

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Produção de algas *Scenedesmus subspicatus* utilizando água residuária de piscicultura como meio alternativo.

Aluno: Alcindo Pastore
Orientador: Prof. M.Sc. Luis Fernando Souza Gomes

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a conclusão do
CURSO SUPERIOR DE GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA-PR
Agosto de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

Produção de algas *Scenedesmus subspicatus* utilizando água residuária de piscicultura como meio alternativo.

Aluno: Alcindo Pastore
Orientador: Prof. M. Sc. Luis Fernando Souza Gomes

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a conclusão do
CURSO SUPERIOR DE GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA-PR
Agosto de 2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal Do Paraná
Setor Palotina
Curso Superior De Tecnologia Em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso
Área de Estágio: Biotecnologia

Acadêmico: Alcindo Pastore
Supervisor de Estágio: Professor M.Sc. Luis F.S. Gomes
Orientador de Estágio: Professor M.Sc. Luis F.S. Gomes

O presente trabalho de conclusão de curso foi apresentado, e aprovado pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel

Prof.ª Dr.ª Alessandra Monteiro de Paula

Prof. M.Sc. Luis Fernando. Souza. Gomes
(Orientador).

Palotina, PR, 05 de Agosto de 2013

“Jamais se desespere em meio às mais sombrias aflições de sua vida, pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda”.

Provérbio chinês

À minha família e aos meus Amigos

Dedico-lhes este trabalho com o mesmo amor, carinho, solidariedade, apoio e
companheirismo que tiveram e têm por mim!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ter me agraciado com este trabalho de pesquisa e conclusão de curso, pois através dele conheci pessoas maravilhosas e descobri virtudes naquelas que já conhecia, voltei a frequentar o ambiente da Universidade, do qual sou admirador e parceiro. Obrigado Senhor!

Aos meus pais, pela dedicação, disposição, compreensão sem fim e substituição durante este tempo de pesquisa, nos trabalhos em nossa propriedade.

De modo muito especial, o agradecimento a minha esposa Neivair e ao meu filho Thomas, infinitos parceiros e incomparáveis companheiros, em todos os momentos, de alegria e de dificuldade, pela compreensão e pelo tempo dedicado aos cuidados mútuos com nossa família.

Em especial ao meu professor Orientador Luis Fernando Souza Gomes, pela ideia de trabalhar com as microalgas, pelo acolhimento, orientação, otimismo sem fim, incentivo, compreensão e pela forte dedicação aos trabalhos de pesquisa.

Ao professor Dile Pontarolo Stremel, pela dedicação, companheirismo e auxílio no Laboratório, juntamente com o grupo de estudos BIOIND/UFPR, seus admiradores e componentes.

Às minhas amigas, amigos, colegas de Curso, bolsistas de extensão, demais pesquisadores e voluntários em geral, por sempre representarem a tradução da palavra colaboração e amizade durante essa graduação!

Ao corpo docente da UFPR, Direção Geral e Servidores pela oportunidade e colaboração nos momentos necessários.

A todos que, porventura, esqueci...

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. PORQUE AS ALGAS.....	4
2.2. MICROALGAS.....	6
2.3. ALGAS ENCONTRADAS NO BRASIL.....	6
2.3.1. <i>Scenedesmus</i> SP e Seus Benefícios no Meio Aquático.....	7
2.4. COMPOSTOS DE NITROGÊNIO E SEUS EFEITOS NO AMBIENTE.....	8
2.5. ORGÃOS DE FISCALIZAÇÃO E LEGISLAÇÕES PERTINENTES.....	8
2.6. DADOS DA PISCICULTURA REGIONAL.....	9
2.7. BIOREMEDIAÇÃO.....	10
3. OBJETIVOS GERAIS.....	11
3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	12
4.2. OBTENÇÃO DO ISOLADO DE <i>Scenedesmus subspicatus</i>	12
4.3. PREPARAÇÃO DO LOCAL DE CULTIVO NO LABORATÓRIO.....	12
4.4. CULTURA DE ATIVAÇÃO DO ISOLADO.....	13
4.5. COLETAS DE ÁGUA PARA O MEIO ALTERNATIVO.....	13
4.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE PISCICULTURA.....	13
4.6.1. Análise de Nitrogênio Amoniacal.....	13
4.6.2. Análise de Nitrito.....	14
4.6.3. Análise de Nitrato.....	14
4.6.4. Análise de Ortofosfato.....	15
4.6.5. Fósforo e Nitrogênio Total.....	15
4.6.6. Determinação do pH.....	15
4.7. MEIOS DE CULTIVO.....	16
4.7.1. Meio de Cultivo Padrão.....	16
4.7.2. Formulação do Meio M.C. no laboratório.....	16
4.8. PREPARAÇÃO DO CULTIVO.....	16
4.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	17

4.10. CULTIVO INICIAL PARA CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO.....	18
4.11. CORREÇÃO DA RELAÇÃO NITROGÊNIO FÓSFORO.....	20
4.12. CARACTERIZAÇÃO E CORREÇÃO DO MEIO.....	21
4.13. CULTIVO DEFINITIVO DA MICROALGA.....	21
4.14. DETERMINACÇÃO DA REMOÇÃO DE NUTRIENTES	23
4.15. PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA.....	23
4.16. PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS.....	23
4.17. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA RESIDUARIA DE PISCICULTURA	25
5.2. PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA.....	26
5.3. PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS.....	28
6. CONCLUSÕES.....	31
7. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente expansão da piscicultura, muitas piscigranjas vêm intensificando a população de seus cultivos para obter máxima rentabilidade com produção de qualidade. Nestes cultivos, geralmente adensados, empregam-se rações completas, pois com o aumento na taxa de estocagem aumenta também o arraçoamento, altos níveis de arraçoamento resultam em maior acúmulo de dejetos, provocando maior fermentação no sedimento do tanque, causando maior formação de amônia (SCHIMITTOU, 1997). Segundo Boyd (1992), a produção de peixes aumenta linearmente com a taxa de alimentação, enquanto a deterioração da qualidade da água aumenta exponencialmente no tempo. Para Cyrino *et al.*, (1998) esta é causada pelos alimentos não consumidos e material não digerido, que aumentam o teor de nutrientes no sistema, principalmente, nitrogênio e fósforo, parte integrante das porções de ração não consumidos pelos peixes.

A baixa qualidade da água pode afetar a produtividade piscícola e gerar uma baixa qualidade da água devolvida aos cursos naturais, que geralmente não recebe nenhum tipo de tratamento ou desintoxicação por métodos de biorremediação. Portanto, o estudo sobre o destino da ração empregada como alimentação nos tanques ou seus componentes, formulada com altos teores de proteína, e fósforo, elementos de alto valor comercial, que quando não são totalmente aproveitados no sistema de piscicultura, são perdidos pelo sistema ou permanecem no meio aquático, piorando substancialmente a qualidade da água, sendo desperdiçados, sempre que a capacidade de autodepuração do rio utilizado não comporta o lançamento da carga da produção.

Assim causa uma sobrecarga ou no mínimo uma carga excessiva de nutrientes ao longo das demais propriedades por onde segue o curso natural das águas, prejudicando e diminuindo a qualidade da água e baixando a conversão alimentar das demais pisciculturas a jusante ou do próprio rio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O crescente interesse no estudo de microrganismos como microalgas, alguns fungos, leveduras e bactérias deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse da indústria alimentar, química e farmacêutica, dentre outras (GROBBELAAR, 2004; RICHMOND, 2004).

Atualmente, as pesquisas em biotecnologia alimentar empregando microalgas vêm ganhando especial atenção, no entanto, a coleta e o cultivo para utilização na alimentação humana são realizados há séculos (RICHMOND, 1988). Segundo o mesmo autor, povos nativos do Chade, na África, e do lago Texcoco (Astecas), no México, alimentavam-se de produtos feitos com biomassa de *Spirulina* sp e ainda hoje, os nativos do Chade, em determinadas épocas do ano, dependem quase que exclusivamente da coleta desta microalga para sua alimentação (JOURDAN, 1996).

Várias espécies são cultivadas comercialmente em alguns países e a biomassa produzida tem sido utilizada como fonte de produtos para aplicação na indústria de alimentos. O mercado de alimentos funcionais, utilizando microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas, apresenta rápido desenvolvimento em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia. As principais microalgas cultivadas comercialmente são espécies dos gêneros *Chlorella beyerinck*, (Chlorophyceae) e *Arthrospira stizenberger* (Cyanophyceae) para a adição em alimentos naturais, *Dunaliella salina* Teodoresco, (Chlorophyceae) para a obtenção de betacaroteno e *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) para a obtenção de astaxantina (BECKER, 2004).

A produção comercial das microalgas com potencial para aplicação biotecnológica, de interesse industrial, está ligada especialmente a produção dos ácidos graxos poli-insaturados e dos carotenoides. Quanto ao termo microalgas, o mesmo não tem valor taxonômico, pois engloba microrganismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese aeróbia, e sua caracterização (sistemática) implica na consideração de uma série de critérios (HOEK *et al.*, 1995; RAVEN *et al.*, 2001).

Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, esses são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo àquele das plantas. A localização natural se dá em meio marinho, em água doce e no solo, sendo

consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra. O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido. Atualmente são encontradas citações relatando que podem existir entre duzentas mil, até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos (NORTON *et al.*, 1996).

Cabe ressaltar que algumas espécies sintetizam compostos que podem ser altamente tóxicos para outras espécies de organismos, inclusive para o homem. Estes compostos também têm sido explorados comercialmente, objeto de inúmeras pesquisas (TEIXEIRA, 2002). No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal (RAVEN, 1988).

Os sistemas comumente empregados são pouco sofisticados, uma vez que muitas empresas desenvolvem cultivos a céu aberto, com condições naturais de iluminação e temperatura, e com baixo ou nenhum controle destes parâmetros ambientais. Os tanques são geralmente rasos, construídos em concreto, fibra de vidro, policarbonato, com fundo de terra ou revestido com material plástico, sendo que as culturas são constantemente agitadas. Recentemente, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em equipamento específico, denominado foto biorreator, visando a alcançar elevadíssima produtividade. Os cultivos são realizados em sistema fechado, em painéis de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato. Nos foto biorreatores, é possível controlar as condições de cultivo como quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH, entre outros. Isto implica uma elevada produtividade, viabilizando a produção comercial de uma série de compostos de elevado valor (TREDICI, 2004). O cultivo de microalgas é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, sendo que, muitas espécies crescem mais rapidamente do que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores rendimentos anuais de biomassa (maior produtividade); sua natureza unicelular assegura uma biomassa com mesma composição bioquímica, o que não ocorre com as plantas terrestres que apresentam compostos localizados em partes específicas: nos frutos, folhas, sementes ou raízes; por manipulação das condições ambientais de cultivo (luz, temperatura e nutrientes, por exemplo) muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídeos e outros elementos.

Algumas espécies são bem conhecidas quanto ao potencial de cultivo e quanto aos compostos que sintetizam como é o caso dos ácidos graxos poli-insaturados devido às mudanças na dieta humana, nos últimos séculos, e ao acentuado aparecimento de uma série de doenças relacionadas ao baixo consumo destes compostos, bem como a sua reconhecida significância terapêutica, especialmente àqueles da família Ômega-3 (SIMOPOULOS, 2002).

Segundo Ratledge (2001), a produção de óleo a partir de organismos unicelulares é um conceito relativamente novo, sendo que as microalgas mostram-se como uma promissora opção. O conteúdo de lipídios da biomassa micro algal pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85%.

Os lipídeos extraídos de algas são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas de ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poli-insaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 2004).

2.1 PORQUE AS ALGAS

O leitor pode se perguntar por que as algas, incluindo algas ("algas") e algas (fito plâncton), são consideradas muito boas candidatas para uso na alimentação como alternativa à farinha de peixe na alimentação de aquicultura. Uma das principais considerações é que as algas são à base das cadeias alimentares aquáticas, que produzem os recursos alimentares que são posteriormente consumidos pelos humanos e outros animais.

A realidade é que muitas vezes não levamos em conta que a diversidade bioquímica entre diferentes espécies de algas pode ser muito maior do que aquela entre as plantas terrestres, mesmo quando as algas verdes-azuis como a *Spirulina*, por exemplo, conhecida como ciano bactéria é levada em consideração. Isso reflete a divergência evolucionária dos diferentes grupos de algas na história da vida na Terra. Apenas um dos muitos grupos de algas, algas verdes, produziu uma linha de descendentes, que, eventualmente, permitiu a evolução de todas as plantas terrestres.

Também pode ser difícil fazer generalizações significativas sobre o valor nutricional deste grupo extremamente diversificado de organismos, em vez disso, devemos levar em conta as características particulares de diferentes tipos de algas. A farinha de peixe, por exemplo, é amplamente utilizada em alimentos, em grande parte devido ao seu conteúdo

substancial de proteína de alta qualidade, contendo todos os aminoácidos essenciais. Um dos principais problemas das proteínas vegetais geralmente ocorre em alimentos para peixes, é que eles são deficientes em certos aminoácidos tais como a lisina, metionina, treonina e triptofano, enquanto que a análise do conteúdo amino em algas revelou que, embora exista uma variação significativa, tipicamente, contêm todos os aminoácidos essenciais (ORTIZ *et al.*, 2006).

Outro nutriente que é frequentemente esquecido é a taurina, por vezes agrupada aos aminoácidos nas discussões sobre nutrição, nutriente essencial para carnívoros, incluindo alguns peixes, mas esta substância não é encontrada em todas as plantas terrestres. Algumas algas são utilizadas como fontes de pigmentos, *Haematococcus* é utilizada para a produção de astaxantina, que é responsável pela cor-de-rosa de carne de salmão, *Spirulina* é usada como uma fonte de outros carotenoides, *Dunaliella* por sua vez produz grandes quantidades de betacaroteno. Além de seu alto teor de proteína de alta qualidade, a farinha de peixe, rica em lipídios ou ácido graxo poli-insaturado ômega-3 e ômega-6, lipídeos que são muito apreciados por causa de sua contribuição para a saúde cardiovascular dos seres humanos. Esses ácidos graxos são transmitidos à cadeia alimentar a partir das algas para os peixes, e são de fato nutrientes essenciais para muitos peixes.

Muitas algas foram selecionadas para estudos de alimentação, porque são baratas e estão disponíveis comercialmente. Por exemplo, as microalgas, como *Spirulina*, *Chlorella* e *Dunaliella* podem ser produzidas através de tecnologias de baixo custo são comercializadas como pós-secos, com perfis nutricionais bem documentados. Algas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, também foram propostas, e a proteína restante após a extração de lipídios, pode ser usada para a alimentação animal.

Um fator importante é o tipo e a quantidade de polissacarídeo extracelular que pode ocorrer nesse tipo de produção, que é muito abundante em certas algas e pode interferir na absorção de nutrientes, pois dependendo das condições de crescimento e transformação, as algas podem conter elevadas concentrações de oligoelementos que podem ser prejudiciais, isso traz a necessidade de se efetuar um cuidadoso estudo das propriedades de várias algas, a fim de explorar ao máximo o grande potencial deste grupo de organismos tão diversos, cada qual com as suas particularidades. Mas é evidente que as algas desempenham um papel importante no sentido do desenvolvimento da aquicultura que por sua vez, alimenta "a cadeia alimentar" de uma forma mais sustentável.

2.2 MICROALGAS

As microalgas são organismos fotossintetizantes que usam a energia luminosa e o dióxido de carbono, com maior eficiência fotossintética que plantas para a produção de biomassa. O cultivo de algas pode ser realizado em terras ainda não exploradas com água salina em regiões áridas, evitando desta forma, a competição por recursos limitados de terras aráveis.

Os meios de cultivo para microalgas foram criados na tentativa de simular a disponibilidade de nutrientes real da microalga. Alguns destes meios são modificações de meios conhecidos para atender uma necessidade específica, outros são formulados através do estudo das necessidades do organismo e da análise da água.

O nitrato juntamente com o íon amônio assume grande importância, representando as principais fontes de nitrogênio para as algas, sendo que o nitrato age comoceptor alternativo de hidrogênio na fotossíntese ao ser absorvido pela alga, passando pelo processo de redução até formar o íon amônio, posteriormente utilizado na formação de amino ácidos (MESECK *et al.*, 2005).

2.3 ALGAS ENCONTRADAS NO BRASIL

As algas são organismos que anteriormente eram incluídos no Reino *Plantae*, porém atualmente pertencem ao Reino Protista, sendo a Ficologia (fico = algas; logia = estudo) o ramo da biologia que estuda esses seres: unicelular ou multicelular (filamentosas), eucariontes, fotossintetizantes e viventes em ambientes de água doce (rios, lagos ou superfícies úmidas) ou salgada (mares e oceanos). Esses organismos autotróficos, dispostos na superfície oceânica (compondo o fitoplâncton), consomem o gás oxigênio dissolvido na água para a sua respiração e liberam através do processo fotossintético cerca de 70 a 90% do oxigênio contido na atmosfera. Recebendo, portanto, a denominação de pulmão do mundo, diferente do que muitos pensam que seja a Floresta Amazônica.

A reprodução assexuada pode ser por divisão binária, isso nas unicelulares, onde a célula se divide ao meio. Porém, a maioria das algas se reproduz de forma sexuada, principalmente as unicelulares haploides, comportando-se como se fossem gametas. Depois de atingido a maturação essas células se fundem, formando um zigoto diploide que irá se dividir por meiose, originando outras quatro células jovens haploides, reiniciando o ciclo.

Entre as características consideradas na classificação das algas, destacam-se basicamente duas: o tipo de pigmento fotossintetizante e a presença de substâncias de reservas armazenadas no interior das células, existindo seis filos distintos de acordo com o exposto na Tabela 1:

TABELA 1- Filos algais e suas características

<i>Filo</i>	<i>Pigmento Fotossintetizante</i>	<i>Substância de Reserva</i>
Euglenophyta (euglenas)	Clorofila A e b Carotenóides Xantofila	Paramilo
Dinophyta (dinoflageladas)	Clorofila A e C Carotenoides Peridinina (pigmento: marrom-avermelhada)	Amido
Bacillariophyta (diatomáceas)	Clorofila A, C e E Carotenóides Xantofila Fucoxantina (pigmento: marrom)	Crisolaminarina
Phaeophyta (algas pardas)	Clorofila A e C Carotenóides Xantofila Fucoxantina (pigmento: marrom)	Laminarina e Manitol
Rhodophyta (algas vermelhas)	Clorofila A e D Carotenoides Ficoeritrina(pigmento vermelho)	Amido
Chlorophyta (algas verdes)	Clorofila A e B Carotenoides Xantofilas	Amido

Fonte: <http://www.brasilecola.com/biologia/algas.htm>

2.3.1 *Scenedesmus* SP e Seus Benefícios no Meio Aquático

A *Scenedesmus* sp é uma alga clorófita verde planctônica, representante dos produtores primários nos ecossistemas de água doce. Na natureza estas microalgas geralmente formam agregados de até cinco ou seis células em média, podendo chegar até quinze células (LOPES, 2004). Os cultivos microalgais vêm crescendo exponencialmente em todo mundo e requerem subsídios básicos como, água, luz, CO₂ e nutrientes inorgânicos para sua manutenção. O resultado da produção é a biomassa, que pode ser destinada a diversas aplicações, por exemplo, para a indústria nutracêutica, como fonte suplementar de proteínas, carboidratos, ácidos graxos, pigmentos, vitaminas, entre outras (BOROWITZKA, 1988). Na aquicultura, pode ser empregada como fonte primária de alimento para larvas, fase juvenil e até adultos de moluscos, crustáceos e peixes, bem como de zooplâncton, usado como alimento para crustáceos e peixes (BROWN *et al.*, 1997). Outra função das microalgas na aquicultura é o de proporcionar a melhoria da qualidade da água, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos como amônia e nitrito, bem como combate a bactérias patogênicas pela

produção de substâncias antibióticas. Além disso, podem ser utilizadas na mitigação do efeito estufa, pela assimilação de CO₂ e ainda podem possibilitar a produção de bicompostíveis (DERNER *et al.*, 2006).

2.4 COMPOSTOS DE NITROGÊNIO E SEUS EFEITOS NO AMBIENTE

Compostos nitrogenados como nitrito, nitrato e amônio, podem ser tóxicos aos organismos, em altas concentrações ou quando excedem certo nível em água de criação. O nitrogênio que ocorre, em parte, na forma de íon amônio (NH₄⁺) e amoníaco (NH₃⁺) originário de resíduos orgânicos em decomposição, geralmente de excrementos animais ou fermentação de elementos adicionados ao sistema de criação, como é o caso das rações não consumidas depositadas ou em suspensão na água. A sensibilidade ao nitrogênio amoniacal depende em grande parte da espécie.

O nitrato (NO₃⁻) é o composto menos perigoso, em baixas concentrações não causa problemas, semelhante ao nitrito, o nitrato converte a hemoglobina, em um não ligante para o oxigênio. A exposição permanente a altos níveis de nitrato provoca perda de peso e uma maior ocorrência de doenças infecciosas. Para evitar estas complicações, o excesso de nitrato tem que ser removido, para alcançar as concentrações não tóxicas inferiores. Esta operação é muitas vezes efetuada através de renovação ou diluição das águas residuárias, com água menos carregada, antes do despejo ou retorno aos cursos de água naturais (CAMARGO *et al.*, 2005).

2.5 ORGÃOS DE FISCALIZAÇÃO E LEGISLAÇÕES PERTINENTES

Como toda atividade a aquicultura ou piscicultura, também está sujeita a obediência de normativas e legislação ambiental, tanto no que diz respeito à construção, edificações, como na própria criação, manejo e pesca. Podemos citar algumas das normas e legislações da atividade aquícola nas mais várias esferas.

No Paraná, o IAP- Instituto Ambiental do Paraná, como instituição fiscalizadora, segue o estabelecido na Lei Estadual n.º 10.066, de 27 de julho de 1992 (com as alterações da Lei Estadual n.º 11.352, de 13 de fevereiro de 1996).

No Brasil, o contido na Política Nacional de Meio Ambiente - Lei Federal n.º 6.938, de 31 de agosto de 1981 e nas resoluções CONAMA de n.º 01/86, 237/97 e 377/06, os quais disciplinam o Sistema de Licenciamento Ambiental, estabelecendo procedimentos e critérios, visando à melhoria contínua e o aprimoramento da gestão ambiental;

Artigo 12 da Resolução CONAMA n.º 237, de 19 de dezembro de 1997, prevê a possibilidade de estabelecer procedimentos específicos para o licenciamento ambiental, observadas a natureza, características e peculiaridades da atividade ou empreendimento e, ainda, a compatibilização do processo de licenciamento com as etapas de planejamento, implantação e operação;

CAPÍTULO IV, da Resolução CONAMA n.º 357, de 17 de março de 2005, que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes.

- DBO₅: 50 mg L⁻¹
- DQO: 200 mg L⁻¹
- Toxicidade:

FT para *Daphnia magna*: 8 (12,5%)

FT para *Vibrio fischeri*: 8 (12,5%)

Outros parâmetros de acordo com a atividade

Art. 5º. As atividades enquadradas no Sistema de Automonitoramento deverão apresentar ao IAP a Declaração de Carga Poluidora, conforme estabelecido no artigo 46 da RESOLUÇÃO CONAMA n.º 357/2005 e de acordo com a frequência especificada no Art. 8º, desta Resolução, subscrita pelo administrador principal da empresa e pelo responsável técnico devidamente habilitado, acompanhada da respectiva Anotação de Responsabilidade Técnica.

Art. 6º. As atividades poluidoras para fins de automonitoramento são classificadas de acordo com a vazão em m³ dia⁻¹, ou a carga orgânica de lançamento dos efluentes líquidos (kg DBO dia⁻¹), considerando-se o parâmetro mais conservador, de acordo com a atividade.

2.6 DADOS DA PISCICULTURA REGIONAL

A AQUIOPAR - Associação dos Aqüicultores do Oeste do Paraná, com 231 associados, congrega cinco associações municipais - AQUIMAR do município de Marechal Cândido Rondon, APAQUI de Palotina, ATAQUI de Tupãssi, ATOAQUI de Toledo e AQUAMI de Missal. A região conta com 700 ha de lâmina d'água apoiados em 10 laboratórios particulares de produção de alevinos que operam de setembro a abril. Os

produtores da região contam com o apoio da EMATER-PR, e do IAP- Instituto Ambiental do Paraná. A média de produtividade da região está em $3 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, variando de 2 até excepcionalmente $17 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Os estudos técnicos e experimentos pretendem para o futuro atingir uma produção de $30 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, com auxílio de estrutura melhorada de manejo e melhor balanceamento das rações utilizadas. As principais espécies criadas são a tilápia, carpas, pacu, catfish e clarias (REVISTA PANORAMA DA AQUICULTURA, 2013).

2.7 BIOREMEDIAÇÃO

Certas espécies de algas são capazes de absorver rapidamente compostos inorgânicos presentes na água, acumulando-os durante seu crescimento. Essa capacidade fez com que se pensasse em usá-las como biofiltros para a limpeza de ambientes aquáticos contaminados, removendo, por exemplo, nitrogênio e fósforo de resíduos orgânicos e metais pesados provenientes de rejeitos industriais lançados nas águas. Na técnica do cultivo integrado, animais e algas crescem de forma associada, promovendo um maior equilíbrio ecológico.

A utilização da técnica do cultivo integrado de animais e algas representa uma proposta favorável a um ecossistema mais equilibrado por que:

A) os animais eliminam metais pesados, que são usados pelas algas para a síntese de biomassa.

B) os animais fornecem excretas orgânicas nitrogenadas, que são transformados em gás carbônico pelas algas.

C) as algas usam os resíduos nitrogenados liberados pelos animais e eliminam gás carbônico na fotossíntese, usado na respiração aeróbica.

D) as algas aproveitam os resíduos do metabolismo dos animais e, durante a quimiosíntese de compostos, orgânicos, liberam oxigênio para o ambiente.

3. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo a realização de um cultivo de microalgas em escala laboratorial para avaliar a produção de biomassa seca e a capacidade de remoção de nutrientes nitrogenados indesejáveis para outros organismos no meio aquático utilizando água residuária de piscicultura.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os lipídios presentes na biomassa isolada do cultivo, quantificar e obter o rendimento para o meio alternativo água residuária de piscicultura.

- Obter dados sobre as melhores relações nitrogênio/fósforo, testando 3 dosagens ou combinações de nutriente com 3 valores de pH propostos para estas relações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O experimento e ensaios foram realizados na Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Bloco de Químicas, no laboratório de Química Orgânica, sob a Orientação do Professor pesquisador Luis Fernando Souza Gomes no período de 25/04/2013 a 25/07/2013.

A UFPR, instituição com mais de 100 anos de existência incentivando e promovendo pesquisa, ensino e extensão, incorpora vários setores entre eles o Setor Palotina, onde possui estrutura laboratorial que atende a 6 cursos de graduação.

O Laboratório de Química Orgânica parte integrante do bloco de química do Setor Palotina possui a estrutura necessária ao ensino e atende ainda vários grupos de pesquisa e projetos de extensão em diversas áreas técnicas e biotecnológicas, visando à boa formação dos acadêmicos de graduação, bem como os demais pesquisadores docentes da instituição, e ainda parcerias com outras empresas da região.

4.2 OBTENÇÃO DO ISOLADO DE *Scenedesmus subspicatus*.

O isolado da microalga da *Scenedesmus subspicatus* foi obtido do Laboratório de Ficologia da UNIOESTE- Universidade Estadual do Oeste do Paraná- Campus de Toledo e mantido sob refrigeração, em condições adequadas até o momento da utilização.

4.3 PREPARAÇÃO DO LOCAL DE CULTIVO NO LABORATÓRIO

Foram isolados os espaços necessários ao acondicionamento do experimento, em local adaptado e isolado na parte interna do Laboratório de química Orgânica, depois de instalados os equipamentos, visando a segurança do local, no que diz respeito à eletricidade, aquecimento e uniformização da iluminância, por meio de forração e colocação de cortinados de cor branca refletiva, sendo testados os valores por meio de aparelho luxímetro em vários pontos, conforme instrução pré estabelecida pelo fabricante visando calcular a iluminância total desejada que foi de 2000 lux, no ambiente isolado para o experimento.

4.4 CULTURA DE ATIVAÇÃO DO ISOLADO

Uma cultura inicial visando ativar o isolado foi iniciada com antecedência no meio M. C., caracterizado no item 4.7.2, para após ser utilizada como inóculo definitivo nos próximos cultivos teste.

4.5 COLETAS DE ÁGUA PARA O MEIO ALTERNATIVO

A água utilizada como meio alternativo foi coletada em um tanque de piscicultura, de uma pequena propriedade rural, utilizado para engorda do peixe Tabatinga, localizado na Linha São Roque, km 07, município de Palotina, Oeste do Estado do Paraná. A coleta se deu em dois pontos do local, o primeiro foi na tubulação adutora que abastece o tanque de piscicultura, ou seja, onde a água do córrego natural é desviada em pequena quantidade para o abastecimento da criação de peixes, a segunda coleta foi efetuada na tubulação de saída da água do tanque, local onde a água retorna ao mesmo córrego onde é retirada inicialmente. As coletas foram efetuadas na mesma data, horário e com os mesmos procedimentos, sendo posteriormente levada ao laboratório e separada uma amostra que serviu para a caracterização físico-química inicial, para os elementos de interesse neste trabalho. O restante da coleta foi dividido em partes de volume previamente definido, sendo que uma das partes foi filtrada em sistema de filtração a vácuo, por meio de papel filtro cuja densidade foi de 82g m^{-2} e depois verificado o seu pH, a outra parte foi autoclave a fim de eliminar os micro-organismos presentes, sendo submetida a uma temperatura de 121°C , por 30 minutos a pressão de uma atmosfera, após foi resfriada a temperatura ambiente e acondicionada em refrigerador para conservação e posterior utilização nos ensaios com as algas.

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE PISCICULTURA

4.6.1 Análise de Nitrogênio Amônia

A concentração de nitrogênio amônia foi determinada conforme o método Korolef (1976).

Para cada amostra pipetou-se 35,00 mL. Adicionou-se 1,00 mL de citrato de sódio e agitou-se, após adicionou-se 1,00 mL fenol e agitou-se. Também adicionou-se 1,00 mL hipoclorito diluída e agitou-se. Foi deixado em repouso no mínimo por 3 horas em lugar escuro. A leitura foi realizada a 630 nm num espectrofotômetro digital marca Edutec modelo EEQ-9029. Utilizou-se água destilada pura como branco. A concentração da amostra foi relacionada com a curva padrão previamente estabelecida.

4.6.2 Análise de Nitrito

A concentração de nitrito foi determinada conforme método Mackereth *et al.* (1978).

Para cada amostra de água, incluindo diluições padrões, pipetou-se 25,00 mL em tubo de ensaio, com réplica. Adicionou-se 0,5 mL de sulfanilamida sob agitação, aguardou-se de 2 a 10 minutos. Adicionou-se 0,5 mL de solução de bicloridrato-N-(1-naftil)-etilenodiamina sob agitação lenta. A leitura foi realizada no intervalo entre 10 a 60 minutos à 543 nm num espectrofotômetro digital marca Edutec modelo EEQ-9029. Utilizou-se água destilada pura como branco. A concentração da amostra foi relacionada com a curva padrão.

4.6.3 Análise de Nitrato

A concentração de nitrato foi determinada conforme Mackereth *et al.* (1978).

Os íons nitratos presentes na amostra foram reduzidos a nitrito na presença de cádmio amalgamado, tornando possível a sua determinação.

Foram colocados 10,00 mL das amostras de água filtrada em frascos plásticos, incluindo padrões, adicionou-se 0,60 g de cádmio amalgamado e 3 mL de cloreto de amônia a 2,6% , agitando por 5 minutos, adicionou-se 1 mL da solução de bórax a 2,1% de concentração e levaram-se as amostras a mesa agitadora por 20 minutos. Após foram retiradas e transferidos 7 mL das amostras para tubos de ensaio onde se adicionou 1 mL da solução de sulfanilamida e agitou-se, após 5 minutos foi adicionado 1 mL da solução de bicloridrato e agitou-se novamente. A leitura foi realizada no intervalo de 10 a 120 minutos a 543 nm, num espectrofotômetro digital marca Edutec modelo EEQ-9029. Utilizou-se água destilada pura como branco. A concentração da amostra foi relacionada com a curva padrão.

4.6.4 Análise de Ortofosfato

A concentração de ortofosfato foi determinada conforme o método Strickland; Parsons (1965).

Foram colocados 10,00 mL da amostra de água filtrada em um tubo de ensaio, após adicionou-se 1,00 mL de reagente misto sob agitação. Deixado em repouso 20 minutos e feita a leitura a 882 nm, num espectrofotômetro digital marca Edutec modelo EEQ-9029. Utilizou-se água destilada pura como branco. A concentração da amostra foi relacionada com a curva padrão.

4.6.5 Fósforo e Nitrogênio Total

A concentração de fósforo total e nitrogênio total foram determinados simultaneamente conforme o método proposto por Valderrama (1981).

Foram colocados 45,00 mL de amostra sem filtrar, e adicionados 6 mL de reagente oxidante (OR) e levadas a autoclavagem a 120° C por 50 minutos, após esfriar os teores de de nitrogênio e fósforo totais, foram determinados seguindo os procedimentos em rotina no laboratório nos cálculos foram empregadas as respectivas curvas conforme descrito nas análise de nitrato e ortofosfato

Para confeccionar o branco usou-se água deionizada.

4.6.6 Determinação do pH

O potencial hidrogeniônico foi determinado através de peagâmetro digital modelo ITPH-2300 Instrutemp, sendo calibrado conforme instruções do fabricante antes das medições. As medições efetuadas através da imersão direta do eletrodo nos recipientes de cultivo visando especificar o índice de acidez da água, para posterior correção visando propiciar o melhor ambiente de desenvolvimento para o microrganismo alga.

4.7 MEIOS DE CULTIVO

4.7.1 Meio de Cultivo Padrão

O meio de cultivo M.C. foi escolhido como padrão para uso neste experimento, para a comparação como o meio alternativo proposto que foi a água residuária descartada de tanque de engorda de Tabatinga, pela simplicidade e praticidade do seu preparo no laboratório e ainda por ser amplamente utilizado e indicado em cultivos de microalgas por outros pesquisadores em diversos trabalhos laboratoriais de outras instituições.

4.7.2 Formulação do Meio M.C. no Laboratório

Com o auxílio de uma balança digital de precisão foram pesados 1,250 g de nitrato de potássio (KNO_3); 1,250 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4); sulfato de magnésio heptahidratado 1,250 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 0,020 g de sulfato de ferro II heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 1,000 g de ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), juntou-se também 1,00 ml da solução cinco, descrita a seguir, os quais foram dissolvidos em um litro de água destilada. A solução cinco foi preparada pesando-se 2,900 g de ácido bórico (H_3BO_3) 1,810 g de cloreto de manganês tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 0,110 g de cloreto de zinco (ZnCl_2), 0,08 g de sulfato de cobre Pentahidratado (CuSO_4) 0,018 g de molibdato de amônio tetra hidratado ($3(\text{NH})_7\text{MoO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), os quais também são dissolvidos em um litro de água destilada (WATANABE, 1960).

4.8 PREPARAÇÃO DO CULTIVO

O cultivo inicial se deu sem fotoperíodo, sob uma iluminância de 2.000 lux em ambiente isolado, sem interferências causadas pelo ambiente externo, visando minimizar a possível ocorrência de desuniformidades no experimento.

Os recipientes e utensílios utilizados foram devidamente autoclavados, armazenados e mantidos em condições ideais até o momento da utilização ou inoculação e instalação do experimento.

4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular das microalgas nas duas etapas foi determinada por contagem utilizando-se um microscópio óptico e o auxílio de Hemocitômetro de Neubauer espelhado, com a metodologia a seguir representada na Figura 1.

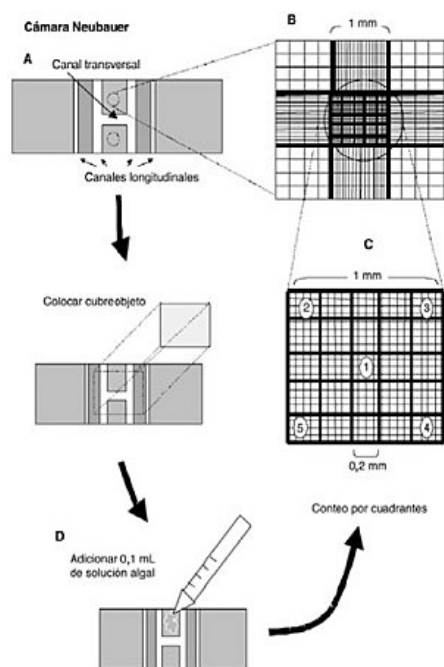


FIGURA 1. - Esquema de uso da câmara de Neubauer para determinação de n° de células.

Fonte: Manual do Laboratório de microscopia, UFSC (2010).

Utilizando-se o esquema proposto em manual UFSC (2010), Figura 1, no qual são contados os quatro quadrados maiores dos cantos da câmara e o quadrado maior da parte central, que depois de somados são divididos por cinco e multiplicado por vinte e cinco, número total de quadrados maiores da câmara, resultando um número x . Como a câmara do hemocitômetro de Neubauer possui 400 quadrados menores, cada um com uma área de $0,0025 \text{ mm}^2$ e profundidade de $0,1 \text{ mm}$, o resultado da concentração celular será expresso em valores na ordem de grandeza de $x \cdot 10^4 \text{ células mL}^{-1}$.

4.10 CULTIVO INICIAL PARA CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO

Para os tratamentos foram utilizados 21 erlenmeyers de 500 mL, com 7 tratamentos distintos em triplicata, com preenchimento de 200 mL de cultivo total por frasco, sendo 3 concentrações de meio Alternativo, com 100%, 50% e 25% de água residuária de Piscicultura autoclavada, diluída em água destilada autoclavada, 3 concentrações em 100%, 50% e 25% utilizando a mesma água residuária filtrada, diluída em água destilada autoclavada, e ainda o meio M.C. a 100%, citado na literatura, visando obter as velocidades individuais de crescimento e identificação do melhor crescimento celular específico, entre as propostas, para posterior uso em cultivo definitivo. Todos os tratamentos foram efetuados sob iluminância de 2000 lux, em fotoperíodo integral, sem aeração e sem agitação mecânica, sendo somente agitadas manualmente a cada 24 horas, a fim de evitar a deposição ou sedimentação celular e permitir a retirada de amostras diárias para a contagem de quantificação celular para composição de curva de crescimento. Os tratamentos foram inoculados de maneira igualitária com parte do líquido obtido da cultura inicial de ativação, respeitando uma concentração inicial de 2×10^4 Células por mL⁻¹, da alga da *Scenedesmus subspicatus* e conduzidos de forma a atingir o ponto de maior crescimento celular bem como parte da fase de declínio ou morte celular. Todos os tratamentos foram contados diariamente para a obtenção dos dados. A velocidade de crescimento foi determinada através da Equação 1, os resultados seguem na Figura 2.

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad (1)$$

Os dados foram ajustados ao modelo (Equação 1), linearizando-se os tratamentos na fase exponencial, para os dois melhores tratamentos observados que foram o tratamento filtrado, representado pela sigla (F-100), de concentração 100% de Meio Alternativo filtrado, seguido do meio autoclavado, representado pela sigla (A-25), de concentração 25%.

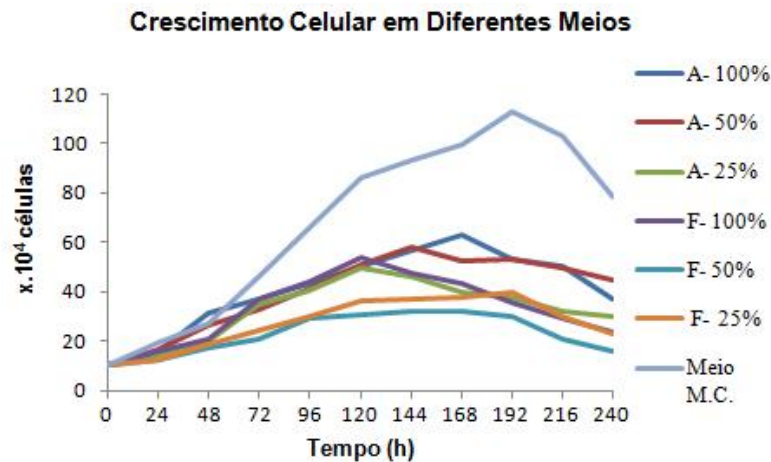


FIGURA 2-Gráfico do Crescimento celular dos diferentes meios testados em relação ao tempo de cultivo.

Com isso a escolha do tratamento de melhor concentração para o cultivo definitivo ocorreu segundo duas perspectivas, a primeira foi baseada nos resultados que podem ser observados nos gráficos 2 e 3, apresentados na Figura 3, sendo eleito o tratamento F-100, que embora a velocidade específica de crescimento obtida esteve minimamente abaixo do tratamento A- 25, os pontos para o tratamento F- 100 se ajustaram melhor, fato que pode ser observado pelo R^2 , que foi maior para o tratamento F-100, em relação ao tratamento A- 25. A segunda se baseia na dificuldade prática, pois em uma perspectiva de implantação de um protótipo maior, em escala de campo, junto a um tanque de piscicultura, haverá uma maior dificuldade de operacionalizar a autoclavagem ou eliminação de todos os microrganismos presentes do meio, bem como a diluição com mais 3 partes de água limpa a serem adicionadas, aumentando enormemente o volume, espaço físico e o tempo requerido para o tratamento do meio utilizado.

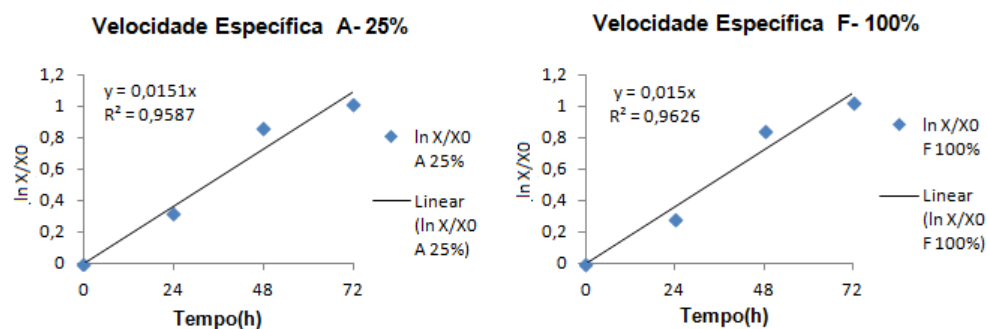


FIGURA 3 - Gráficos das velocidades específicas de crescimento dos melhores tratamentos, Autoclavado (A-25%) e Filtrado (F-100%).

A seguir seguem os dados, (Figura 4), que representam os resultados das contagens celulares entre as melhores concentrações em comparação com o meio padrão M.C..

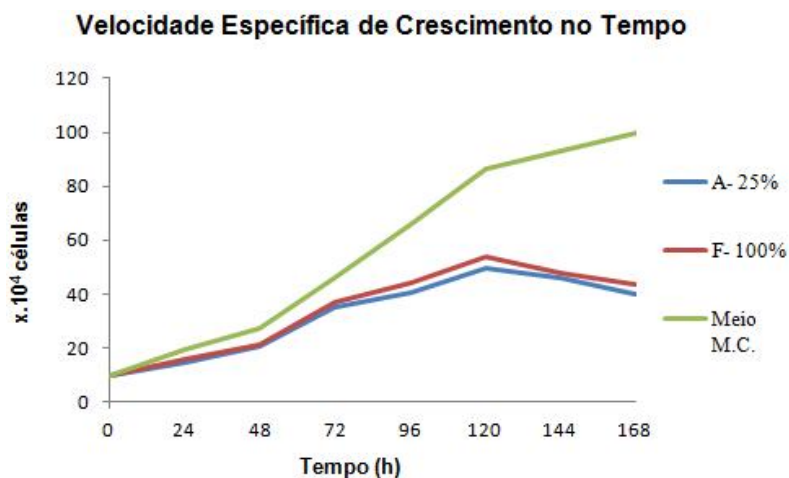


FIGURA 4- Gráfico da contagem celular no tempo para os melhores tratamentos.

4.11 CORREÇÃO DA RELAÇÃO NITROGÊNIO FÓSFORO.

O valores obtidos nas análises iniciais para os elementos, nitrato, nitrogênio Amoniacal e ortofosfato em mg L^{-1} presentes na água residuária utilizada como meio alternativo, foram convertidos para valores em mols L^{-1} de fósforo e nitrogênio presentes. A relação notada foi próxima de 60/1, sessenta partes de N para cada parte de P, muito distante da relação citada na literatura para o bom desenvolvimento algal em ambientes aquáticos, que oscila entre 7/1 e 17/1. Outro fato é que algas desenvolvem-se melhor quando há um equilíbrio da relação nitrogênio potássio. Um cultivo de Algas em recipientes, não é similar a uma ocorrência de algas em ambiente natural, pois no ambiente natural existe uma relação de coexistência entre algas, organismos como peixes e plantas aquáticas, que coexistindo, fazem a reciclagem contínua dos nutrientes no meio, gerando com o passar do tempo um equilíbrio natural a todos os indivíduos do meio. Este cultivo reprodutivo, testando 3 valores de pH e 3 relações nitrogênio fósforo, visando a produção de biomassa algal e o rendimento em lipídeos dessa biomassa em laboratório, embora na presença de alguns micro-organismos naturais do meio alternativo, não pode ser comparado ao ambiente natural, dificultando em parte o crescimento das algas.

Diante do ambiente de microrganismos teoricamente desconhecido e não caracterizado e da alta concentração de nitrogênio encontrada na água da piscicultura, foi efetuado uma

pequena correção do meio alternativo, visando equilibrar as relações e aproximá-las do equilíbrio citado na literatura, para um melhor desenvolvimento do experimento. Adicionou-se fósforo utilizando fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) com a finalidade de equilibrar a relação nitrogênio/fósforo, com as quantidades a seguir para as respectivas relações a serem testadas:

- 0,89 mg L⁻¹ de KH_2PO_4 para uma relação (7/1).
- 0,47 mg L⁻¹ de KH_2PO_4 para a relação (12/1).
- 0,30 mg L⁻¹ de KH_2PO_4 para a relação (17/1).

Corrigidas as relações nitrogênio fósforo também melhorou substancialmente a relação nitrogênio/potássio, com a presença do KH_2 do fosfato monobásico. Estas relações se aproximam das encontradas na fórmula do meio M.C., que são de (9/1) para nitrogênio fósforo e (4,5/1) para nitrogênio potássio.

4.12 CARACTERIZAÇÃO E CORREÇÃO DO MEIO

As quantidades de nutrientes encontrados nas análises de laboratório para a água residuária coletada e utilizada como meio alternativo, na entrada e saída do tanque de piscicultura, bem como o aporte de nutrientes ocasionado pelo manejo da piscicultura, podem ser comparados aos limites de nutrientes máximos permitidos pelo órgão ambiental para água doce da classe-1, bem como as correções de relação nitrogênio fosfato, a fim de possibilitar o cultivo das algas, para o efetivo experimento em 3 valores de pH a serem testados estão na Tabela 3.

4.13 CULTIVO DEFINITIVO DA MICROALGA

Para o cultivo definitivo utilizaram-se recipientes com capacidade de 5 litros, de material pet incolor, com alta transparência visando à passagem da luz oferecida pelo sistema de iluminação, sendo que a quantidade de meio utilizado foi de 2 litros a 100% de concentração, de água residuária do tanque de criação de Tabatinga, com as devidas correções das relações propostas e os 3 valores de pH que foram 5,5; 7,0 e 8,5. Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente, inoculados de maneira igualitária, com concentração de algas de 20×10^4 L⁻¹, conduzidos e remanejados diariamente dentro do local de cultivo, a fim de

minimizar possíveis diferenças no ambiente utilizado, acompanhados e conservados diariamente estáveis os parâmetros de iluminância, aeração, temperatura, sendo que o pH foi controlado diariamente, para cada tratamento utilizando-se minúsculas quantidades, gotas de solução de ácido cítrico, ou carbonato de cálcio conforme e quando necessário.

TABELA 2- Valores codificados para os tratamentos

Tratamentos	Valores codificados	
	pH	N/P
1	+1	0
2 (repetição)	0	0
3 (repetição)	0	0
4	+1	-1
5	0	-1
6 (repetição)	0	0
7	+1	+1
8	0	0
9	-1	-1
10	-1	0
11	0	+1
12	-1	+1

A maior remoção do nitrogênio e fósforo presentes no meio e a maior produção de biomassa algal foram buscadas com o experimento, dentro dos parâmetros citados. O cultivo foi conduzido, sendo utilizado um planejamento composto central, com fatorial $(3)^2$, mais quatro repetições no ponto central totalizando 12 tratamentos, diariamente foram retiradas pequenas alíquotas, para contagem de concentração celular, até o momento em que foi observado o declínio da contagem celular do primeiro tratamento, onde o experimento foi interrompido para a extração da biomassa, lipídeos, tabulação, obtenção dos dados estatísticos.

Os valores codificados dos tratamentos utilizando água residuária de piscicultura com diferentes pH e diferentes relações N/P estão na Tabela 2.

4.14 DETERMINAÇÃO DA REMOÇÃO DE NUTRIENTES

As formas de nitrogênio (amoniacoal, nitrito e nitrato) foram determinadas na água de piscicultura antes e após o cultivo da microalga *Scenedesmus subspicatus*, sendo a razão entre a diferença destes valores pelo valor inicial no tempo de cultivo a taxa de remoção dos mesmos.

4.15 PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA

O material obtido nos cultivos foi submetido à centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos, para separação da biomassa, a qual posteriormente foi seca em estufa a 85°C durante 24 horas. Sendo a produtividade obtida pela relação entre a biomassa seca e o volume de cultivo num determinado intervalo de tempo.

4.16 PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS

Após secagem, a biomassa algal foi pesada e triturada, sendo transferidas para um papel filtro e colocadas em sistema de extração de lipídios tipo Soxleth, utilizando-se como solvente extrator éter de petróleo. As amostras permaneceram em refluxo durante oito horas.

Depois de desengorduradas, as amostras foram secas em estufa a 85°C para eliminação do excesso de solvente. Depois de retiradas da estufa foram colocadas em dessecador para estabilizar a temperatura com a temperatura ambiente para posterior pesagem.

O conteúdo lipídico foi determinado pela diferença entre o peso inicial da amostra e o peso da amostra depois de desengordurada.

4.17 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi do tipo completo 3^2 (3^k), dois fatores (k) e três níveis com todas as combinações possíveis entre todos os níveis de cada fator, e mais quatro pontos

centrais, cujo objetivo é obter uma inferência estatística maior, com a variável velocidade específica de crescimento (μ) como variável dependente e as variáveis pH e relação N/P como variáveis independentes. Ensaio no ponto central ou próximos podem fornecer informações muito úteis sobre respostas entre os níveis inicialmente atribuídos aos fatores, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo, comprovando se o ajuste é adequado ou não.

TABELA 3- Caracterização de nutrientes e correções em mg L⁻¹ presentes na água residuária

Local	NH ₄	NO ₃	NO ₂	PO ₄ ³⁻	P Total	N Total	pH	DBO ₅ 20°C	DQO	OD
Entrada Piscicultura	0,09	0,046	1 x10 ⁻⁶	0,061	0,12	0,19	6,8		41,85	
Saída (F-100)	0,90	0,110	6 x10 ⁻⁶	0,082	0,10	0,64	7,0		605,7	8,0
Acréscimo Cultivo Peixes	0,81	0,064	5 x10 ⁻⁶	0,021	-0,02	0,45	0,2		563,8	
Permitido pela Resolução CONAMA N° 357/2005	3,7 2,0 1,0 0,5	10,0	1,0		0,02		< 7,5 < 8,0 < 8,5 > 8,5	< 3,0		> 6
Correção Fosfato KH ₂ PO ₄										
Relação: 7/1 (-1)				0,89			5,5/7,0/8,5			
Relação: 12/1(0)				0,47			5,5/7,0/8,5			
Relação: 17/1(1)				0,30			5,5/7,0/8,5			

Visando-se obter uma curvatura na função resposta, optou-se por um planejamento em 3 níveis, com pontos centrais, possibilitando-se obter resultados para as duas variáveis. O tratamento dos dados foi submetido à análise de variância e teste F com 95% de confiança. Realizou-se também uma análise da superfície de resposta, possibilitando obter um modelo capaz de prever as melhores condições em termos de pH e relações N/P na faixa estudada. Para tratar os dados obtidos experimentalmente foram utilizados os programas Excel e o Statistica[®] 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE PISCICULTURA

O resultado das análises dos nutrientes remanescentes, presentes na água de cada tratamento, após 5 dias de cultivo no meio, já extraídas as algas, comparado aos resultados iniciais, permitiu calcular o percentual de remoção de nitrogênio e fósforo presentes na água residuária utilizada, os valores em percentual de remoção obtidos estão expressos na Tabela 4.

TABELA 4- Percentual de remoção de nutrientes do meio alternativo (água residuária de piscicultura)

TRATAMENTO N°	Valores codificados		% REMOÇÃO DE NITROGÊNIO	% REMOÇÃO DE FÓSFORO
	pH	N/P		
1	+1	0	78	75
2	0	0	68	58
3	0	0	69	68
4	+1	-1	64	33
5	0	-1	73	40
6	0	0	63	69
7	+1	+1	78	49
8	0	0	75	74
9	-1	-1	64	49
10	-1	0	72	63
11	0	+1	74	24
12	-1	+1	30	63

Na remoção de nitrogênio se destacaram os tratamentos 1, 7 e 8, todos com mais de 75%, sendo que estes foram os cultivos com pH igual ou superior a 7,0 e relação nitrogênio fosfato superior a 12/1. Já para a remoção de fósforo destacaram-se novamente os tratamentos 1 e 8, também com percentuais em torno de 75%, sendo o melhor resultado observado com o pH 8,5 e relação nitrogênio fosfato 12/1, representado pelo tratamento 1 que coincidentemente propiciou o maior percentual de remoção para os dois elementos.

5.2 PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA

A Figura 5, representa os diferentes crescimentos celulares no tempo, para os 8 tratamentos e as 4 repetições no ponto central utilizadas no experimento.

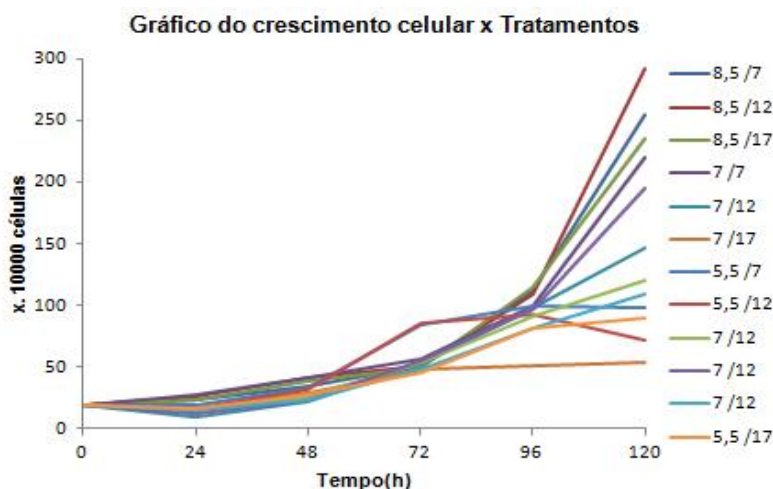


FIGURA 5- Gráfico do crescimento celular de *Scenedesmus subspicatus*

TABELA 5- Produção de biomassa seca de *Scenedesmus subspicatus*

Nº TRATAMENTO	Valores codificados		pH	RELAÇÃO N/P	BIOMASSA SECA (g L ⁻¹)
	pH	N/P			
4	+1	-1	8,5	7/1	0,1524
1	+1	0	8,5	12/1	0,1574
7	+1	+1	8,5	17/1	0,1473
5	0	-1	7	7/1	0,1480
8	0	0	7	12/1	0,1389
11	0	+1	7	17/1	0,1223
9	-1	-1	5,5	7/1	0,1356
10	-1	0	5,5	12/1	0,1326
12	-1	+1	5,5	17/1	0,1300
6	0	0	7	12/1	0,1341
3	0	0	7	12/1	--
2	0	0	7	12/1	0,1284

A quantidade de biomassa seca obtida para cada tratamento, após 5 dias de cultivo segue representada na Tabela 5, verificou-se que os melhores resultados foram observados nos tratamentos de pH 8,5 não havendo diferenciação entre os rendimentos das relações N/P.

Através do Gráfico de Pareto, Figura 6, gerado pelo programa Statistica 8.0, o qual

apresentou as estimativas absolutas dos efeitos para a análise multivariada dos experimentos, observou-se significância do parâmetro pH individualmente, quando analisado a 5%, o mesmo não ocorrendo para o fator N/P. A interação dos fatores também não foi significativa e o erro puro (MS) apresentado foi 0,0000311.

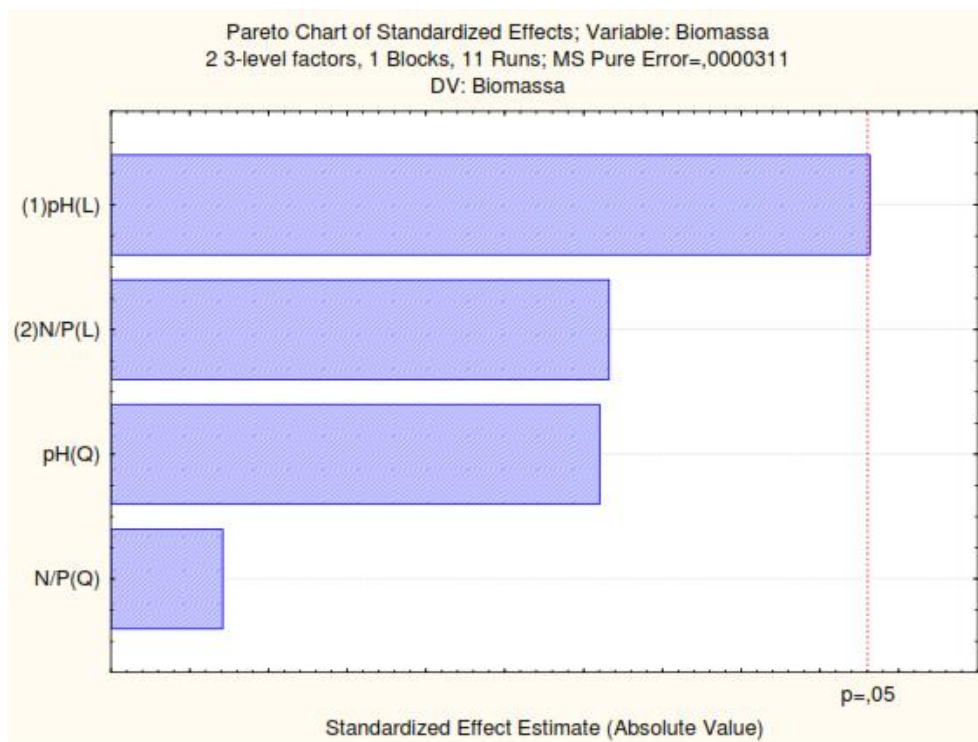


FIGURA 6- Gráfico de Pareto, para a variável biomassa seca.

Os efeitos apresentados no Quadro 1, resultado da Anova, mostram a significância, valores em vermelho) do pH, com efeito positivo leve, portanto de acordo com o modelo, o aumento do valor do fator pH no sistema, produz como efeito o aumento da biomassa produzida, dentro da escala testada.

Effect Estimates; Var.:Biomassa; R-sqr=,80627; Adj:,.61254 (Resultados_planejamento)								
2 3-level factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000311								
DV: Biomassa								
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.
Mean/Interc.	0,139470	0,001758	79,33981	0,000159	0,131907	0,147034	0,139470	0,001758
(1)pH (L)	0,019650	0,004552	4,31663	0,049701	0,000064	0,039236	0,009825	0,002276
pH (Q)	-0,009114	0,003503	-2,60204	0,121384	-0,024186	0,005957	-0,004557	0,001751
(2)N/P(L)	-0,012117	0,004552	-2,66174	0,116907	-0,031703	0,007470	-0,006058	0,002276
N/P(Q)	0,000736	0,003503	0,20998	0,853131	-0,014336	0,015807	0,000368	0,001751
1L by 2L	0,000250	0,005575	0,04484	0,968308	-0,023738	0,024238	0,000125	0,002788

QUADRO 1- Síntese da Anova para os fatores e interações analisados na Biomassa.

5.3 PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS

A quantidade de lipídios obtida para cada tratamento, após 5 dias de cultivo segue representada na Tabela 6. Verificou-se que houve diferença significativa para a produtividade de lipídios da microalga *Scenedesmus subspicatus* ao serem comparados os fatores ao nível de 5% de significância. Conforme demonstrado no Gráfico de Pareto, Figura 7, gerado pelo programa Statistica 8.0, o qual apresenta as estimativas absolutas dos efeitos para a análise multivariada dos experimentos.

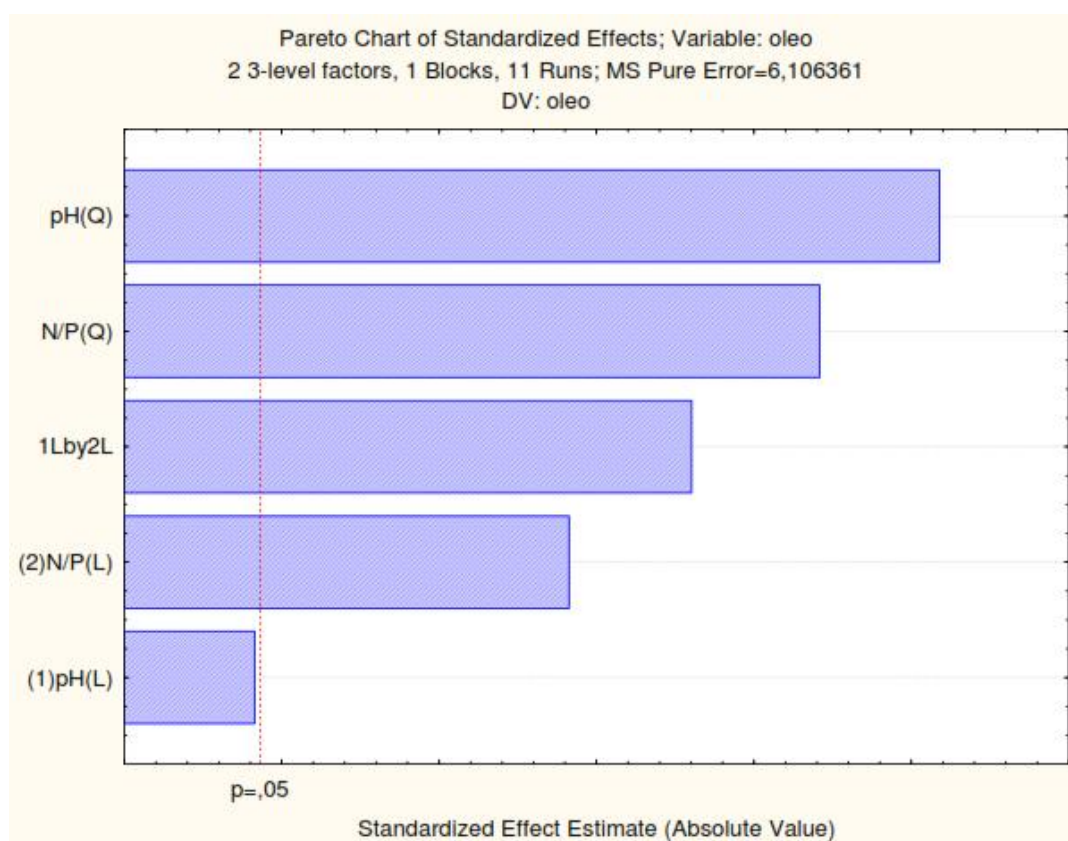


FIGURA 7- Gráfico de Pareto para a variável lipídios (Óleo).

No Quadro 2, seguem os efeitos da análise de variância da Anova, para a variável Óleo, demonstrando que o fator pH não foi significativo, já para o fator relação N/P e a interação dos fatores observou-se significância, com efeito inversamente proporcional ao crescimento da relação, isto é, quanto maior a relação N/P, menor será o rendimento obtido na produtividade de óleo no sistema.

Effect Estimates; Var.:oleo; R-sqr=,90382; Adj:,80763 (Resultados.sta) 2 3-level factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=6,106361 DV: oleo							
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.
Mean/Interc.	130,2873	0,779144	167,2185	0,000036	126,9349	133,6397	130,2873
(1)pH (L)	8,3614	2,017649	4,1441	0,053590	-0,3198	17,0426	4,1807
pH (Q)	-40,1833	1,552548	-25,8821	0,001489	-46,8633	-33,5032	-20,0916
(2)N/P(L)	-28,4950	2,017649	-14,1229	0,004976	-37,1762	-19,8137	-14,2475
N/P(Q)	34,2970	1,552548	22,0908	0,002043	27,6169	40,9771	17,1485
1L by 2L	-44,5418	2,471105	-18,0251	0,003064	-55,1741	-33,9095	-22,2709

QUADRO 2- Síntese da Anova para os fatores e interações analisados na variável Óleo.

A produção de lipídeos observada foi em média de 129 mg g⁻¹ de massa seca em cinco dias, sendo o rendimento maior representado pelos tratamentos 1 e 4, ambos cultivados sob pH 8,5 e relação nitrogênio fósforo menores que 12/1. Também mereceu destaque para a produção de lipídeos o tratamento 10, que alcançou a terceira melhor produtividade, cultivado sob pH 5,5 com relação nitrogênio fósforo de 7/1.

TABELA 6- Produtividades de lipídios em mg g⁻¹ de massa seca

Nº TRATAMENTO	Valores codificados		VALOR pH	RELAÇÃO N / P	BIOMASSA SECA (g L ⁻¹)	LIPÍDEOS (mg g ⁻¹ massa seca)
	pH	N/P				
4	+1	-1	8,5	7/1	0,1524	166,3
1	+1	0	8,5	12/1	0,1574	168,7
7	+1	+1	8,5	17/1	0,1473	108,6
5	0	-1	7	7/1	0,1480	116,2
8	0	0	7	12/1	0,1389	128,7
11	0	+1	7	17/1	0,1223	56,9
9	-1	-1	5,5	7/1	0,1356	116,8
10	-1	0	5,5	12/1	0,1326	153,4
12	-1	+1	5,5	17/1	0,1300	148,2
6	0	0	7	12/1	0,1304	128,5
3	0	0	7	12/1	--	--
2	0	0	7	12/1	0,1284	132,9

O rendimento médio da produção de lipídios do experimento situou-se em 13%, sendo que as melhores relações nitrogênio fósforo aliadas aos melhores valores de pH produziram até 17%. O pior rendimento ficou em 6%, sendo que os valores ficaram na média e abaixo das taxas encontradas por (RATLEDGE, 2001), que alcançou em seus experimentos com microalgas valores para produção de lipídios de 1 a 40% do peso seco em biomassa total e, em certas condições de cultivo, altamente controladas alcançou até 85%, outros autores como

(DERNER, 2006) também citaram rendimentos de coletas para ambientes lênticos naturais de até 40 % do teor de massa seca total. A Tabela 6, apresenta os resultados com cinco dias de cultivo, para melhor comparação do desempenho entre os tratamentos de forma individual.

É importante salientar, que em alguns outros estudos com microalgas, o aumento substancial da produção de lipídeos, geralmente esta ligado a uma condição de estresse, oferecido pelo sistema de produção, direcionado diretamente ao cultivo efetuado, assim as quantidades de lipídeos obtidas nem sempre crescem de maneira proporcional ou paralelamente aos valores de crescimento da produção de biomassa algal, sendo então, específico algum parâmetro ou fator de estresse oferecido o determinante.

A correção do meio para as relações foi importante, pois permitiu a diferenciação das produtividades, tornando possível determinar a melhor relação para a produção de biomassa e para a produção de lipídeos a partir de água residuária de piscicultura.

6. CONCLUSÕES

O cultivo de algas efetuado em escala laboratorial foi muito eficaz na retirada de nitrogênio e fósforo do meio (água residuária de piscicultura), extraindo em média 75% os elementos presentes, aproveitando a sobra de nutrientes, provenientes do tratamento dos peixes, produzindo $0,15 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa algal e acumulando percentual de lipídeos na ordem de 20%, caracterizando-se assim, como um bom método de biorremediação para ser utilizado em água residuária de piscicultura.

O parâmetro pH testado, no modelo linear, não mostrou significância para a produção de lipídios.

A relação N/P não mostrou significância para a produção de biomassa.

Estatisticamente o pH mostrou-se significativo para a produção de biomassa dentro do experimento efetuado.

A relação N/P mostrou-se significativa e os efeitos observados foram inversamente proporcionais ao crescimento desta relação para a produção de lipídios (óleo).

A produção de lipídios atingiu 16,8%, caracterizando um bom rendimento.

7. REFERÊNCIAS

AYROZA, L. M. S. *et al.* Piscicultura do Médio Paranapanema: situação e perspectiva. Revista Aquicultura e Pesca, São Paulo, v. 2, n. 12, p. 27-32, 2005.

BOYD, C. E. Manejo do solo e da qualidade da água em viveiro para aquicultura. Alabama: 1997.

CAMARGO, J. A., ALONSO, A.; SALAMANCA, A. Toxicidade de Nitrato para os animais aquáticos: uma revisão com novos dados para invertebrados de água doce. Chemosphere, 58: 1255-1267

CIRYNO, J. E. F.; CONTE L. Fundamentos da criação de peixes em tanques-rede. Piracicaba: Esalq-DBD, 2001, 38p. (série Produtor Rural,14).

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 15 de março de 2005 – apítulo III, Artigo 14, 15. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/>>. Acesso em: 14 de maio de 2013

DERNER, R. B. Microalgas, produtos e aplicações. Ciência Rural, v.36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

GROBBELAAR, J. U. Algal Nutrition. In: RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004.

HENRY, R. Amônia ou fosfato como agente estimulador do crescimento do fitoplâncton na represa de Jurumirim. Revista Brasileira de Biologia, v. 50, n. 4, p. 19-26, 1990.

KOROLEF, F. Determination of nutrients. In: Grasshoff, K. (ed). Methods of Seawater Analysis Verlag Chemie Weinheim, P.117-171, 1976.

MACKERETH, J. F. H.; HERON, J. ; TALLING, J. F. Water analysis: some revised methods for limnologists. Freshwater Biological Association, n. 36, 121 p., 1978.

MESECK, S. L. Efeitos de intensidade de luz e fotoperíodo no crescimento e utilização de nutrientes pelas microalgas. Aquicultura, 246: 393-404.

ORTIZ, J. Fibra dietética, aminoácido, ácidos graxos e conteúdo de tocoferol comestível de algas. Química Alimentar, v 99, n. 1, p. 98-104, 2006. (traduzido)

Revista Ciência Hoje. Microalgas, produtos e aplicações, Ciência Rural v.36 n.6 Santa Maria, nov./dez. 2006.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004.

SCHIMITTOU, H. R. Produção de peixes em alta densidade em tanques rede de pequeno volume. Campinas: Mogiana Alimentos e Associação Americana de Soja, 1997. 78p.

SORIANO, E. M. Filtros vivos para limpar a água. Revista Ciência Hoje. v. 37, n - 219, 2005 (adaptado).

StatSoft Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. <www.statsoft.com>.

STRICKLAND, J. D. H; PARSONS, T. R. A manual of sea water analysis, with special reference to the more common micronutrients and to particulate organic material. Fisheries Research Board of Canada, Bull n. 125, second edition. Ottawa, 1965, 203.(adaptado).

USP- IB – DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA, Laboratório de Ecologia de Macrófitas Aquáticas.

VALDERRAMA, J. C. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. Mar. Chem., v.10, p.109-122,1981.

Revista Panorama Da Aquicultura. Despesca em pequena propriedade com tanque de depuração e mini- matadouro. Disponível em:< www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/12/Despesca.asp>. Acessado em: 14 de maio de 2013.