Tetraselmis chuii*. *EMPARN-Boletim de Pesquisa.*, 7: 1–20.

ZITTELLI, CG, F LAVISTA, A BATIANINI, L RODOLFI, M VINCENZINI & MR
TREDICI. 1999. Production of eicosapentaenoic acid (EPA) by
Nannochloropsis sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. J Biotechnol.,
70: 299–312.

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

CAPÍTULO I
CULTIVO DE *Nannochloropsis oculata* EM EFLUENTES DA PRODUÇÃO DE
CAMARÃO COM BIOFLOCOS (SISTEMA BFT)

Camila Besold, Mariana Holanda Paes Barbosa, Bruno Pinto Cruz, Stela Raupp, Paulo César Abreu

O presente capítulo está apresentado de acordo com as normas para submissão da revista Aquaculture.

Resumo

A produção massiva de microalgas está limitada por vários aspectos técnicos, dentre estes meios de cultivo mais baratos para a sua produção. Efluentes domésticos, industriais e de aquicultura vêm sendo usados para a produção de microalgas devido à grande concentração de nutrientes. O objetivo desse estudo foi utilizar o efluente da produção de camarão em meio com bioflocos (sistema BFT - *Biofloc Technology System*) como um meio de cultivo para a microalga marinha *Nannochloropsis oculata*, determinando-se seu crescimento, produção de lipídios, ácidos graxos e capacidade de absorção de nutrientes inorgânicos dissolvidos. Em um primeiro experimento laboratorial verificou-se o crescimento da microalga em diferentes concentrações do efluente (25, 50, 75 e 100%). No segundo experimento, realizado em estufa agrícola, cultivou-se a microalga no efluente puro e comparou-se com os meios de cultivo com fertilizantes e meio f/2, onde além do crescimento celular também se mediu a concentração de lipídios e o perfil de ácidos graxos da microalga nos diferentes tratamentos. Os dois experimentos foram realizados em triplicata e os dados submetidos à análise para verificação de diferenças estatísticas pelo teste ANOVA (one way) e posterior teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados do primeiro experimento demonstraram que os maiores crescimentos celulares ocorreram nos tratamentos com 75% ($219 \pm 34,4$ céls. $\times 10^6$ mL⁻¹) e 100% ($192,4 \pm 27,7$ céls. $\times 10^6$ mL⁻¹). Estes foram significativamente maiores do que os demais tratamentos, mas semelhantes entre si. No segundo experimento, a máxima abundância celular foi registrada no tratamento com meio BFT (T-BFT: $25,57 \pm 0,17$ céls. $\times 10^6$ mL⁻¹), porém não houve diferença estatística dos demais. A maior porcentagem de lipídios foi registrada no tratamento com bioflocos ($34,76 \pm 5,8\%$), porém não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Diferenças no perfil dos ácidos graxos foram detectadas entre os tratamentos BFT e fertilizante, possivelmente devido às diferentes fontes de nitrogênio nos meios. *N. oculata* removeu $27,95$ mg L⁻¹ de nitrato e $4,78$ mg L⁻¹ do fosfato em doze dias de experimento. A redução do nitrogênio amoniacal e nitrito ao final do cultivo parece ter resultado da ação de bactérias nitrificantes presentes no tratamento BFT. Conclui-se que o efluente BFT puro pode ser usado como um meio de cultivo para *N. oculata*, produzindo as mesmas quantidades de abundância celular, lipídios e composição de ácidos graxos que os outros meios testados. Além disso, o crescimento desta microalga neste meio

removeu grande quantidade de nutrientes que causam eutrofização do corpo d'água receptor e do próprio sistema de aquicultura com bioflocos, demonstrando a grande capacidade de depuração de efluentes de *N. oculata*.

Abstract

The massive production of microalgae is limited by many technical features, among these the necessity to use cheaper culture medium for their production has had great attention. Effluents of aquaculture have high concentrations of dissolved inorganic nutrients and they represent a cheaper alternative to conventional culture medium normally used. The objective of this study was to test effluent with bioflocs (BFT- *Biofloc Technology System*) as a culture media to the marine microalga *Nannochloropsis oculata*, evaluating its growth, production of lipids, profile fatty acids and the uptake of dissolved inorganic nutrients. In a first laboratorial experiment we verified the microalga cell growth in different concentrations of the effluent (25, 50, 75 e 100%). In the second experiment, which was done at a greenhouse, we cultivated the microalga in pure effluent and compared its growth and other characteristics with cells raised in f/2 and fertilizers medium. The two experiments were done in triplicate and the data submitted to the ANOVA (one way) and Tukey ($p < 0,05$) post hoc analyses. The results the first experiment demonstrated that the highest increase in cell numbers occurred in treatments with 75% ($219 \pm 34,4$ cells. $\times 10^6$ mL⁻¹) and 100% ($192,4 \pm 27,7$ cells. $\times 10^6$ mL⁻¹) effluents. They were significantly higher than other treatments, but similar to each other. Differences in the fatty acid profile were detected between BFT treatments and fertilizer media, possibly because of the different sources of nitrogen in the culture medium. *N. oculata* removed 27, 75 mg L⁻¹ of the nitrate and 4,78 mg L⁻¹ of the phosphate in twelve days of experiment. The reduction of ammonia nitrogen at the end of cultivation seems to be the result of the action of nitrifying bacteria present in the BFT treatment. We conclude that pure BFT effluent can be used as a culture medium for massive cultivation production of *N. oculata*, generating the same biomasses and amounts of lipid and fatty acid composition than the other tested culture medium. In addition, the growth this microalga in this media removed large amount of nutrients that

cause eutrophication in the receiving water body and BFT system, showing the great depuration capacity of *N. oculata*.

1. Introdução

A aquicultura é uma das atividades com maior potencial para incrementar a produção de alimentos no mundo e também para obtenção de muitos bioprodutos (FAO, 2014). Entretanto, esta atividade econômica ainda necessita de vários ajustes em toda sua cadeia produtiva. Hoje cerca de metade do peixe consumido é proveniente da aquicultura e há perspectivas de que até 2050 os frutos do mar sejam predominantemente obtidos através da aquicultura, incluindo não somente peixes e invertebrados, mas também algas (Diana *et al.*, 2013). Para que isso aconteça pesquisadores no mundo todo estão voltando seus esforços para que esta atividade produtiva seja economicamente rentável e ambientalmente amigável (Chopin *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2001; Havice e Iles, 2015).

Dentre as alternativas para uma produção de organismos aquáticos está o sistema de Tecnologia de Bioflocos (*Biofloc Technology System* – BFT) (Avnimelech, 1999; Wasielesky *et al.*, 2006). No sistema BFT, algumas espécies de peixes e camarões podem ser produzidos de forma superintensiva, pois através da manipulação da relação carbono/nitrogênio é possível gerar biomassa microbiana que mantém a qualidade da água em elevados níveis e também serve como fonte suplementar de alimento para os animais, tornando o sistema mais produtivo e seguro (Crab *et al.*, 2012).

Uma das grandes vantagens deste sistema é a reduzida renovação de água, devido à ação de microrganismos que mantém a qualidade da água. Porém, mesmo oferecendo menos riscos ambientais que o sistema de produção convencional, a renovação de água, e conseqüentemente a geração de efluentes, se faz necessária quando os níveis de nutrientes, especialmente o fosfato acumulam, ou quando ocorre a despesca dos organismos produzidos (Krummenauer *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013).

Geralmente efluentes de aquicultura, mas também domésticos e industriais, contêm elevadas concentrações de nutrientes que podem causar eutrofização nos corpos d'água receptores (Ghaly *et al.*, 2005), havendo a necessidade de depurá-los. Uma das alternativas para realizar a depuração dos efluentes é a utilização das águas residuais

como meio cultivo para organismos como micro- e macroalgas (Kwon, *et al.*, 2013). O cultivo de microalgas em águas residuais tem recebido grande destaque, não só pela capacidade de limpeza do efluente, mas também pela possibilidade de gerar biomassa e bioprodutos de grande valor comercial (Sivakumar *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2013).

Microalgas são fontes naturais de vitaminas (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003), sais minerais, pigmentos, açúcares (Lee *et al.*, 2006; Arad and Ontman, 2010; Araujo *et al.*, 2011), proteínas e lipídios (Campos *et al.*, 2010). Desta forma, podem ser usadas como matéria prima na indústria alimentícia, cosmética e na produção de biocombustíveis (Wijffels *et al.*, 2013). Outras substâncias formadas pelas microalgas possuem ação antioxidante, antibacteriana e anticancerígena e, por isso, têm grande potencial médico, podendo ser utilizadas na indústria de fármacos (Simmons *et al.*, 2005; Wijffels, 2007; Amaro *et al.*, 2013).

Dentre as várias espécies de microalgas cultivadas destaca-se a microalga marinha *Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J.Hibberd 1981 (Eustigmatophyceae). Essa microalga, além de ser resistente e apresentar elevadas taxas de crescimento, produz grandes quantidades de lipídios (Chiu *et al.*, 2009), sendo que grande parte desses lipídios são compostos de ácidos graxos de cadeia longa com muitas duplas ligações, como o ácido graxo EPA (C20:5). Desta forma, esta microalga é utilizada como fonte de alimento na aquicultura (Araújo *et al.*, 2011; Chauton *et al.*, 2015;), mas também é uma das espécies indicadas para produção de biodiesel.

Pesquisas estão sendo realizadas a fim de vencer as limitações do cultivo de microalgas em escala comercial, como o desenvolvimento de sistemas mais baratos de produção em larga escala (Spolaore *et al.*, 2006; Roselet *et al.*, 2013), otimizar a colheita da biomassa produzida (Sales and Abreu, 2014; Koning *et al.*, 2014), controle de contaminações (Rodolfi *et al.*, 2009) e métodos adequados de extração dos compostos (D'Oca *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). Além destes, é de grande importância os estudos que visam à diminuição dos custos de cultivo com o uso de fontes alternativas de nutrientes para os meios de cultivo como, por exemplo, cultivo em águas residuais. Sendo que os nutrientes para os meios de cultivo representam 30 a 50% dos custos de produção de microalgas (Norsker *et al.*, 2011).

Desta forma, o uso de efluentes da aquicultura para o cultivo de microalgas além de propiciar a depuração do efluente permitirá a formação de biomassa e bioprodutos de alto valor comercial, que poderão agregar valor a todo sistema de produção aquícola.

Considerando estes fatos, objetivou-se nesse estudo determinar a viabilidade do uso do efluente de produção de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) em sistema BFT, como um meio de cultivo para o crescimento da microalga marinha *Nannochloropsis oculata*.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção do inóculo e efluente

A cepa de *Nannochloropsis oculata* utilizada neste estudo foi obtida da coleção do Laboratório de Fitoplâncton e Microrganismos marinhos do IO-FURG, registrada como NANNOCUL-1. Já o efluente utilizado foi proveniente do cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos do Laboratório de Carcinicultura da EMA/FURG.

2.2 Delineamento experimental

Experimento 1:

Em um primeiro momento foram definidas as melhores condições de cultivo com a realização de um experimento em pequena escala (volume de 500 mL) desenvolvido no Laboratório de Produção de Microalgas do Centro de Biotecnologia e Diagnóstico de Organismos Aquáticos da FURG (CBD-FURG) em junho de 2013. Neste experimento foi testada a capacidade da microalga *Nannochloropsis oculata* de crescer em meios com diferentes concentrações de efluente com bioflocos (25, 50, 75 e 100% de efluente), sendo que o efluente foi utilizado de forma integral, sem nenhum tipo de tratamento prévio, em comparação com um controle, meio f/2 (Guillard, 1975). A microalga *N. oculata* foi inoculada na densidade celular de 19.45 ± 2.29 céls. $\times 10^6$ mL⁻¹, acompanhando-se, a partir daí, seu crescimento nos diferentes tratamentos.

Todos os tratamentos tiveram três réplicas e foram mantidos nas seguintes condições: temperatura 24 °C; pH inicial de 7,3±0,63; salinidade inicial de 26±0,7; iluminação de 3000 lux e fotoperíodo de 12/12h claro/escuro. O experimento teve duração de 14 dias.

Experimento 2:

Depois de obtidos os resultados no experimento 1 foi executado um novo experimento, dessa vez em recipientes com 5 L de meio. O experimento teve duração de 12 dias, desenvolvido em abril de 2014 em uma estufa agrícola (Roselet *et al.*, 2013), sob condições ambientais.

Esse experimento comparou o crescimento da microalga no efluente integral e também nos meios de cultivo f/2 (Guillard, 1975) e meio com fertilizantes agrícolas, adaptado de Yamashita e Magalhães (1984) com adição de vitaminas (Tabela 1). Dessa forma este experimento teve três tratamentos: 1) T-BFT (Efluente integral com bioflocos), 2) T-f/2 (meio f/2) e 3) T-Fert (meio com fertilizantes). O inóculo utilizado foi na densidade de 8.41 ± 2.15 céls. $\times 10^6$ mL⁻¹ e todos os tratamentos foram realizados em triplicata com cultivos em garrafas transparentes de politereftalato de etileno (PET) com 5L de volume útil. Na tabela 2 estão apresentados os valores iniciais medios de nitrogenados e fosfato do efluente utilizado nesse experimento.

Tabela 1: Composição do meio Fertilizante Yamashita e Magalhães (1984), modificado*.

Sulfato de amônio	150 mg L ⁻¹
Uréia	7,5 mg L ⁻¹
Superfosfato triplo	25 mg L ⁻¹
Tiamina*	0,017 mg L ⁻¹
Cianocobalamina*	0,034 mg L ⁻¹
Biotina*	0,00017 mg L ⁻¹

Tabela 2: Concentrações dos nutrientes no efluente utilizado no experimento. Valores expressos em média \pm SD.

TAN(mg L ⁻¹)	7,37 \pm 1,06
NO ₂ (mg L ⁻¹)	0,16 \pm 0,03
NO ₃ (mg L ⁻¹)	114,58 \pm 6,70
PO ₄ (mg L ⁻¹)	10,31 \pm 0,27

Para os dois experimentos os meios de cultivos foram mantidos com aeração constante por borbulhamento, também foram realizados os seguintes procedimentos: 1) ajuste da salinidade com adição de água doce esterilizada a fim de se manter a mesma salinidade em todos os tratamentos.

As diluições de efluentes no Experimento 1 foram feitas com água do mar filtrada (CUNO® – 5 μ m de poro), esterilizada por adição de 0,2 mL L⁻¹ de hipoclorito de sódio (5%) por 24 horas e posteriormente neutralizada pela adição 2 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

2.3 Parâmetros abióticos

Temperatura, salinidade e pH foram medidos a cada dois dias com o auxílio de um medidor multiparâmetros Yellow Springs, modelo YSI 556 (Yellow Springs Instrument, OH, USA). Ao mesmo tempo, amostras dos cultivos (50 mL) foram filtradas em filtro de fibra de vidro (GFA/50) e o filtrado utilizado para determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal total (TAN: NH₃ + NH₄⁺) (UNESCO, 1983), nitrito (N-NO₂), nitrato (N-NO₃⁻) e ortofosfato (P-PO₄⁻³), seguindo a metodologia de Strickland and Parsons (1972).

2.4 Parâmetros bióticos

A abundância de células foi determinada através da coleta de amostras (5 mL) dos cultivos a cada dois dias. As amostras foram fixadas em lugol neutro (1%) e as células contadas em câmara de Neubauer e em microscópio ótico (o total expresso em número de células mL⁻¹) (Wood *et al.*, 2005).

2.5 Flocculação da biomassa e quantificação de lipídios e dos ácidos graxos na biomassa

Ao final do experimento 2, no dia 12, os cultivos foram transferidos para recipientes plásticos retangulares (volume útil: 12 L), diluídos em água doce até a salinidade 10, o pH foi ajustado para 6,5 usando-se, quando necessário, uma solução de HCl. Por meio de agitação mecânica formou-se um vórtex onde foi adicionado um flocculante a base de tanino (Tanfloc[®]) na concentração de 20ppm. A agitação foi mantida por mais 15 minutos para a formação dos flocos de microalgas. Os cultivos foram mantidos por 24 horas sem movimentação para a suspensão da biomassa, em seguida o sobrenadante foi retirado e a biomassa retida do fundo foi centrifugada (Centrífuga Fanem Excelsa4 Mod: 280R) com rotação de 3.400 rpm, a -1°C por 30 minutos. O concentrado foi lavado com solução de formiato de amônio (35g L⁻¹) (Lee e Zhu, 1997) e centrifugado por mais 10 minutos. A biomassa úmida foi seca em estufa a 60°C até peso constante.

Para o fim de quantificação de lipídios no tratamento com bioflocos, nos dias 0 e 12 a biomassa de *N. oculata* foi determinada por meio de filtração sob vácuo, de 20 mL do cultivo em filtros de fibra de vidro (GFA/50, 5 µm), que foram posteriormente lavados com uma solução de formiato de amônio (35g L⁻¹) para a retirada do sal e secos a 60°C até peso constante. O peso seco total foi calculado pela diferença do peso final e inicial de cada filtro. A biomassa total do último dia foi decrescida da biomassa inicial, para que o peso do floco não fosse contabilizado na análise de lipídios.

Os lipídios foram extraídos de amostras (em triplicata) utilizando o método de Bligh and Dyer (1959), modificado por D'Oca *et al.*, (2011). A biomassa seca esmagada (0,5 g) foi misturada com 1,5 mL de clorofórmio: metanol (2:1). Essa solução foi colocada em um ultrassom (Unico UltraCleaner modelo AE40 1400 kHz; 120 W) por 20 min. Em seguida submetida a centrifugação durante 2 min a 50 Hz. A extração de lipídios foi repetida três vezes para cada amostra. A fase líquida foi transferida para frascos já pesados. Em seguida, o solvente foi evaporado sob vácuo num evaporador rotativo e secas em estufa de ar quente para a completa evaporação do solvente, e os frascos foram novamente pesados. A fração lipídica total calculada pelas diferenças de pesos finais e iniciais do frasco.

As amostras de lipídio (triplica) foram esterificadas, de acordo com Metcalfe e Schimitz (1961). O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa (GC) com detecção por espectrometria de massa (MS). As análises foram realizadas com um sistema cromatográfico GCMS-QP2010Plus (Shimadzu) equipado com um split/ splitless injetor acoplado com um detector de massa. O funcionamento das temperaturas do detector foram os seguintes: Interface, 280 °C, e a fonte de 230 °C. Detecção usando uma varredura completa de m/z 30 para m/z 500 com um tempo de varredura de 0,20 s. O modo de ionização utilizada foi elétron impacto a 70 eV. As condições de funcionamento do cromatógrafo foram as seguintes: injetor, 250 °C; coluna, 80 °C (temperatura inicial, 0 min), seguido por um gradiente de 10 °C /min a 180 °C e, em seguida, 7 °C /min até uma temperatura final de 330 °C; Fluxo de gás, de 1,3 cm³ / min; pressão, 88,5 kPa; velocidade linear média, de 42 cm s; e volume de injeção de 1 cm³ com uma razão de divisão de 1: 100. Foi usado um Crossbond 5% de dimetil polisiloxano difenilo 95% coluna (30m x 0,25 milímetros x 0,25 µm Restek). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com padrões conhecidos e foram quantificadas pelo método de áreas normalizadas.

2.6 Análise estatística

Os dados das variáveis foram submetidos análise de variância ANOVA (one way) e teste post-hoc de Tukey (p<0,05) de acordo com Zar (2010).

3. Resultados

3.1 Experimento 1

Na figura 1 estão representados graficamente os resultados de crescimento de *N. oculata* no experimento 1 realizado em escala laboratorial. Os valores iniciais de abundância celular foram T0:18,29±2,17, T25: 18,46±3,32, T50: 22,03±5,95, T75:21,71±5,59, T100: 16,8±7,08 céls. x 10⁶ mL⁻¹. A máxima abundância celular foi registrada no tratamento com 75% do efluente no décimo dia de cultivo (T75: 219 ± 34,4 céls. x 10⁶ mL⁻¹). Diferenças estatísticas foram detectadas a partir do oitavo dia de

cultivo quando o efluente puro T100 ($163,8 \pm 34,4 \times \text{céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) foi superior ($p < 0,05$) ao tratamento controle TO ($76,9 \pm 13,6 \text{ céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$), essa diferença foi mais acentuada na fase de crescimento celular exponencial, aos 10 dias quando o T100 ($192,4 \pm 27,7 \text{ céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) foi maior que o T0 ($77,7 \pm 1,1 \text{ céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) e T25 ($102,2 \pm 7,2 \text{ céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$), porém estatisticamente semelhante aos tratamentos T50 ($172,2 \pm 9,4 \text{ céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) e T75 ($219 \pm 34,4 \text{ céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$). Também no dia 12 o tratamento T75 ($185,3 \pm 11,4 \text{ céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) foi diferente estatisticamente dos demais (T0: $124,13 \pm 27,28$; T25: $98,87 \pm 10,36$; T50: $82,38 \pm 34,86$ e T100: $110 \pm 18,17 \text{ céls.} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$).

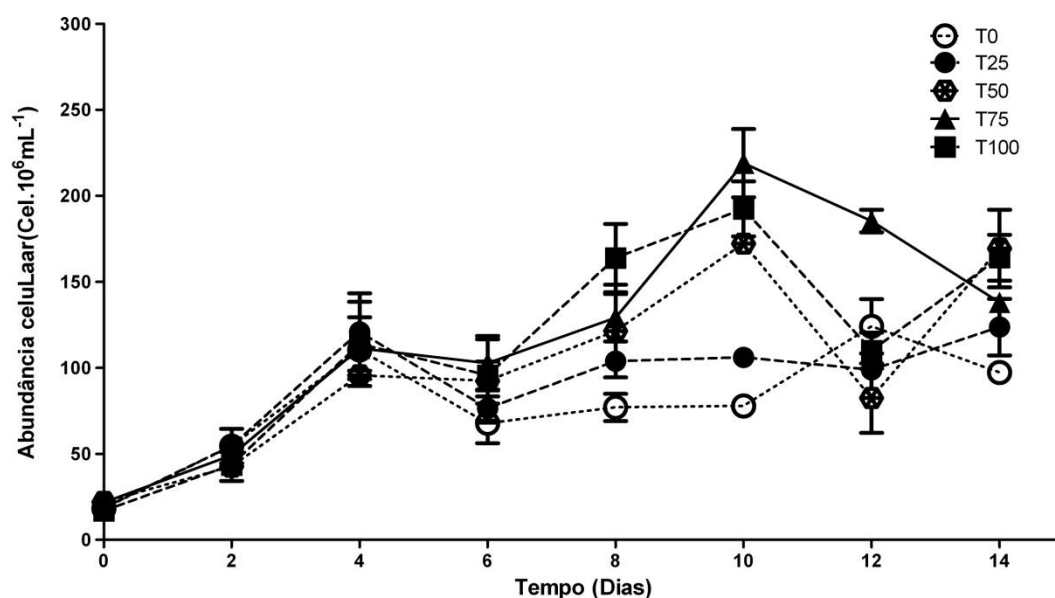


Figura 1: Abundância celular (céls. $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) ao longo do tempo (dias) no experimento I. Valores representados em média \pm desvio padrão. (T0: Tratamento com meio f/2, T25: Tratamento com 25% do efluente, T50: Tratamento com 50% do efluente, T75: Tratamento com 75% do efluente e T100: tratamento com 100% do efluente).

3.2 Experimento 2

Na tabela 3 são apresentados os valores mínimos, máximos e médios para os parâmetros físicos e químicos dos cultivos em cada tratamento.

Tabela 3- Valores mínimos, máximos e médios da temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), salinidade e pH por diferentes tratamentos. Os valores médios estão apresentados \pm SD. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Parâmetros abióticos		T-BFT	T-f/2	T-Fert
Temperatura	Mínimo	23,24	23,10	23,17
	Máximo	28,93	28,78	28,90

	Medio	25,89±2,02	25,58± 2,04	25,74±2,08
pH	Mínimo	6,85	7,18	6,94
	Máximo	9,10	8,91	8,84
	Medio	7,63± 0,41 ^b	7,93±0,47 ^{ab}	8,11 ±0,57 ^a
Salinidade	Mínimo	22,14	24,15	24,15
	Máximo	23,88	25,42	26,26
	Medio	23,21±0,46 ^b	24,93 ±0,35 ^b	25,17±0,35 ^a

A temperatura da água variou de 28,82±0,47°C no tratamento com bioflocos (no segundo dia) a 23.17±0,08°C, valor registrado no tratamento com meio f/2 no décimo dia experimental.

Os valores iniciais de salinidade foram no T-BFT: 22,43±0,26, no T-f/2: 24.28±0,12 e T-Fert: 24.58±0,08 e no último dia experimental: T-BFT: 23.87±0,39, T-f/2: 25.33±0,12 e T-Fert: 25.67±0,59.

Os valores de pH foram variáveis durante o experimento, sendo que o máximo valor foi registrado no meio fertilizante no segundo dia (T-Fert 8,59±0,15) e o menor valor foi registrado no meio com bioflocos no oitavo dia (T-BFT: 6.85±0,62).

O nitrogênio amoniacal total (TAN) nos meios de cultivos (Fig. 2) teve valores iniciais significativamente diferentes (T-BFT: 7,37±1,06; T-f/2: 0,09±0,05 e T-Fert: 48,4±4,79 N-TAN mg L⁻¹). Essas mesmas diferenças se mantiveram ao longo de todo o experimento, com exceção do quarto e do sexto dia quando os tratamentos T-BFT e T-f/2 foram semelhantes. No tratamento com meio fertilizante foram registrados os maiores valores de TAN chegando a 49,5±0 N-TAN mg L⁻¹ no último dia experimental. Já no tratamento f/2 o menor valor foi registrado no segundo dia do experimento (0,05±0,01 N-TAN mg L⁻¹).

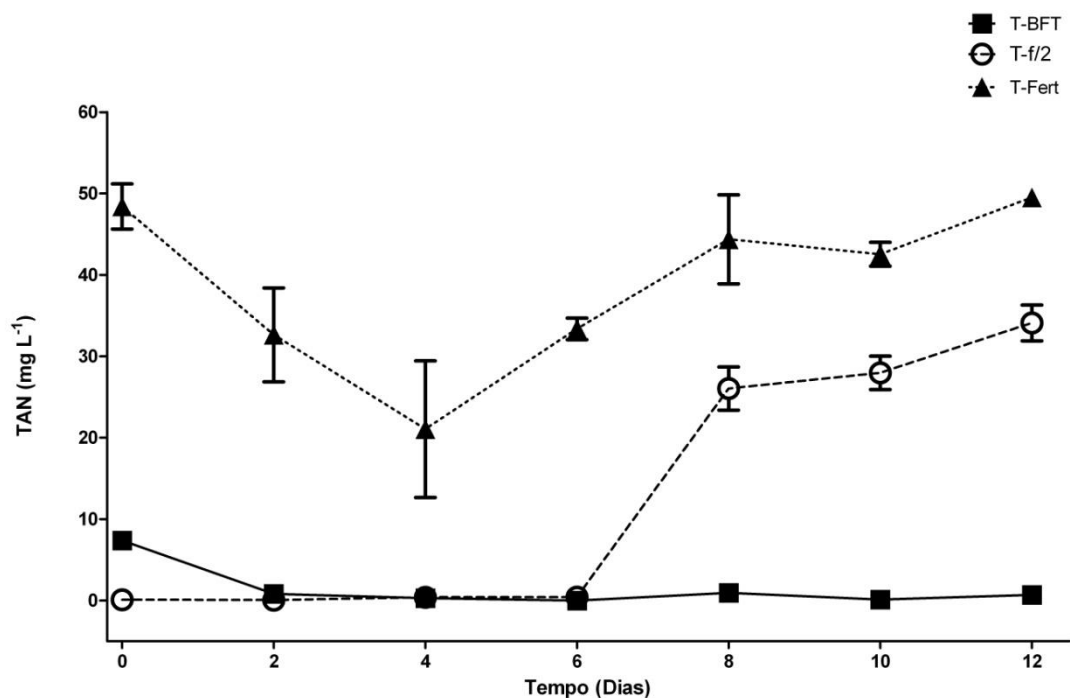


Figura 2: Concentração de nitrogênio amoniacal total (N-TAN mg L⁻¹) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média \pm erro padrão (n=3). T-BFT: tratamento com meio biofloco; T-f/2: tratamento com meio f/2; T-Fert: tratamento com meio fertilizante.

Para o nitrogênio na forma de nitrito (N-NO₂), os valores variaram entre $1,76 \pm 0,29$ mg L⁻¹ no tratamento com T-BFT e chegaram a não ser detectados nos tratamentos T-f/2 e T-Fert (Fig. 3). Diferenças estatísticas foram encontradas e mostram que o T-BFT foi diferente dos demais tratamentos no tempo zero, no segundo, oitavo e último dia do experimento, sendo que diferenças entre T-f/2 e T-Fert não foram encontradas nesses dias. No quarto e décimo dia experimental não foi encontrado diferenças significativas entre os tratamentos e no sexto dia todos os tratamentos diferiram entre si.

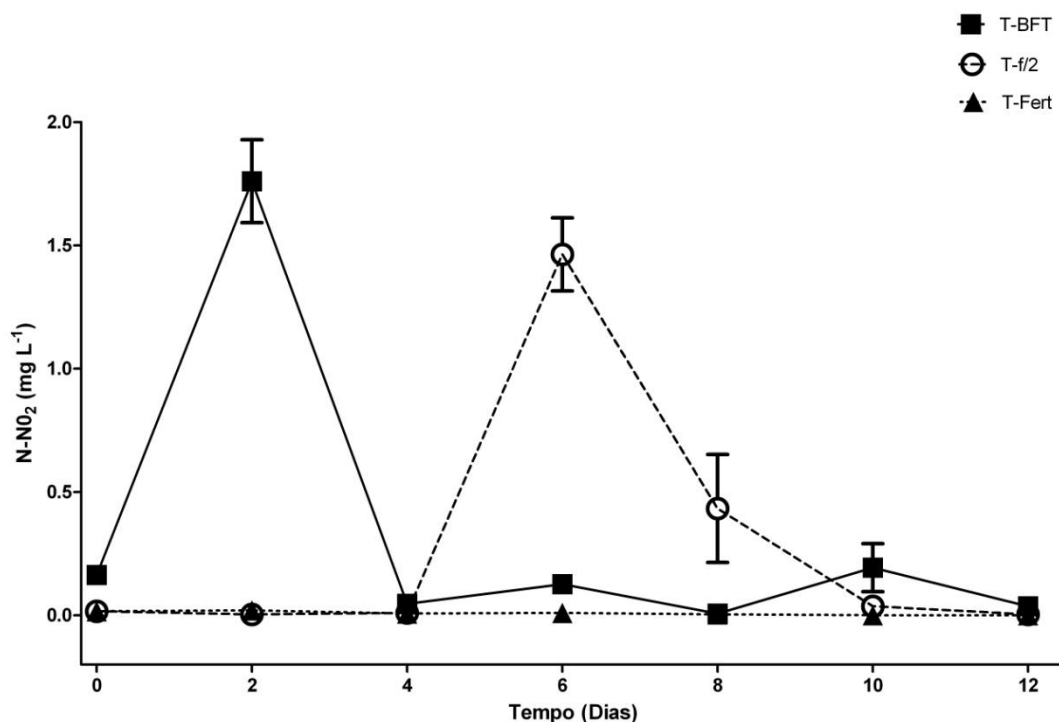


Figura 3: Concentração de nitrito ($\text{N-NO}_2 \text{ mg L}^{-1}$) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média \pm erro padrão ($n=3$). T-BFT: tratamento com meio biofloco; T-f/2: tratamento com meio f/2; T-Fert: tratamento com meio fertilizante.

Os valores para nitrogênio na forma de nitrato (N-NO_3^-) foram estatisticamente diferentes entre todos os tratamentos e em todos os tempos amostrais, com exceção do último dia, quando não foram encontradas diferenças entre os tratamentos T-f/2 e T-Fert (Fig. 4). O meio com bioflocos (T-BFT) apresentou os maiores valores, que oscilaram entre $114,58 \pm 6,6 \text{ mg L}^{-1}$ no tempo zero à $62,1 \pm 37,5 \text{ mg L}^{-1}$, sendo que no final do experimento a média foi $86,63 \pm 10, \text{ mg L}^{-1}$. No meio f/2 os valores variaram de $35,57 \pm 5,15$ à $7,44 \pm 3,45 \text{ mg L}^{-1}$. E no meio com fertilizante foram registrados os valores mais baixos, variando de 0 à $3,11 \pm 5,39 \text{ mg L}^{-1}$. Houve remoção de $27,95 \text{ mg L}^{-1}$ (24,59% dos valores iniciais) dos valores iniciais.

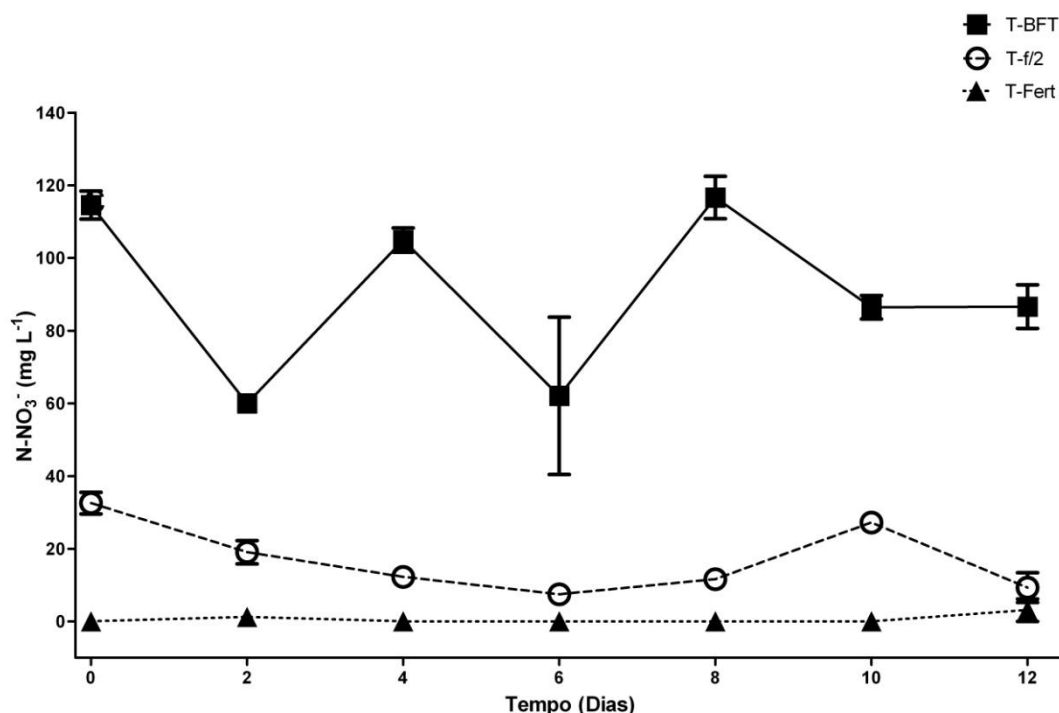


Figura 4: Concentração de nitrato (N-NO_3^- mg L^{-1}) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média \pm erro padrão ($n=3$). T-BFT: tratamento com meio biofloco; T-f/2: tratamento com meio f/2; T-Fert: tratamento com meio fertilizante.

Os níveis de ortofosfato (P-PO_4^{3-}) decresceram nos tratamentos T-BFT e T-Fert ao longo do tempo, como mostra a Figura 5, enquanto que as concentrações em T-Fert apresentaram variação, mas não uma queda contínua. No tratamento T-BFT o valor inicial passou de $10,31 \pm 0,27$ para $5,53 \pm 1,36$ mg L^{-1} no último dia (remoção de 46,36% dos valores iniciais). Os valores também diminuíram no meio com f/2 de $2,24 \pm 0,12$ mg L^{-1} para não detectado. E no meio fertilizante passaram de $4,35 \pm 0,25$ para $3,0 \pm 0,26$ mg L^{-1} . Diferenças estatísticas nos dias zero, dois, quatro e doze mostraram que todos os tratamentos diferiram entre si. Nos dias seis e dez somente os tratamentos T-BFT e T-f/2 diferiram entre si e o T-Fert não foi diferente dos demais e no oitavo dia experimental não foram detectadas diferenças entre os tratamentos.

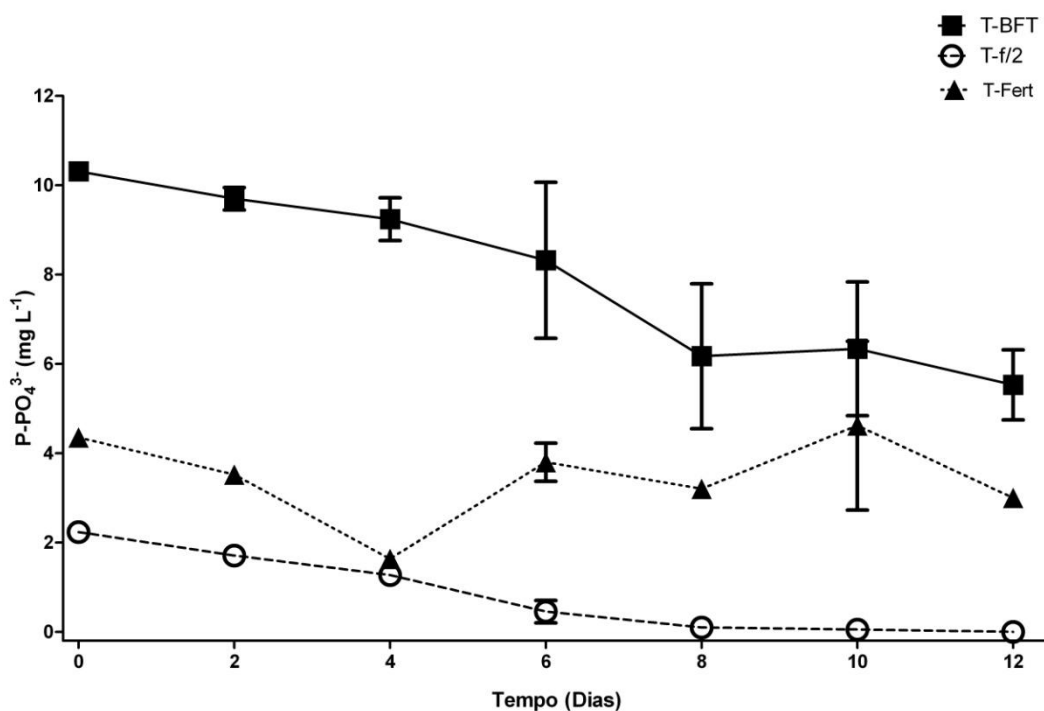


Figura 5: Concentração de ortofosfato ($P-PO_4^{3-}$ mg L⁻¹) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média \pm erro padrão (n=3). T-BFT: tratamento com meio biofloco; T-f/2: tratamento com meio f/2; T-Fert: tratamento com meio fertilizante.

Na Figura 6 pode-se observar a representação gráfica da abundância celular. Os valores iniciais para número de células são T-BFT: $8,17 \pm 0,3$ T-f/2: $10,67 \pm 5,74$ e T-Fert: $6,39 \pm 0,22$ céls. $\times 10^6$ mL⁻¹. Diferenças estatísticas somente foram detectadas no sexto dia de cultivo, sendo que o tratamento T-f/2 ($23,43 \pm 1,26$ céls. $\times 10^6$ mL⁻¹) foi diferente dos demais tratamentos, T-Fert ($18,79 \pm 2,08$ céls. $\times 10^6$ mL⁻¹) e T-BFT ($15,55 \pm 0,42$ céls. $\times 10^6$ mL⁻¹). A máxima abundância celular foi registrada no tratamento com meio BFT (T-BFT: $25,57 \pm 0,17$ céls. $\times 10^6$ mL⁻¹) no oitavo dia de cultivo.

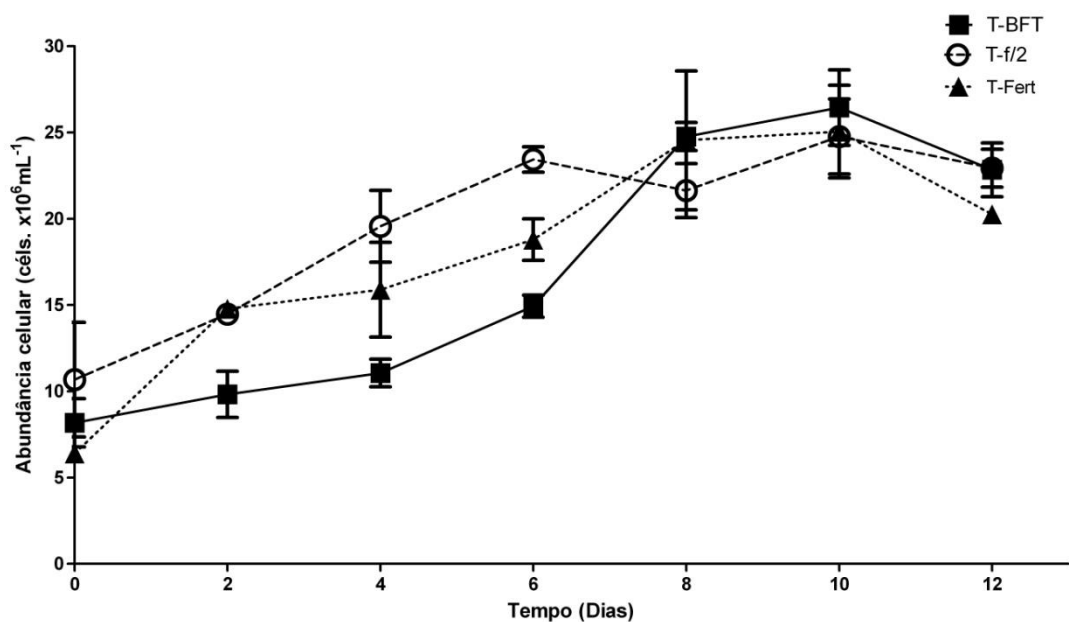


Figura 6: Abundância celular (cél. x 10⁶ mL⁻¹) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média ± erro padrão (n=3). T-BFT: tratamento com meio biofloco; T-f/2: tratamento com meio f/2; T-Fert: tratamento com meio fertilizante.

A fração de lipídios na biomassa (Fig. 7) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, que apresentaram os seguintes valores: T-BFT: 34,76±5,8; T-f/2: 27,1±4,36 e T-Fert: 24,26±5,25 % da biomassa.

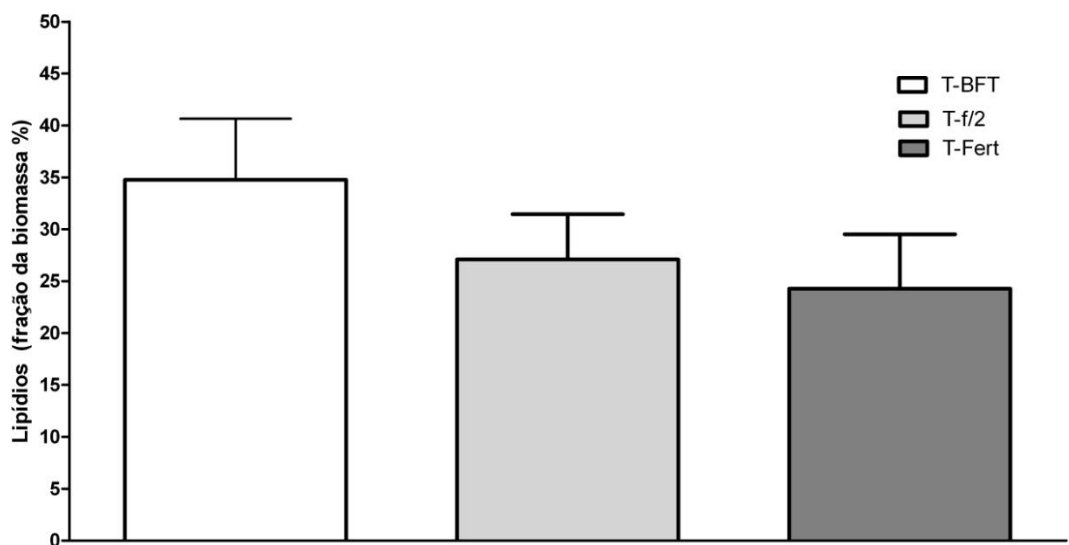


Figura 7: Porcentagem de lipídios totais/peso seco no último dia do experimento. Valores representados em média ± erro padrão (n=3). T-BFT: tratamento com meio biofloco; T-f/2: tratamento com meio f/2; T-Fert: tratamento com meio fertilizante.

Na tabela 4 é apresentado o perfil dos ácidos graxos/total de lipídios encontrados nas microalgas de cada tratamento. Diferenças estatísticas foram observadas nos ácidos graxos C18, entre os tratamentos T-BFT e T-Fert, nos ácidos graxos C18:2, C18:1c, C18:1t. Para o ácido graxo C18:0 diferenças estatísticas foram constatadas entre o meio T-BFT e o meio T-f/2.

Tabela 4- Perfil de ácidos graxos de *Nannochloropsis oculata* (porcentagem do total de lipídios) por diferentes tratamentos. Valores apresentados em média \pm SD. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Ácidos graxos	T-BFT	T-f/2	T-Fert
C12:0	–	0,213 \pm 0,37	–
C14:0	5,53 \pm 1,12	8,5 \pm 3,48	6,28 \pm 0,35
C15:0	0,74 \pm 0,18	0,93 \pm 0,26	0,82 \pm 0,18
C16:1	30 \pm 3,98	27,95 \pm 1	31,47 \pm 0,35
C16:0	29,34 \pm 15,7	25,15 \pm 9,12	26,73 \pm 0,75
C17:0	0,32 \pm 0,55	0,20 \pm 0,34	–
C18:2	3,06 \pm 0,71 ^a	2,31 \pm 0,23 ^{ab}	1,83 \pm 0,18 ^b
C18:1c	5,66 \pm 0,93 ^a	4,54 \pm 0,41 ^{ab}	3,32 \pm 0,40 ^b
C18:1t	1,71 \pm 0,43 ^b	2,22 \pm 0,27 ^b	0,77 \pm 0,14 ^a
C18:0	0,97 \pm 0,34 ^a	0,45 \pm 0,07 ^b	–
C20:5	19,38 \pm 6,81	24,13 \pm 5,48	25,71 \pm 1,21
C20:4	3,29 \pm 0,90	3,41 \pm 0,46	3,07 \pm 0,21

4. Discussão

Nannochloropsis oculata é uma microalga marinha de fácil cultivo, utilizada na aquicultura como alimento de peixes e camarões devido à grande quantidade de lipídios compostos por ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (Renauld *et al.*, 1991; Borges *et al.*, 2011). Além disso, cultivar essa microalga pode ser vantajoso do ponto de vista ambiental, pois consegue fixar grandes quantidades de dióxido de carbono atmosférico por meio da fotossíntese (Borges *et al.*, 2007). Por outro lado, o que pode realmente tornar viável seu cultivo em larga escala é a produção de lipídios para a geração de biodiesel (Zittelli *et al.*, 1999), ou para outros fins mais lucrativos, como a comercialização do ácido graxo EPA (C20:5), bioproduto de alto valor comercial (Araújo *et al.*, 2011).

Atualmente a produção de biomassa da maioria das microalgas se dá por cultivo em meios laboratoriais, como o f/2, que também é bastante utilizado na aquicultura para produção da microalga para alimentação direta ou indireta dos animais, além de meios com fertilizantes químicos, como o meio fertilizante usado para cultivos em maior escala (Roselet *et al.*, 2013). Mesmo com o uso de fertilizantes, os meios de cultivo ainda representam grande parte dos custos, podendo atingir 50% dos custos totais de produção (Nosker *et al.*, 2011). Por isso, pesquisas estão sendo realizadas em busca de meios de cultivo mais baratos. Efluentes domésticos, industriais e da aquicultura contêm altas concentrações de nutrientes e, por isso, podem ser utilizados para o cultivo de microalgas (Logan and Ronald, 2011).

Vários trabalhos já foram realizados cultivando microalgas em efluentes (Pittman *et al.*, 2010). Wang *et al.*, (2010) constataram que *Chlorella* sp. cresce em águas residuais provenientes da agricultura e absorve grande parte dos compostos nitrogenados e fósforo do meio. Capacidade similar de absorção de nutrientes foi constatada para *Scenedesmus* sp., que produziu 31% de lipídios em relação a biomassa seca, quando cultivada em águas residuais municipais (Martinez *et al.*, 2000). Da mesma forma, *Dunaliella tertiolecta* cultivada em efluente industrial apresentou produtividade de 28 mg L⁻¹ dia⁻¹ de biomassa (Chinnasamy *et al.*, 2010).

O potencial de crescimento de microalgas em águas residuais também foi testado para *Nannochloropsis oculata* por Arriada e Abreu (2014), que constataram a viabilidade do crescimento da microalga na água de produção, que é um efluente tóxico da indústria de petróleo, produzindo valores de biomassa semelhantes aos obtidos em sistemas de cultivos tradicionais. Já Magnotti *et al.* (no prelo) também estudaram o crescimento de *N. oculata* em efluentes com bioflocos, constatando que esta microalga apresentou elevado crescimento e capacidade de absorver elevadas cargas de nutrientes presentes no meio.

Uma das características da produção de peixes e camarões em sistema BFT é a baixa, ou nenhuma renovação de água. Isto é possível devido à ação de bactérias nitrificantes que eliminam o excesso de amônia e nitrito. Entretanto, outros nutrientes como o fosfato e nitrogênio orgânico dissolvidos se acumulam no sistema (Silva *et al.*, 2013; Furtado *et al.*, 2014). A água no sistema BFT pode chegar ao fim do ciclo de produção de camarões, ou peixes com elevados níveis de fosfato, uma vez que este

elemento, diferente dos compostos nitrogenados, não é eliminado para a atmosfera e, por isso, tende a se acumular em sistemas fechados e sem trocas de água (Luo *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013).

Mesmo não havendo trocas de água frequentes, grande parte destes nutrientes pode ser eliminada para o meio ambiente durante a despesca dos tanques. Desta forma, corpos de água receptores destes efluentes, ou até mesmo o próprio sistema BFT, poderão apresentar crescimento de organismos indesejados (Alonso-Rodriguez and Paez-Osuna, 2003; Schrader, *et al.*, 2011). Dentre estes destacam-se as microalgas *Oocysts sp e Planctonema sp.* (Martins *et al.*, 2014), além de cianobactérias, que têm baixo valor nutricional para os animais produzidos, e podem prejudicá-los através do entupimento de brânquias e produção de toxinas (Karjalainen *et al.*, 2005; Apeldoorn *et al.*, 2006).

Quando o fosfato disponível no sistema está em grandes concentrações, cianobactérias são beneficiadas (Smith, 2003). Isso ocorre devido a capacidade desses microrganismos fixarem o nitrogênio atmosférico, utilizando-se do fosfato em excesso para produzir grandes biomassas (Kahru *et al.*, 2000; Berman-Frank *et al.*, 2003). Além de causar problemas como entupimento de brânquias e produção de toxinas, a morte e decomposição de grandes biomassas produzidas pelo efluente podem gerar condições de anoxia, levando à morte de peixes e organismos bentônicos (Pihl, *et al.*, 1991).

Os dados apresentados neste estudo demonstraram que é possível cultivar a microalga marinha *Nannochloropsis oculata* no efluente proveniente da produção de camarão *Litopenaeus vannamei* produzido no sistema BFT e ainda realizar a depuração destas águas, com diminuição considerável dos nutrientes inorgânicos dissolvidos, especialmente o fosfato.

No experimento 1 foi verificado que este efluente pode ser usado de forma integral, sem a necessidade de diluições, uma vez que *Nannochloropsis oculata* atingiu os maiores valores de abundância celular nos tratamentos com 75% e 100 % do efluente, não havendo diferença estatística entre estes. Da mesma forma, Halfhide *et al.* (2014) não observaram efeitos negativos ao cultivar as microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus* no efluente da aquicultura sem tratamento prévio, em comparação com cultivos no efluente filtrado e clorado.

Além disso, no experimento 2 verificou-se que o cultivo em efluente também produziu valores de lipídios e perfil de ácidos graxos similares em todos os tratamentos, com a produção de quantidades significativas do ácido graxo EPA (C20:5) no meio com bioflocos, em comparação com os outros meios. Isto indica que o efluente do sistema BFT forneceu os nutrientes necessários para o crescimento e realização das funções vitais da microalga, levando a um acúmulo de lipídios, similar aos outros meios testados.

Com relação à produção de lipídios, os resultados do presente trabalho são similares aos valores medidos em outros estudos com *Nannochloropsis oculata*, que variaram de 22 a 30% (Gong and Jiang, 2011) do peso seco, porém Chiu *et al.*, (2008) afirmaram que a porcentagem pode variar de 30,8 a 50,4% do peso seco em *Nannochloropsis oculata*, dependendo da fase de crescimento, mas foram maiores que os encontrados por Borges *et al.* (2011), que obteve 4,3% do peso seco para *N. oculata* cultivada em meio f/2. Resultados obtidos por Chinnasamy *et al.* (2010) foram de 12,2% do peso seco quando cultivaram espécies de microalgas consorciadas em efluente industrial. A produção de lipídios com certeza é um dos pontos que pode tornar o cultivo economicamente viável, pois a fração lipídica pode ser utilizada para a geração de biodiesel e a produção do ácido graxo EPA pode ser comercializada.

O perfil de ácidos graxos produzidos no meio BFT foi, em grande parte semelhante ao encontrado por Borges *et al.* (2011) cultivando *N. oculata* em meio f/2. Também quantidades semelhantes do ácido graxo C20:5 que os apresentados por Roncarati *et al.* (2004). Entretanto, neste experimento houve diferenças na composição dos ácidos graxos na família C:18. O meio com BFT apresentou maiores valores dos ácidos graxos C18:1c, C18:1t e C18:2 do que no meio fertilizante e similar aos encontrados no meio f/2. Essas diferenças podem estar associados à presença de ureia no meio fertilizante, pois Fidalgo *et al.* (1998) encontrou valores menores desses ácidos graxos cultivando *Isochrysis galbana* com ureia como fonte de nitrogênio em relação aos meios com nitrito e nitrato.

Uma das vantagens observadas no uso do meio com BFT é que a amônia restante ao final do cultivo apresentou valores próximos a zero. Isso se deu muito mais provavelmente devido à ação de bactérias nitrificantes, que rapidamente fazem a conversão de amônia em nitrito e este em nitrato, do que absorção pela microalga (Figs.

2 e 3). Padrão similar de desaparecimento de amônia não foi observado nos outros meios testados, onde no final do cultivo ainda existia uma grande quantidade de nitrogênio amoniacal. No meio f/2 ocorreu um aumento na concentração de amônia no oitavo dia de cultivo. Esse fato pode ser explicado pela morte das células e decomposição destas pelas bactérias, processo que faz com que haja liberação de nitrogênio amoniacal para o meio.

Por outro lado, diferente da amônia, os resultados indicam que a maior parte do desaparecimento de nitrato no meio BFT e demais tratamentos pode ter sido pela absorção deste nutriente pelas microalgas, uma vez que, a concentração inicial já é bem elevada. No segundo experimento a concentração de nitrato diminuiu de valores iniciais de $114,58 \pm 6,70$ para $86,63 \pm 10,41$ mg L⁻¹ ao final do experimento, paralelo ao aumento da biomassa de microalgas, evidenciando a utilização dessa fonte de nitrogênio para o crescimento de *N. oculata*. Desta forma, pode-se concluir que, enquanto as bactérias nitrificantes são responsáveis pela diminuição de amônia e nitrito, *N. oculata* é eficiente na remoção de nitrato do efluente.

A remoção dos nitrogenados, além de todas as vantagens citadas, beneficia diretamente os animais do sistema BFT (Furtado *et al.*, 2011), isto porque peixes e camarões toleram baixas concentrações principalmente de amônia e nitrito, compostos altamente tóxicos (Atowood *et al.*, 2001; Hanna *et al.*, 2013).

A diminuição na concentração de fosfato no tratamento com efluente BFT também parece ter resultado da absorção deste nutriente por *N. oculata*, uma vez que existe uma relação inversa entre a concentração de fosfato e a abundância de microalgas no meio, o que corrobora a capacidade desta microalga de remover esse nutriente que se acumula nos sistemas aquáticos e que é a principal causa da eutrofização dos corpos d'água que recebem os efluentes (Ryther and Dunstan, 1991).

Outros estudos com outras espécies de microalgas também mostraram a eficiência destes microrganismos para remover fosfato. Por exemplo, em um experimento com *Chlorella vulgaris*, Aslan and Kapdan (2006) demonstraram que a microalga removeu 6 mg L⁻¹ de fosfato em dez dias de cultivo em águas residuais, valores próximos ao encontrado nesse trabalho. Também Chinnasamy *et al.* (2010) cultivando microalgas em águas residuais industriais obtiveram taxas de remoção 96,6% de 4,8 mg L⁻¹ do fosfato presente.

O potencial biorremediador para outras espécies do gênero *Nannochloropsis* foi também constatado para *Nannochloropsis salina*, que em dez dias de cultivo absorveu 99% de 91,4 mg L⁻¹ do fósforo de um efluente (Cai *et al.*, 2013). De maneira similar, Magnotti *et al.* (no prelo) demonstraram que houve 100% de remoção dos 2,53 mg L⁻¹ de fosfato, durante o cultivo *N. oculata* no efluente da produção de camarão em sistema BFT. Em nosso estudo, houve uma absorção de grande quantidade de fosfato do meio, mas ao final do cultivo ainda havia grandes quantidades deste nutriente na água de cultivo, indicando que as microalgas não foram capazes de absorver todo o nutriente disponível.

É possível que o aumento da abundância celular tenha sido retardado pela diminuição na disponibilidade de luz causado pelo próprio aumento da biomassa da microalga, limitando a absorção de nutrientes. Sabe-se que em cultivos com altas densidades as células já não tem mais acesso à luz devido ao sombreamento ocasionado por elas mesmas (Aslan and Kapdan, 2006).

Considerando a disponibilidade de nutrientes, especialmente fosfato, sugerimos que, depois da colheita da microalga, um novo cultivo seja feito, visto que, com a retirada da biomassa, a luz novamente ficará disponível. Desta forma, enquanto os nutrientes estiverem disponíveis, na proporção requerida para *N. oculata*, ciclos sucessivos de produção poderão ser realizados, como proposto por Rocha *et al.* (2015) que sugere até três cultivos sucessivos na mesma água de cultivo sem afetar o ganho da produção de biomassa para *Scenedesmus quadricauda*.

Podemos concluir com este trabalho que o efluente com bioflocos é um meio viável para a produção de biomassa e lipídios de *Nannochloropsis oculata* tanto quanto os meios f/2 e com fertilizante, além de diminuir as concentrações dos compostos nitrogenados e fosfato do meio e produzir lipídios e ácidos graxos de importância comercial. Desta forma, a produção de microalgas em efluentes de sistemas BFT poderá contribuir significativamente para a sustentabilidade da aquicultura diminuindo a geração de efluentes, mas também minimizando os custos de produção pela geração de renda para a aquicultura com a comercialização da biomassa e bioprodutos produzidos pela microalga ao crescer nesse efluente.

5. Referências Bibliográficas

- Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna, F. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*. 219, 317-336.
- Amaro, H. M., Barros, R., Guedes, A. C., Sousa-Pinto, I., Malcata, F. X. 2013. Microalgal compounds modulate carcinogenesis in the gastrointestinal tract. *Trends in biotechnology*. 31, 92-98.
- Apeldoorn, M. E. V., Egmond, H. P. V., Speijers, G. J. A., Bakker, G. J. I. 2006. Toxins of cyanobacteria. 51, 7 – 60.
- Arad, S. M., Levy-Ontman, O. 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Current opinion in biotechnology*. 21, 358–364.
- Arriada, A. A., Abreu, P. C. 2014. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. *Brazilian journal of petroleum and gas*. 8, 119-125.
- Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., Farias, W. R. L. 2011. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresour. technol.* 102, 5248–5250.
- Aslan, S., Kapdan, I. K. K. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological engineering*. 28, 64–70.
- Atwood, H. L., Fontenot, Q. C., Tomasso, J. R., Isely, J. J. 2001. Toxicity of nitrite to Nile tilapia: Effect of fish size and environmental chloride. *North american journal of aquaculture*. 63, 49–51.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem. Physiol.* 37, 911, 7.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Falkowski, P. 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in microbiology*. 154, 157–164.
- Borges, L., Faria, B. M., Odebrecht, C., & Abreu, P. C. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. *Atlântica*, 29, 35–46.

- Borges, L., Morón-Villarreyes, J. A., D'Oca, M. G. M., Abreu, P. A. 2011. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and bioenergy*. 35, 44-49-4454.
- Cai, T., Park, S. Y., Racharaks, R., Li, Y. 2013. Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production. *Applied energy*. 108, 486–492.
- Campos, V. B., Barbarino, E., Lourenço, S. O. 2010. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*. 40, 339-347.
- Carballo-Cárdenas, E. C., Tuan, P. M., Janssen, M., Wijffels, R. H. 2003. Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular engineering*, 20, 139-147.
- Chauton, M. S., Reitana, K. I., Norsker, N. H., Tveteras, R., Kleivdal, H. T. 2015. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. *Aquaculture*. 436, 95–103.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., Das, K. C. 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource technology*. 101, 3097–3105.
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Tsai, M. T., Ong, S. C., Chen, C. H., Lin, C. S. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource technology*. 100, 833–838.
- Cho, S., Lee, N., Park, S., Yu, J., Luong, T. T., Oh, Y. K., Lee, T. 2013. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. *Bioresour. technol.* 131, 515–520.
- Chopin, T., Buschmann, A. H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G. P., Zertuche-Gonzalez, J. A., Yarish, C., Neefus, C. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key towards sustainability. *J. Phycol.* 37, 975–986.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356–357, 351–356.
- Diana, J. S., Egna, H. S., Chopin, T., Peterson, M. S., Cao, L., Pomeroy, R., Verdegem, M., Slack, W. T., Bondad-Reantso, M. G., Cabello, F. 2013. Responsible aquaculture in 2050: Valuing local conditions and human innovations will be key to success. *Bioscience*, 63, 255–262.

- D'Oca, M. G. M., Viêgas, C. V., Lemões, J. S., Miyasaki, E. K., Morón-Villarreyes, J.A., Primel, E.G., Abreu, P. A. 2011. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. Biomass bioenergy. 35, 1533–1538.
- FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture, Food and Agriculture Organization Of The United Nations ed. Roma.
- Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture. 166, 105–116.
- Furtado, P. S., Poersch, L. H., Wasielesky Jr., W. 2011. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. Aquaculture. 321, 130–135.
- Furtado, P. S., Campos, B. R., Serra, F. P., Klosterhoff, M., Romano, L. A., Wasielesky Jr., W. 2014. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). Aquacult. int.
- Ghaly, A. E., Kamal, M., Mahmoud, N. S. 2005. Phytoremediation of aquaculture wastewater for water recycling and production of fish feed. Environment International 31, 1–13.
- Gong, Y., Jiang, M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: From strains to biodiesel. 2011. Biotechnol lett. 33, 1269–1284.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M. H. ed. Culture of marine invertebrate animals. New York., pp. 26 -60.
- Halfhide, T., Akerstrom, A., Lekang, O. I., Gislerod, H. R., J. Ergas, S. J. 2014. Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. Algal research. 6, 152–159.
- Hanna, M.I., El-Maedawy, S.A., Kenawy, A.M., Girgis, S.M. 2013. Sublethal effects of acute ammonia exposure on *Oreochromis niloticus*. Global veterinária. 11, 592-603.
- Havice, E., Iles, A. 2015. Shaping the aquaculture sustainability assemblage: Revealing the rule-making behind the rules. Geoforum. 58, 27–37.
- Kahru, M., Leppänen, J. M., Rud, O., Savchuk, O. P. 2000. Cyanobacteria blooms in the Gulf of Finland triggered by saltwater inflow into the Baltic Sea. Mar Ecol Prog Ser 207, 13–18.

- Karjalainen, M., Reinikainen, M., Spoof, L., Meriluoto, J. A. O., Sivonen, K., Viitasalo, M. 2005. Trophic Transfer of cyanobacterial toxins from zooplankton to planktivores: Consequences for pike larvae and mysid shrimps. *Wiley periodicals, inc.* 354-362.
- Know, H. K., Oh, S. J., Yang, H. S. 2013. Growth and uptake kinetics of nitrate and phosphate by benthic microalgae for phytoremediation of eutrophic coastal sediments. *Bioresource technology.* 129, 387–395.
- König, R. B., Sales, R., Roselet, F., Abreu, P. A. 2014. Harvesting of the marine microalga *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyceae) by cationic polymeric flocculants. *Biomass and bioenergy.* 68, 1-6.
- Krummenauer, D.; Peixoto, S.; Cavalli, R. O.; Poersch, L. H.; Wasielesky Junior, W. 2011. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a Biofloc Technology System in Southern Brazil at different stocking densities. *Journal of the world aquaculture society.* 42, 726-733.
- Lee, M. Y., Min, B. S., Chang, C. S., Jin, E. 2006. Isolation and characterization of a xanthophyll aberrant mutant. *Marine biotechnology.* 8, 238–245.
- Luo, G. Z., Avnimelech, Y., Pan, Y. F., Tan, H. X. 2013. Inorganic nitrogen dynamics in sequencing batch reactors using bioflocs technology to treat aquaculture sludge. *Aquacult. eng.* 52, 73–79.
- Magnotti, C., Lopes, R., Derner, R., Vinatea, L. 2015. Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production. *Aquaculture research.* 1–9.
- Martínez, M. E., Sánchez, S., Jiménez, J. M., Yous, F. E., Muñoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology.* 73, 263-272.
- Martins, T.G., Odebrecht, C., Jensen, L.V., D’oca, M. G. M., Wasielesky Jr, W. 2014. The contribution of diatoms to bioflocs lipid content and the performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT culture system. *Aquaculture Research.* 1–12.
- Metcalf, L. Schmitz, A. 1961. The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 33, 363.
- Norsker, N. H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., Wijffels, R. H. 2011. Microalgal production-a close look at economics. *Biotechnol Adv.* 29, 24–27.
- Pihl, L., Baden, S. P., Diaz, R. J. 1991. Effects of periodic hypoxia on distribution of demersal fish and crustaceans. *Marine biology.* 108, 349-360.

- Pittman, J. K., Dean, A. P., Osundeko, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*. 102, 17–25.
- Renaud, S. M., Parry, D. L., Luong-Van, T., Kuo, C., Padovan, A., Sammy, N., 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 3, 43–53.
- Rocha, G. S., Pinto, F. H. V., Melão, M. G. G., Lombardi, A. T. 2015. Microalgae for oil: strain selection, induction of growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? *J. Appl. Phycol.* 27, 171–178.
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R. 2009. Lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*. 102, 100-112.
- Roncarati, A., Meluzzi, A., Acciarri, S., Tallarico, N., Melotti, P. 2004. Fatty acid composition of different microalgae strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (droop) hibberd, *Nannochloris atomus* butcher and *Isochrysis* sp.) according to the culture phase and the carbon dioxide concentration. *J. World Aquacult. Soc.* 35, 401–411.
- Roselet, F., Maica, P., Tatiana Martins, T., Abreu, P. A. 2013. Comparison of open-air and semi-enclosed cultivation system for massive microalgae production in sub-tropical and temperate latitudes. *Biomass and bioenergy*. 59, 418-424.
- Roth, E., Rosenthal, H. & Burbridge, P. 2000. A discussion of the use of the sustainability index: ecological footprint for aquaculture production. *Aquatic Living resources*. 13, 461-469.
- Ryther, J. H., Dunstan, W. M. 1991. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*. 171, 1008-1013.
- Sales, R., Abreu, P. A. 2014. Use of Natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Appl Biochem Biotechnol.* 1-8.
- Schrader, K. K., Greenb, B.W., Perschbacher, P. W. 2011. Development of phytoplankton communities and common off-flavors in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquacultural Engineering*. 45, 118– 126.
- Silva, K. R., Wasielesky Jr., W., Abreu, P. C. 2013. Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 44, 30–41.

- Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., Gerwick, W. H. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther.* 4, 333-342.
- Sivakumar, G., Xu, J., Thompson, R. W., Yang, Y., Randol-Smith, P., Weathers, P.J. 2012. Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. *Bioresource Technology.* 107, 1–9.
- Smith, V. H. 2003. Eutrophication of Freshwater and Coastal Marine Ecosystems: A Global Problem. *Eutrophication Review Articles.*
- Spolaore, P., Cassan, C. J., Duran, E., Isambert, A. 2006. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* 81, 1049–1056.
- Strickland, J. D. H., Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. ed. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada. Canada.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., Ruan, R. R. 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology.* 101, 2623–2628.
- Wasielsky Jr. W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. 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.
- Wijffels, R. H. 2007. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology.* 26, 26-31.
- Wijffels, R. H., Kruse, O., Hellingwerf, K. J. 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology.* 24, 405–413.
- Wood, A. M., Everroad, R. C., Wingard, L. M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen, R. A. (Ed.), *Algalculturing Techniques.* Elsevier Academic Press, pp. 269–285.
- Yamashita, C., Magalhães, P. M. D. S. 1984. Método simples para o cultivo da alga *Tetraselmis chuii*. *EMPARN-Boletim de Pesquisa:*7, 1-20.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis.* Upper Saddle River: Prentice Hall. New Jersey.
- Zittelli, C. G., Lavista, F., Badianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M., Tredici, M. R. 1999. Production of eicosapentaenoic acid (EPA) by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J Biotechnol.* 70, 299–312.

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS DE FUTURAS PESQUISAS

Cada vez é necessário utilizar tecnologias e outros avanços da ciência para que os sistemas de produção de organismos aquáticos causem menos impactos ambientais, com menor uso dos recursos naturais, bem como redução de efluentes que causam desequilíbrio do corpo de água receptor, alterando a qualidade da água e afetando toda a biota destes ecossistemas. Desta forma, um dos grandes desafios enfrentados pela humanidade é o desenvolvimento econômico com sustentabilidade, mas para isto é preciso de novos métodos de produção que visem à produção de alimentos e atividade industrial de forma intensiva, mas com redução da geração de efluentes e das emissões de gases do efeito estufa.

A organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) considera que a aquicultura é o único tipo de produção de alimento que cresce mais que a população mundial, sendo a grande esperança para a segurança alimentar do planeta. A produção de organismos aquáticos pode fornecer proteína de alta qualidade e muitos outros bioprodutos fornecidos por peixes, moluscos, algas e outras plantas aquáticas. E o Brasil é um dos países com grande potencial para atender essa demanda, pois conta com uma vasta área de costa e boa parte das reservas mundiais de água doce.

A produção mundial de algas cultivadas mais do que dobrou de 2000-2012, chegando a 23,8 milhões de toneladas (peso úmido), sendo que somente a China produz cerca de 13,5 milhões de toneladas e outros países asiáticos respondem pela maioria da produção. Mas essa produção é em quase sua totalidade de macroalgas, enquanto que a produção de microalgas é ainda muito pequena, sendo que muitas vezes estas nem são relatadas para fins estatísticos. Dentre os cultivos de microalgas destacam-se a produção de *Spirulina* spp. e *Arthrospira* spp. para consumo humano e de animais, *Haematococcus pluvialis* para uso farmacêutico, alimento para animais ou microalgas para a produção de biocombustíveis. (FAO, 2014). O cultivo de microalgas marinhas é ainda mais incipiente do que as espécies de água doce. No Brasil, mesmo com uma costa de 7.367 Km e com grande insolação, que pode proporcionar altas produtividades fotossintéticas são poucas as iniciativas de produção de microalgas marinhas. A maior parte destas é cultivada para a produção de alimento vivo em sistemas de aquicultura e as iniciativas de produção de microalgas em larga escala para produção de biomassa e bioprodutos são praticamente inexistentes.

A biomassa gerada pelas microalgas tem diversas aplicações comerciais, como suplementos alimentares, pigmentos, lipídios, biocombustíveis, entre outros que poderá ser um tipo de produção muito mais sustentável que a agricultura, visto que, seu cultivo pode se dar em áreas que não se prestam à agricultura, pode também utilizar água salgada para a seu cultivo e suas taxas de crescimento são mais elevadas do que a dos vegetais superiores, podendo ser feitas várias colheitas ao longo do ano.

Entretanto, sua produção em larga escala é ainda hoje limitada por uma série de “gargalos tecnológicos” que impedem o escalonamento do processo produtivo. Por causa disso, são raros os locais onde a geração de biomassa de microalgas ocorre em maiores escalas. Nos Estados Unidos, alguns países da Europa e da Ásia já existem alguns cultivos comerciais de microalgas, principalmente para a obtenção de pigmentos utilizados na indústria alimentícia (Singh & Gu 2010). No Brasil não existem iniciativas em maior escala, havendo apenas algumas plantas-piloto de caráter demonstrativo.

Pesquisas realizadas em todo mundo levam a acreditar que o cultivo de microalgas em larga escala poderá ser viável dentro de alguns anos. Uma vez que, os custos com a produção (grande entrave para o desenvolvimento em larga escala) estão sendo substancialmente reduzidos, com a utilização de sistemas mais eficientes, manipulação das condições de cultivo para obtenção de compostos e, sobretudo por meio de grandes esforços voltados para desenvolvimento de métodos mais baratos colheita da microalga e desenvolvimento de meios de cultivos alternativos (Wijffels *et al.* 2013), especialmente com o uso de fertilizantes agrícolas.

Entretanto, se for atingida uma escala industrial, o uso de fertilizantes químicos atingirá grandes proporções, possivelmente competindo com o setor agrícola. Desta forma, uma das alternativas para o cultivo massivo de microalgas, mas de forma mais barata, é o uso de efluentes domésticos, industriais e dos setores de agropecuária e da aquicultura, como fonte de nutrientes. Vários efluentes já se mostraram eficientes como meio de cultivo para microalgas, desde águas municipais residuais (Bhatnar *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010), águas provenientes da pecuária, principalmente da suinocultura (An *et al.* 2013). Trabalhos recentes mostram ainda que as microalgas podem crescer em efluente da indústria de laticínios (Beevi & Sukumaran 2014), além de efluentes de atividades da aquicultura (Halfhide *et al.* 2014; Magnotti *et al.* no prelo).

Nas águas residuárias da indústria as microalgas são também usadas para remover metais pesados (Ahluwalia & Goyal 2007; Bashan & Bashan 2010). Por exemplo, Chimmasamy *et al.* (2010) mostraram que microalgas crescem no efluente da produção de carpete. Da mesma forma estes microrganismos podem crescer em meios extremamente tóxicos, como a água de produção de petróleo, produzir grandes biomassas e ainda realizar a depuração deste efluente (Araiada & Abreu 2014).

Por outro lado, a ação mais importante das microalgas é a retirada de nutrientes inorgânicos dissolvidos dos efluentes, pois estes podem causar grandes desequilíbrios ecológicos nos corpos de água receptores e nos ambientes naturais. Os níveis de retirada de elementos nitrogenados e fosfato são bem elevados após o crescimento das microalgas nestes meios. Por exemplo, *Botryococcus braunii*, removeu 80% de 788 mg L⁻¹ de nitrato de águas residuais da suinocultura (An *et al.* 2003) e *Nannochloropsis salina*, em dez dias de cultivo absorveu 99% de 91,4 mg L⁻¹ do fósforo de um efluente (Cai *et al.* 2013). Outros trabalhos realizados mostram redução de um total de 6 mg L⁻¹ e (Aslan & Kapdan 2006) e de 4,8 mg L⁻¹ de fosfato (Chinnasamy *et al.* 2010) representando uma retirada de 96,6% do fosfato presente nos efluentes. No presente trabalho obtivemos redução de 27,95 mg L⁻¹ de nitrato e 4,78 mg L⁻¹ do fosfato em doze dias de experimento.

Perspectivas de Futuros experimentos:

Com base nos resultados deste estudo, algumas perspectivas foram estabelecidas para o cultivo de *N. oculata* no efluente de aquicultura com tecnologia de bioflocos.

No caso de fosfato apesar da retirada de uma grande quantidade deste elemento, este representou um decréscimo de 50% da concentração inicial deste elemento. Por outro lado, em um experimento preliminar em escala laboratorial realizado com efluentes de meio BFT, *N. oculata* absorveu 100% do fosfato presente no efluente (fig. 8) em apenas seis dias de cultivo. Essa diminuição de fosfato foi similar ao obtido por Magnotti *et al.* (no prelo), que também mostrou um desaparecimento dos 2,53 mg L⁻¹ de fosfato do efluente do BFT após o cultivo de *N. oculata*.

Em comparação com os resultados do segundo experimento, onde apenas 50% do fosfato foi retirado, é possível que outros fatores como disponibilidade de luz,

proporção de N e P e inóculo inicial de *N. oculata* interferiram no nível de absorção de fosfato. Estas hipóteses de trabalho poderão ser testadas em futuros experimentos

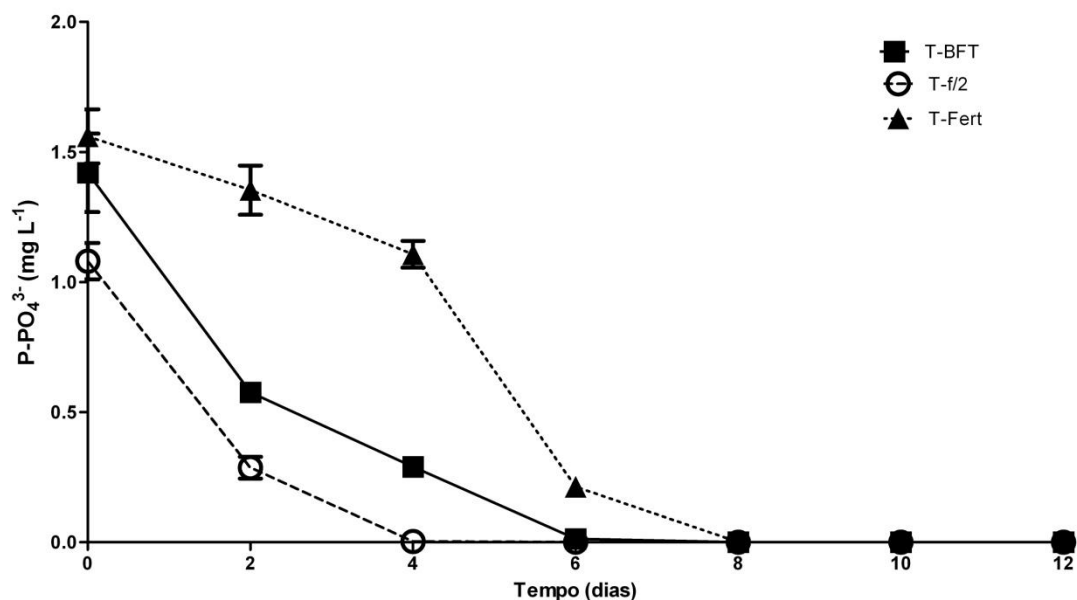


Figura 8: Concentração de ortofosfato (P-PO₄³⁻ mg L⁻¹) ao longo do tempo (dias). Valores representados em média ± desvio padrão. T-BFT: tratamento com meio biofloco; T-f/2: tratamento com meio f/2; T-Fert: tratamento com meio fertilizante.

Além disso, considerando-se a disponibilidade de nutrientes, especialmente fosfato quando presente em grandes quantidades sugere-se, que novos ciclo de cultivo sejam realizados para se determinar a capacidade máxima de crescimento de *N. oculata* até a purificação total do efluente.

Conclusão

Este trabalho evidenciou que a produção de biomassa de microalga *N. oculata*, advinda da produção integrada dos setores da aquicultura pode ser viável gerando benefícios produtivos referentes ao aumento nos lucros da produção aquícola, pois a biomassa da microalga apresenta alto valor comercial, além de possibilitar a reutilização da água com bioflocos (e.g. tratamento de efluente), contribuindo para a diminuição de impactos ambientais.

Referências Bibliográficas

- AHLUWALIA, SS & D GOYAL. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour. Technol.*, 98: 2243–2257.
- AN, JY, SJ SIM, JS LEE & BW KIM. 2003. Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.*, 15: 185–191.
- ARRIADA, AA & PC ABREU. 2014. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. *Brazilian journal of petroleum and gas*, 8: 119-125.
- ASLAN, S & IKK KAPDAN. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological engineering*. 28, 64–70.
- BASHAN, LE & Y BASHAN. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresour. Technol*, 101: 1611–1627.
- BEEVI, US & RK SUKUMARAN. 2014. Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresource Technology*, 165: 295–301.
- BHATNAGAR, A, M BHATNAGAR, S CHINNASAMY & K DAS. 2010. *Chlorella minutissima* – a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 161: 523–536.
- CAI, T, SY PARK, R RACHARAKS & Y LI. 2013. Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production. *Applied Energy*, 108: 486–492.
- CHINNASAMY, S, A BHATNAGAR, RW HUNT & KS DAS. 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource technology*, 101: 3097–3105.
- FAO. 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Food and Agriculture Organization Of The United Nations ed. Roma.

- HALFHIDE, T, A AKERSTROM, OI LEKANG, HRJ 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.
- 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.
- SINGH, J & S GU. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 2596–2610.
- WANG, L, Y LI, P CHEN, M MIN, Y CHEN, J ZHU & RR RUAN. 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 101: 2623–2628.
- WIJFFELS, RH, O KRUSE & KJ HELLINGWERF. 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 405–413.