# **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**

# INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA - IO

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Otimização de esferas de alginato de sódio para o tratamento de efluente

proveniente de sistema de recirculação de água

Ana Cecília Francio da Silva

**Rio Grande, RS, Brasil** 

2024

Universidade Federal do Rio Grande

Instituto de Oceanografia

# Otimização de esferas de alginato de sódio para o tratamento de efluente proveniente de sistema de recirculação de água

Discente: Ana Cecília Francio da Silva Orientador: Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues Coorientador: Dr. Fabio Roselet

> Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pósgraduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Rio Grande, RS

Fevereiro de 2024

# Ficha Catalográfica

S586o	Silva, Ana Cecília Francio da. Otimização de esferas de alginato de sódio para o tratamento de efluente proveniente de sistema de recirculação de água / Ana Cecília Francio da Silva. – 2024. 74 f.		
	Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2024. Orientador: Dr. Ricardo Vieira Rodrigues. Coorientador: Dr. Fabio Roselet.		
	<ol> <li>Encapsulamento 2. Esferas de alginato 3. Microalgas</li> <li>Imobilização I. Rodrigues, Ricardo Vieira II. Roselet, Fabio</li> <li>Título.</li> </ol>		
	CDU 639.3.05		

Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



### ATA 06/2024

DE DEFESA DA 235<sup>a</sup> DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AQUICULTURA No dia vinte e nove de fevereiro de dois mil e vinte e quatro, às nove horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado em Aquicultura, da ANA CECÍLIA FRANCIO DA SILVA, orientada pelo PROF. DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES composta pelos seguintes membros: PROF. DR. FABIO ROSELET (Coorientador IO/FURG), o PROF. DR. DARIANO KRUMMENAUER (IO/FURG), o PROF. DR. PABLO SANTOS GUIMARÃES (ICB/FURG) e a PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. YLLANA FERREIRA MARINHO (UFMA). Título da dissertação: "OTIMIZAÇÃO DE ESFERAS DE ALGINATO DE SÓDIO PARA TRATAMENTO DE EFLUENTE PROVENIENTE SE SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA". Dando início à defesa, o Coordenador Adjunto do PPGAg, Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, que na gualidade de orientador, passou a palavra para a candidata apresentar a Dissertação. Após ampla discussão entre os membros da Banca e a candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da dissertação, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata ANA CECÍLIA FRANCIO DA SILVA foi considerada APROVADA, devendo a versão definitiva da Dissertação ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pela candidata e pelo Coordenador em exercício do PPGAg.



Documento assinado digitalmente RICARDO VIEIRA RODRIGUES Data: 22/04/2024 15:55:05-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

# - PROF. DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES (Orientador)

Documento assinado digitalmente FABIO FELIPE GABRIEL ROSELET Data: 22/04/2024 15:37:34-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

# - PROF. DR. FABIO ROSELET (Coorientador IO/FURG)



Documento assinado digitalmente DARIANO KRUMMENAUER Data: 22/04/2024 16:31:52-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

- PROF. DR. DARIANO KRUMMENAUER (IO/FURG)



- PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. YLLANA FERREIRA MARANHÃO (UFMA)



Documento assinado digitalmente PABLO SANTOS GUIMARAES Data: 25/04/2024 22:04:12-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

# - PROF. DR. PABLO SANTOS GUIMARÃES (ICB/FURG)



- ANA CECÍLIA FRANCIO DA SILVA



- PROF. DR. LUCIANO DE OLIVEIRA GARCIA (Coordenador Adjunto PPGAq)

# ÍNDICE

1. I	INTRODUÇÃO GERAL				
1.1	. Aspecto mundial da Aquicultura				
1.2	1.2. Sistemas de Recirculação de Água 3				
1.3	. Nitrato no sistema de RAS	4			
1.4	. Fosfato no sistema de RAS	5			
1.5	. Efeitos de N e P no ambiente	5			
1.6	. Microalgas	6			
1.7	. Alginato de sódio	7			
2. (	OBJETIVO				
3. I	REFERÊNCIAS				
CAPÍ	ÍTULO ÚNICO	19			
1. I	Introdução				
<b>2.</b> I	Material e Métodos	25			
2.1.	Cultivo de microalgas	25			
2.3.	Planejamento experimental				
2.3.1.	Delineamento Composto Central Rotacional				
2.3.2.	Experimento de otimização				
2.4.	Avaliação da otimização				
2.4.1.	Análise da estabilidade das esferas				
2.4.2.	Análise do crescimento celular	29			
2.4.3.	Análise de circunferência	29			
2.4.4.	Validação do modelo empírico polinomial quadrático	30			
2.5.	Caracterização do efluente	30			
2.6.	Remoção de nutrientes do efluente	30			
2.7.	Assimilação de nutrientes				
2.8.	Determinação da taxa de crescimento celular da microalga				
2.9.	Experimento de banho de reforço				
2.10.	Presença de bactérias				
2.11.	Análise estatística				
3. I	3. Resultados				
3.1.	Otimização das esferas e validação do modelo	34			
3.2.	Assimilação de nutrientes				

3.3.	Efeito do banho de reforço	. 41
3.4.	Efeito da presença de bactérias	. 43
4.	Discussão	. 45
4.1.	Otimização das esferas e validação do modelo	. 45
4.2.	Assimilação de nutrientes	. 47
4.3.	Experimento de banho	. 49
4.4.	Experimento de bactérias	. 50
4.5.	Implicações práticas na Aquicultura	. 51
5.	Conclusão	. 52
6.	Agradecimentos	. 52
7.	Referências	. 53
Mat	erial suplementar 1	. 64
Mat	erial Suplementar 2	. 66
Mat	erial suplementar 3	. 69
4.	CONCLUSÕES GERAIS	. 72
5.	PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS	. 73

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a CAPES pelo suporte financeiro e bolsa de mestrado que possibilitaram a execução deste trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande, pela oportunidade de realizar a minha pesquisa em uma instituição de ensino de grande renome e prestígio internacional.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, que aceitou me orientar, me deu diversos conselhos e puxões de orelha, sempre com muita paciência e bom humor.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Fabio Roselet, que me ensinou tanto sobre microalgas e que foi essencial para meu crescimento e aprendizado.

Quero imensamente agradecer ao Laboratório de Microalgas do ICB da FURG pelo acolhimento e aprendizado. Um agradecimento em especial a Manuela Tourinho e Pablo Guimarães, que em nenhum momento me deixaram sentir sozinha, sempre compartilhando de sua experiência me oferecendo suporte e afeto.

Agradeço ao Laboratório de Produção de Microalgas da Estação Marinha de Aquicultura, ao Laboratório de Tecnologia Industrial (EQA) da FURG, em especial a Nina, que foi incansável e sempre esteve disposta a ajudar, com muita paciência e gentileza. Agradeço ao Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, ao Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aplicados à Aquicultura, em especial a minha amiga Cynthia, por todo o tempo disposto para a realização deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca Dr. Dariano Krummenauer, Dr. Pablo Santos Guimarães e Dra. Yllana Ferreira Marinho, por aceitarem participar da banca avaliadora do presente trabalho e pelas contribuições atribuídas a ele.

Aos meus familiares agradeço o amor que recebi e que hoje faz de mim um ser humano capaz de amar. Agradeço também à família que me recebeu de braços abertos, Rosane Medeiros, Alisson, Jean e Sheron. Em especial a menina Sheron. Dificilmente encontrarei outro ser humano tão amoroso e gentil. Nenhuma palavra dita aqui poderia expressar o quanto sou grata e honrada por ter você em meus dias.

A todos que fizeram parte dessa jornada comigo, meus mais sinceros agradecimentos!

#### **RESUMO GERAL**

A utilização de microalgas imobilizadas em matrizes de alginato para a remediação de efluentes provenientes de sistemas de recirculação de água (RAS) tem se mostrado uma alternativa viável para sistemas aquícolas. A eficiência de algumas espécies de microalgas já foi testada; no entanto, a metodologia de produção das esferas ainda é um problema recorrente devido à competição com íons de sódio (Na<sup>+</sup>) presentes no efluente com o agente utilizado na reticulação das esferas (CaCl<sub>2</sub>). O presente estudo avaliou a otimização das esferas e a eficiência de *Nannochloropsis oceanica* na remoção de nitrato e fosfato de um efluente proveniente de RAS, bem como a realização de banhos reforço de CaCl<sub>2</sub> durante o tempo de exposição das esferas ao meio. Os resultados mostraram que a microalga *N. oceanica* removeu os nutrientes do efluente, resultando em taxas de crescimento superior a células livres. O trabalho também demonstrou que a presença de microrganismos naturalmente presentes nesses efluentes comprometeu a estabilidade das esferas.

Palavras-chave: Encapsulamento, esferas de alginato, microalgas, imobilização.

#### ABSTRACT GERAL

The use of microalgae immobilized in alginate matrices for the remediation of effluents from recirculating water systems (RAS) has proven to be an ecologically viable alternative for aquaculture systems. The efficiency of some species of microalgae has already been tested; however, the methodology for producing the beads is still a recurring problem due to the competition with ions of sodium (Na<sup>+</sup>) present in the effluent with the agent used to cross-link the beads (CaCl<sub>2</sub>). The present study evaluated the optimization of the beads and the efficiency of *Nannochloropsis oceanica* in removing nitrate and phosphate from an effluent from RAS, as well as the use of CaCl<sub>2</sub> booster baths during the exposure time of the beads to the medium. The results showed that the microalga *N. oceanica* removed nutrients from the effluent, resulting in higher growth rates than free cells. The work also showed that the presence of microorganisms naturally present in these effluents compromised the stability of the beads.

Keywords: Encapsulation, alginate beads, microalgae, immobilization.

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

#### 1.1. Aspecto mundial da Aquicultura

A aquicultura desempenha um papel fundamental nas estratégias de segurança alimentar e nutrição da população mundial a longo prazo (Wang *et al.* 2015). Em 2020, a aquicultura foi responsável por 49% da produção mundial de pescado, o equivalente a US\$ 265 bilhões (FAO, 2022). A expansão da aquicultura nas últimas décadas é consequência do aumento da demanda global por proteína animal, o que torna os sistemas intensivos mais adequados para atender a essas demandas (Little *et al.* 2016). No entanto, quanto mais intenso for o cultivo, maiores serão as concentrações de compostos nitrogenados, fosfatados e matéria orgânica em suspensão e dissolvida na água (Wasielesky *et al.* 2006; Krummenauer *et al.* 2012; Rurangwa e Verdegem, 2014; Ahmed e Turchini, 2021).

#### 1.2. Sistemas de Recirculação de Água

Os sistemas de recirculação de água (RAS, *Recirculating Aquaculture Systems*) são sistemas intensivos de produção aquícola, que oferecem a vantagem de produzir em um ambiente controlado, com medidas de biossegurança aprimoradas e, que une a obtenção de cronogramas previsíveis e taxas de crescimento monitoradas com a redução de riscos relacionados a surtos e infestações de parasitas (Chen *et al.* 2018; Ahmed e Turchini, 2021). Os RAS são sistemas ambientalmente sustentáveis pois permitem que 90-99% da água seja reciclada (Badiola *et al.* 2012). Isso faz com que esses sistemas sejam menos dependentes de água do que sistemas convencionais de aquicultura (Ebeling e Timmons, 2012). Os sistemas RAS contam com fluxos de resíduos controláveis e, a maioria é operada com no máximo 5% de troca de água por dia (Ebeling e Timmons, 2012; Badiola *et al.* 2014). A baixa troca de água em RAS se deve às diferentes etapas de tratamento, como filtração, remoção da amônia e nitrito, reoxigenação e remoção de dióxido de carbono (Roalkvam *et al.* 2020).

Contudo, os RAS podem apresentar algumas desvantagens, como o alto consumo de energia utilizado durante a operação, um considerável investimento para sua implantação (Ahmed e Turchini, 2021) e os nutrientes orgânicos e inorgânicos dissolvidos, remanescentes desses sistemas, que, geralmente são descartados com a água do efluente (Barak *et al.* 2003). A qualidade da água nesses sistemas pode ser afetada devido,

principalmente, ao acúmulo de metabólitos de peixes, como amônia e dióxido de carbono (Ebeling e Timmons 2012).

#### 1.3. Nitrato no sistema de RAS

A amônia é a principal forma de nitrogênio excretada por animais aquáticos e pode ser encontrada tanto na forma gasosa (NH<sub>3</sub>) quanto em sua forma ionizada amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Purwono *et al.* 2017). A oxidação da amônia durante o processo de nitrificação e a interação do dióxido de carbono com a água tendem a acidificar o ambiente pela liberação de íons de hidrogênio (Ebeling e Timmons, 2012). Os filtros biológicos realizam a oxidação da amônia por meio das bactérias nitrificantes autotróficas, através de processos de nitrificação que tem como produto final o nitrato (Hagopian e Riley, 1998). O processo de nitrificação aeróbica ocorre em duas etapas, onde a amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) é oxidada a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) que depois é oxidado a nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Ebeling e Timmons, 2012). Duas associações de bactérias trabalham coletivamente na nitrificação e no controle da amônia, as que oxidam a amônia e as que oxidam o nitrito (Beman *et al.* 2010; Ruiz, 2019). As Bactérias Oxidantes de Amônia (BOA) obtêm energia catabolizando a amônia não ionizada para nitrito (Sedlacek *at al.* 2016). A segunda etapa da nitrificação é realizada pelas Bactérias Oxidantes de Nitrito (BON), que geram energia a partir da oxidação de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) em nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Daims *et al.* 2015; Van Kessel *et al.* 2015).

Estudos relacionados aos efeitos tóxicos do nitrato em organismos aquáticos apontam principalmente para a metemoglobinemia (MetHb), ou seja, a oxidação da hemoglobina (Hb) no plasma (Wang *et al.* 2015; Monsees *et al.* 2017). Os efeitos tóxicos do nitrato reduziram os níveis de hemoglobina plasmática (Hb) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus L.*), linguado europeu (*Scophthalmus maximus*) e peixes-espada-pintados (*Oplegnathus punctatus*) (Monsees *et al.* 2017; Yang *et al.* 2019; Yu *et al.* 2021a; Yu *et al.* 2021b). Os autores Isaza et al. (2020), em uma meta-análise, constataram que em todos os estudos, os grupos taxonômicos (peixes, anfíbios e anfípodes) que tiveram em exposição ao nitrato, tiveram uma redução na taxa de sobrevivência de em média 62,50%, além de uma série de consequências subletais, incluindo comedimento do crescimento e maiores índices de má formação desenvolvimento.

A remoção de nitrato de águas residuais pode ser obtida quando empregado o processo bacteriano de desnitrificação, onde o nitrato é reduzido a gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) que é

inofensivo para os organismos (Klas *et al.* 2006). No entanto, esse é um procedimento custoso financeiramente e exige uma fonte de carbono orgânica como doadora de elétrons como metanol, acetato, lactato ou glicose (Ahn, 2006; Wang e Chu, 2016; Xia et al, 2020). No entanto, nas últimas décadas, a poluição por nitrato em recursos hídricos tornou-se um problema ambiental global, alvo de diversos estudos (Kazakis *et* al. 2020; Jiang *et al.* 2021; Yu *et al.* 2022).

#### 1.4. Fosfato no sistema de RAS

Outro importante nutriente encontrado no RAS em elevadas concentrações é o fósforo (P), principalmente devido ao excesso adicionado na formulação da ração e que acaba não sendo absorvido pelos peixes (Rodehutscord e Pfeffer, 1995; Coloso *et al.* 2003; Herath e Satoh, 2022). Ainda assim, o ciclo do fósforo em sistemas de recirculação de água é menos conhecido do que o ciclo do nitrogênio (Barak *et al.* 2003). O efluente da aquicultura comercial é composto por produtos de resíduos metabólicos com níveis potencialmente elevados de P (Coloso *et al.* 2003). O fósforo não digerido é excretado em forma de partículas nas fezes dos peixes, enquanto o P digerido em excesso, em relação as necessidades dos organismos, é metabolizado e excretado em forma de ortofosfato inorgânico (PO4<sup>-</sup>P) na urina dos animais (Coloso *et al.* 2003; Lall e Kaushik, 2021).

#### 1.5. Efeitos de N e P no ambiente

O descarte regular de águas residuais sem tratamento adequado resulta em sérios desequilíbrios tróficos nos habitats marinhos e costeiros (Gil-Izquierdo *et al.* 2021). Um dos principais problemas associados ao descarte de efluentes em águas costeiras é o aumento do teor de nutrientes, sobretudo nitrogênio e fósforo, em um processo conhecido como eutrofização, que promove um crescimento significativo da vida vegetal aquática (Lam *et al.* 2020). Devido à baixa troca de água e a alta densidade de estocagem, os RAS podem produzir águas residuais até cem vezes mais concentradas que sistemas tradicionais (Martins *et al.* 2010). Nesse sentido, a eliminação ou a redução desses nutrientes se torna essencial para o uso de sistemas intensivos e superintensivos como em RAS (Sarkheil *et al.* 2021).

O uso de métodos alternativos no processo de remoção de nutrientes como fósforo e nitrogênio da água pode melhorar significativamente o desempenho do RAS (Sarkheil *et al.* 2021). Plantas aquáticas estão sendo estudadas como biossorventes de troca iônica para o tratamento de águas residuais (Huang *et al.* 2020). No que diz respeito a tecnologias baseadas em microalgas, diversos estudos contribuem para a conclusão de que esses organismos são uma alternativa promissora no tratamento do efluente proveniente da aquicultura (Han *et al.* 2019; Tom *et al.* 2021; Mahari *et al.* 2022).

#### 1.6. Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares, fotossintéticos, microscópicos, capazes de converter dióxido de carbono, luz, água, macro e micronutrientes em biomassa (Olaizola, 2003; Caprara *et al.* 2023). Podem ser encontradas em ecossistemas marinhos e de água doce, tornando-se essenciais para o tratamento biológico de águas residuais, devido à sua capacidade de purificação e absorção do nitrogênio e o fósforo de origem antrópica (Chai *et al.* 2021).

Em virtude da boa adaptabilidade ambiental e resistência, as espécies do gênero *Nannochloropsis* (Fig. 1) têm recebido cada vez mais atenção dos pesquisadores, o que é testemunhado por um aumento significativo no número de publicações em periódicos nos últimos anos, conforme relatado no trabalho de Ma et al. (2016). É um gênero de microalgas marinhas unicelulares, sem flagelo, pertencentes ao Filo Heterokontophyta, da Classe das Eustigmatophyaceae, família das Eustigmataceae, conhecidas por sua alta produtividade de biomassa fotoautotrófica, sua notável capacidade na acumulação de lipídios e o sucesso em cultivos de escala industrial (Radakovits *et al.* 2013). Esse gênero compreende seis espécies, com células de morfologia simples, com plastídios semelhantes aos das células vegetais e diâmetros que variam entre 2 e 8  $\mu$ m (Hibberd *et al.* 1981). Atualmente, o gênero *Nannochloropsis* é utilizado como base alimentar no setor aquícola para o cultivo de peixes marinhos, moluscos e camarões, assim como para a produção de zooplâncton (Al-Hoqani *et al.* 2016; Camacho-Rodriguez *et al.* 2016).



Figura 1: Foto do cultivo em meio f/2 da microalga do gênero *Nannochloropsis*. Escala: 10µm. Retirado de: https://www.algaebase.org/

#### 1.7. Alginato de sódio

A imobilização de microalgas em gel pode ser uma forma sustentável de melhorar a qualidade da água e a produção de organismos aquáticos (Ramli *et al.* 2017). Devido à sua natureza não tóxica, transparente, permeável e hidrofílica, polímeros naturais são comumente utilizados na imobilização de microalgas para a ficorremediação de águas residuais, evitando que compostos como N e P sejam descarregados no meio ambiente (Emparan *et al.* 2019). Além da maior eficiência na remoção de nutrientes em comparação com células livres suspensas, as esferas de alginato são maiores que as células livres, permitindo que seja empregado um método de coleta simples e sem muita demanda de energia, como peneiramento (Moreno-Garrido, 2008; de-Bashan and Bashan, 2010). Esse método de cultivo se converte na produção de microalgas que podem ter inúmeras aplicabilidades (Zeng *et al.* 2013).

O encapsulamento é o processo de confinamento de um composto ativo dentro de uma matriz polimérica na forma de partículas, visando imobilizar, proteger, estabilizar, liberar de forma controlada o composto ativo ou alterar as propriedades dos produtos (Chan *et al.* 2009; Chan, 2011). Dentre os polímeros naturais, o alginato de sódio é um dos mais amplamente utilizados para encapsulamento (Moreno-Garrido, 2008). Sendo um polissacarídeo natural derivado de algas marinhas marrons, apresentando duas estruturas

molecular composta de copolímeros lineares de ácido manurônico (ManA) e ácido gulurônico (GulA) (Lee *et al.* 2013).

As cadeias poliméricas que constituem o alginato, variam entre as espécies de algas marinhas e suas propriedades físico-químicas podem ser significativamente afetadas pela abundância e/ou distribuição das unidades do bloco G (*e.g.*: GulA) e bloco M (*e.g.* ManA) (Rhein-Knudsen *et al.* 2017; Youssouf *et al.* 2017). A partir disto, sabe-se que, devido ao número de ligações, quando a estrutura molecular do alginato é enriquecido com GulA se torna mais rígida, enquanto a estrutura enriquecida com ManA é mais flexível (Zazzali et al. 2019). E o amplo uso desse polissacarídeo se deve a sua capacidade de formar géis na presença de cátions divalentes, como íons de cálcio (Braccini e Pérez, 2001).

A gelificação, no caso do alginato, é o resultado de interações fortes e específicas entre íons de cálcio e blocos de resíduos de ácido gulurônico, ligados por altos coeficientes de seletividade (Braccini e Pérez, 2001; Cao *et al.* 2020). O modelo da "caixa de ovos" (ou *Egg-Box*) (Grant *et al.* 1973), indica que os blocos de G ao longo da cadeira de alginato adotam uma conformação helicoidal, formando regiões curvadas na estrutura (Fang *et al.* 2007). Duas cadeias de G antiparalelas formam dímeros com cátions divalentes, como Ca<sup>2+</sup>, dando a forma de Caixa de Ovos (Fig. 1; Fang et al. 2007; Cao *et al.* 2020).



Figura 2: Imagem esquemática ilustrando o modelo de caixa de ovos de alginato de Ca, conforme proposto por Morris et al., 1978.

Algumas características das esferas de alginato como a força mecânica e a estabilidade são significativamente influenciadas pela sua composição (massa molar e proporção de blocos G/M) e concentração do polímero, assim como pelo tipo e concentração do agente de reticulação (Martinsen *et al.* 1989; Moreira *et al.* 2006; De Jesus *et al.* 2019). A bactérias presentes nos RAS também são um fator determinante para a estabilidade das esferas (Cruz *et al.* 2013). Em vista disso, o objetivo deste estudo foi produzir esferas de alginato uniformes e estáveis, para imobilização de *Nannochloropsis oceanica* e, avaliar seu crescimento e potencial remoção de nutrientes acumulados nos sistemas de recirculação de água, que de outra forma seriam descartados no ambiente natural, contribuindo assim para a promoção da sustentabilidade e eficiência desses sistemas aquícolas.

# 2. OBJETIVO

## 2.1 Objetivos Geral

O objetivo geral do trabalho é otimizar a produção de esferas de alginato de sódio, e sua eficiência na imobilização da microalga *Nannochloropsis oceanica*, para a remoção de nutrientes presentes em efluentes de sistemas de recirculação de água.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar se há influência das diferentes concentrações de biopolímero, na formação das esferas gelificadas;
- Avaliar como as concentrações de agente reticulante podem afetar a resistência e estabilidade das esferas formadas;
- iii. Determinar o intervalo de tempo mais adequado para a gelificação das esferas no cloreto de cálcio;
- Analisar se as características das esferas são afetadas e alteradas pelo fosfato durante o processo de formação das esferas de alginato;
- v. Analisar como as variações de salinidade ao longo do tempo podem afetar na estabilidade das esferas;
- vi. Verificar a eficiência de banhos extras de cloreto de cálcio em diferentes momentos do experimento;
- vii. Investigar a influência de fatores bióticos na estabilidade das esferas.

# **3. REFERÊNCIAS**

- Ahmed, N., Thompson, S., Glaser, M., 2019. Global Aquaculture Productivity, Environmental Sustainability, and Climate Change Adaptability. Environmental Management, 63, 159– 172. https://doi.org/10.1007/s00267-018-1117-3
- Ahmed, N., Turchini, G.M., 2021. Recirculating aquaculture systems (RAS): Environmental solution and climate change adaptation. Journal of Cleaner Production, 297, 126604.
- Ahn, Y. H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. Process Biochemistry, 41(8), p.1709–1721. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.033
- Al-Hoqani, U., Young, R., Purton, S., 2016. The biotechnological potential of *Nannochloropsis*. Perspect. Phycol, 4, 1-15. <u>https://doi.org/10.1127/pip/2016/0065</u>
- Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J., 2012. Recirculating aquaculture systems (RAS) analysis: main issues on management and future challenges. Aquacultural Engineering, 51, 26e35. <u>https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.004</u>
- Barak, Y., Cytryn, E., Gelfand, I., Krom, M., Van Rijn, J., 2003. Phosphorus removal in a marine prototype, recirculating aquaculture system. Aquaculture, 220, (1-4), 313-326. <u>https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00342-3</u>.
- Beman, J. M., Sachdeva, R., Fuhrman, J. A, 2010. Population ecology of nitrifying Archaea and Bacteria in the Southern California Bight. Environmental Microbiology, 12(5), 1282-1292. <u>https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02172.x</u>
- Braccini, I., Pérez, S., 2001. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. Biomacromolecules, 2(4), 1089-1096. https://doi.org/10.1021/bm010008g
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., Fang, Y., 2020. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. Carbohydrate Polymers, 242, 116389. <u>https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389</u>
- Caprara, C.d.S.C., Mathias, T.K., Santos, M.d.F.C., D'Oca, M.G.M., D'Oca, C.D.R.M., Roselet, F., Abreu, P.C., Ramos, D.F., 2023. Application of 1H HR-MAS NMR-Based Metabolite Fingerprinting of Marine Microalgae. Metabolites, 13(2), 202. https://doi.org/10.3390/metabo13020202
- Chai, W.S., Tan, W.G., Munawaroh, H.S.H., Gupta, V.K., Ho, S.H., Show, P.L., 2021. Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: a

review. Environmental Pollution, 269: 116236. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116236

- Chan, E.S., Lee, B.B., Ravindra, P., Poncelet, D., 2009. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. Journal of Colloid and Interface Science, 338(1), 63-72.
- Chan, E.S., 2011. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. Carbohydrate Polymers, 84(4), 1267-1275.
- Chen, M., Chen, Y., Dong, S., Lan, S., Zhou, H., Tan, Z., Li, X., 2018. Mixed nitrifyingbacteria culture under different temperature dropping strategies: Nitrification performance, activity, and community. Chemosphere, 195, 800-809. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.129
- Cruz, I., Bashan, Y., Hernàndez-Carmona, G., De-Bashan, L.E., 2013. Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 9847-9858.
- Coloso, R.M., King, K., Fletcher, J.W., Hendrix, M.A., Subramanyam, M., Weis, P., Ferraris, R.P., 2003. Phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed practical diets and its consequences on effluent phosphorus levels. Aquaculture, 220(1-4), 801-820. <u>https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00403-9</u>
- Daims, H., Lebedeva, E., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M., 2015. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. Nature, 528, 504–509. <u>https://doi.org/10.1038/nature16461</u>
- De-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. Bioresource Technology, 101(6), 1611-1627. <u>https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.0433</u>
- De Jesus, G.C., Bastos, R.G., da Silva, M.A., 2019. Production and characterization of alginate beads for growth of immobilized *Desmodesmus subspicatus* and its potential to remove potassium, carbon and nitrogen from sugarcane vinasse. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 22, 101438. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101438.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., 2012. Recirculating aquaculture systems. Aquaculture Production Systems, 245-277. <u>https://doi.org/10.1002/9781118250105.ch11</u>

- Emparan, Q., Harun, R., Jye, Y.S., 2019. Phycoremediation of treated palm oil mill effluent (TPOME) using *Nannochloropsis* sp. cells immobilized in the biological sodium alginate beads: effect of POME concentration. BioResources 14 (4), 9429-9443. <u>https://doi.org/10.15376/biores.14.4.9429-9443</u>
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Nishinari, K., Funami, T., Williams, P.A., Li, L., 2007. Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. The Journal of Physical Chemistry B, 111(10), 2456-2462. <u>https://doi.org/10.1021/jp0689870</u>
- FAO., 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome. https://doi.org/10.4060/cc0461en
- Gil-Izquierdo, A., Pedreño, M.A., Montoro-García, S., Tárraga-Martínez, M., Iglesias, P., Ferreres, F., Barceló, D., Núñez-Delicado, E., Gabaldón, J.A., 2021. A sustainable approach by using microalgae to minimize the eutrophication process of Mar Menor lagoon. Science of the Total Environment, 758. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143613
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. Bulletin of the Federation of European Biochemical Societies Letters, 32(1), 195-198. <u>https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7</u>
- Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. Aquacultural Engineering, 18(4), 223-244. <u>https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00032-6</u>
- Han, P., Lu, Q., Fan, L., Zhou, W., 2019. A review on the use of microalgae for sustainable aquaculture. Applied Sciences, 9(11), 2377. <a href="https://doi.org/10.3390/app9112377">https://doi.org/10.3390/app9112377</a>
- Herath, S.S., Satoh, S., 2022. Environmental impacts of nitrogen and phosphorus from aquaculture. In: Feed and Feeding Practices in Aquaculture. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 427-444. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821598-2.00010-2</u>
- Hibberd, D.J., 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 82(2), 93-119.

- Huang, X., Guida, S., Jefferson, B., Soares, A., 2020. Economic evaluation of ionexchange processes for nutrient removal and recovery from municipal wastewater. NPJ Clean Water, 3(1), 7.
- Isaza, D.F.G., Cramp, R.L., Franklin, C.E., 2020. Living in polluted waters: A metaanalysis of the effects of nitrate and interactions with other environmental stressors on freshwater taxa. Environmental Pollution, 261, 114091.
- Jiang, H., Zhang, Q., Liu, W., Zhang, J., Pan, K., Zhao, T., Xu, Z., 2021. Isotopic compositions reveal the driving forces of high nitrate level in an urban river: implications for pollution control. Journal of Cleaner Production, 298, 126693. <u>https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126693</u>
- Kazakis, N., Matiatos, I., Ntona, M.M., Bannenberg, M., Voudouris, K., 2020. Origin, implications and management strategies for nitrate pollution in surface and ground waters of Anthemountas basin based on a δ15N-NO3 and δ18O-NO3- isotope approach. Science of The Total Environment, 724, 138211. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138211
- Klas, S., Mozes, N., Lahav, O., 2006. Development of a single-sludge denitrification method for nitrate removal from RAS effluents: lab-scale results vs. model prediction. Aquaculture, 259(1-4), 342-353. <u>https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.049</u>
- Krummenauer, D., Seifert Junior, C.A., Poersch, L.H.D.S., Foes, G.K., Lara, G.R.D., Wasielesky Junior, W., 2012. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água. Atlântica, Rio Grande, 34(2) 103-111.
- Lall, S.P., Kaushik, S.J., 2021. Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish. Animals, 11(9): 2711. <u>https://doi.org/10.3390/ani11092711</u>
- Lee, B.B., Ravindra, P., Chan, E.S., 2013. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. Chemical Engineering & Technology, 36(10), 1627-1642. <u>https://doi.org/10.1002/ceat.201300230</u>
- Little, D., Newton, R., Beveridge, M., 2016. Aquaculture: A rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential. Proceedings of the Nutrition Society 75 (3), 274-286. doi:10.1017/s0029665116000665
- Ma, X.N., Chen, T.P., Yang, B., Liu, J., Chen, F., 2016. Lipid production from Nannochloropsis. Marine Drugs 14(4), 61. <u>https://doi.org/10.3390/md14040061</u>

- Mahari, W.A.W., Razali, W.A.W., Manan, H., Hersi, M.A., Ishak, S.D., Cheah, W., Chan, D.J.C., Sonne, C. Show, P.L., Lam, S.S., 2022. Recent advances on microalgae cultivation for simultaneous biomass production and removal of wastewater pollutants to achieve circular economy. Bioresource Technology, 128085. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128085
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C., Heinsbroek, L.T., Schneider, O., Blancheton, J.P., Roque d'Orbcastel, E., Verreth, J.A.J., 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. Aquacultural Engineering, 43 (3), 83-93. <u>https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.09.002</u>
- Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., 1989. Alginate as immobilization material:
  I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads.
  Biotechnology and Bioengineering, 33(1), 79-89.
  https://doi.org/10.1002/bit.260330111
- Monsees, H., Klatt, L., Kloas, W., Wuertz, S., 2017. Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. Aquaculture Research, 48(7), 3482-3492. <u>https://doi.org/10.1111/are.13174</u>
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2006. Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: bead stability and suitability. Enzyme and Microbial Technology, 38, 135 – 141. <u>https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.005</u>
- Moreno-Garrido, I., 2008. Microalgae immobilization: current techniques and uses. Bioresource technology, 99(10), 3949-3964. <u>https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.0404</u>
- Morris, E.R., Rees, D.A., Thom, D., Boyd, J., 1978. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. Carbohydrate Research, 66(1), 145-154.
- Murray, F., Bostock, J., Fletcher, D., 2014. Review of Recirculation Aquaculture System Technologies and Their Commercial Application. Stirling Aquaculture, University of Stirling, UK.
- Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. Biomolecular Engineering, 20(4-6), 459-466.

- Purwono, A.R., Hibbaan, M., Budihardjo, M.A., 2017. Ammonia-nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) and ammonium-nitrogen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) equilibrium on the process of removing nitrogen by using tubular plastic media. Journal of Materials and Environmental Sciences, 8, 4915-4922.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlage, R.E., Boore, J.L., Posewitz, M.C., 2013. Corrigendum: Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. Nature Communications, 4, 2356. https://doi.org/10.1038/ncomms3356
- Ramli, N.M., Verdegem, M.C.J., Yusoff, F.M., Zulkifely, M.K., Verreth, J.A.J., 2017. Removal of ammonium and nitrate in recirculating aquaculture systems by the epiphyte *Stigeoclonium nanum* immobilized in alginate beads. Aquaculture Environment Interactions, 9, 213-222. https://doi.org/10.3354/aei00225
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M.T., Ajalloueian, F., Meyer, A.S., 2017. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp. Food Hydrocolloids, 71, 236-244. <u>https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.016</u>
- Roalkvam, I., Drønen, K., Dahle, H., Wergeland, H.I., 2020. Comparison of active biofilm carriers and commercially available inoculum for activation of biofilters in marine recirculating aquaculture systems (RAS). Aquaculture, 514, 734480. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734480
- Rodehutscord, M., Pfeffer, E., 1995. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Water Science and technology, 31 (10), 143-147. <u>https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00433-N</u>.
- Rodrigues, R.V., Pedron, J.D.S., Romano, L.A., Tesser, M.B., Sampaio, L.A., 2015. Acute responses of juvenile cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766) to acid stress. Aquaculture Research, 46(5), 1241-1247.
- Rurangwa, E., Verdegem, M.C., 2014. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. Reviews in Aquaculture, 7(2), 117-130. https://doi.org/10.1111/raq.12057
- Sarkheil, M., Ameri, M., Safari, O., 2022. Application of alginate-immobilized microalgae beads as biosorbent for removal of total ammonia and phosphorus from water of African cichlid (*Labidochromis lividus*) recirculating aquaculture system. Environmental Science and Pollution Research, 1-13.

- Sedlacek, C. J., Nielsen, S., Greis, K. D., Haffey, W. D., Revsbech, N. P., Ticak, T., Laanbroek, H.J., Bollmann, A., 2016. Effects of bacterial community members on the proteome of the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain Is79. Applied and Environmental Microbiology, 82(15), 4776-4788. https://doi.org/10.1128/AEM.01171-16
- Tom, A.P., Jayakumar, J.S., Biju, M., Somarajan, J., Ibrahim, M.A., 2021. Aquaculture wastewater treatment technologies and their sustainability: A review. Energy Nexus, 4, 100022. https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100022
- Van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J., Kartal, B., Jetten, M.S.M., Lücker, S., 2015. Complete nitrification by a single microorganism. Nature, 528 (7583), 555-559.
- Wang, J., Chu, L., 2016. Biological nitrate removal from water and wastewater by solidphase denitrification process. Biotechnology Advances, 34(6), 1103-1112. https://doi.org/10.1016/j.biotechady.2016.07.001
- Wasielesky 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(1-4), 396-403. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030
- Xia, L., Li, X., Fan, W., Wang, J., 2020. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel Acinetobacter sp. ND7 isolated from municipal activated sludge. Bioresource Technology, 301, 122749. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122749
- Yang, X., Song, X., Peng, L., Hallerman, E., Huang, Z., 2019. Effects of nitrate on aquaculture production, blood and histological markers and liver transcriptome of *Oplegnathus punctatus*. Aquaculture 501, 387–396. <a href="https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.048">https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.048</a>
- Youssouf, L., Lallemand, L., Giraud, P., Soulé, F., Bhaw-Luximon, A., Meilhac, O., D'Hellencourt, C.L., Jhurry, D., Couprie, J., 2017. Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. Carbohydrate Polymers, 166, 55–63. <u>https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.041</u>
- Yu, J., Wang, Y., Xiao, Y., Li, X., Zhou, L., Wang, Y., Du, T., Ma, X., Li, J., 2021a.Investigating the effect of nitrate on juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) growth

performance, health status, and endocrine function in marine recirculation aquaculture systems. Ecotoxicology and Environmental Safety, 208, 111617. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111617

- Yu, J., Xiao, Y., Wang, Y., Xu, S., Zhou, L., Li, J., Li, X., 2021b. Chronic nitrate exposure cause alteration of blood physiological parameters, redox status and apoptosis of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 283, 11710. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117103</u>
- Yu, J., Wang, X., Qian, S., Liu, P., Li, X., Li, J., 2022. Exposure to nitrate induces alterations in blood parameter responses, liver immunity, and lipid metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquatic Toxicology, 251, 106280. <u>https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106280</u>
- Zazzali, I., Calvo, T.R.A., Ruíz-Henestrosab, V.M.P., Santagapita, P.R., Perullini, M., 2019. Effects of pH, extrusion tip size and storage protocol on the structural properties of Ca(II)-alginate beads. Carbohydrate Polymers, 206(15), 749–756. <u>https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.051</u>
- Zeng, X., Danquah, M.K., Halim, R., Yang, S., Chen, X.D., Lu, Y., 2013. Comparative physicochemical analysis of suspended and immobilized cultivation of *Chlorella* sp. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 88, 247–254. <u>https://doi.org/10.1002/jctb.3821</u>
- Zhu, S., Chen, S., 1999. An experimental study on nitrification biofilm performances using a series reactor system. Aquacultural Engineering, 20(4), 245-259. https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00019-9

# **CAPÍTULO ÚNICO**

Otimização da imobilização de *Nannochloropsis oceanica* em esferas de alginato de sódio para remoção de nutrientes em Sistemas de Aquicultura em Recirculação

Ana Cecilia Francio <sup>a\*</sup>, Janaína Barreto Alves <sup>b</sup>, Cynthia Couto <sup>a</sup>, Tito Roberto Sant'Anna Cadaval Jr <sup>b</sup>, Dariano Krummenauer <sup>d</sup>, Pablo Santos Guimarães <sup>c</sup>, , Ricardo V. Rodrigues <sup>e</sup>, Fabio Roselet <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Produção de Microalgas, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Av. Itália, Km 08, Rio Grande, RS 96201-900, Brasil [francio@furg.br] [fabio.roselet@furg.br] [cynthia.couto@furg.br]

<sup>b</sup> Laboratório de Tecnologia Industrial, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Avenida Itália Km 8, Campus Carreiros, 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil [ninajbalves@gmail.com] [titoeq@gmail.com]

<sup>c</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brasil [pabloguima@gmail.com]

<sup>d</sup> Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aplicados à Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS CEP, Brasil [darianok@gmail.com]

<sup>e</sup> Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Instituto de Oceanografia,
 Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brasil
 [vr.ricardo@gmail.com]

## \*Autor Correspondente: Ana Cecilia Francio. E-mail: francio@furg.br

Manuscrito a ser traduzido e submetido para a revista Aquaculture - Fator de Impacto: 4.5

#### Resumo

O crescimento da aquicultura nas últimas décadas decorre do aumento da demanda global por proteína animal, o que torna os sistemas intensivos mais adequados para suprir essas necessidades. No entanto, à medida que o cultivo se intensifica, as concentrações de compostos nitrogenados, fosfatados e matéria orgânica em suspensão e dissolvida na água aumentam. A imobilização de microalgas em esferas de alginato foi explorada como uma alternativa para o tratamento de efluentes provenientes de sistemas de recirculação de água. Nesse contexto, a eficiência da microalga Nannochloropsis oceanica foi investigada através de análises da remoção de nitrato e fosfato. A resistência das esferas produzidas foi testada através de experimentos de compressão utilizando um texturômetro, equipado com uma célula de carga de 5 kg. As esferas possibilitaram o transporte de nutrientes do meio para as células de microalgas, promovendo a assimilação e, consequentemente, o crescimento de N. oceanica. No entanto, a estabilidade das esferas foi comprometida por bactérias presentes em sistemas de recirculação de água, tornandose um fator negativo na durabilidade das matrizes. Os resultados gerados contribuirão para o aprimoramento no desenvolvimento de tecnologias avançadas para o tratamento de efluentes.

Palavras-chave: Encapsulamento, bactéria, assimilação, nitrato, fosfato.

#### 1. Introdução

A aquicultura emerge como uma peça crucial para a segurança alimentar global, representando 49% da produção mundial de pescado em 2020, equivalente a um substancial montante de US\$ 265 bilhões (Wang et al., 2021; FAO, 2022). O crescimento da aquicultura nas últimas décadas é resultado direto do incremento na demanda global por proteína animal, aliado à estabilização das capturas, motivando o desenvolvimento de sistemas intensivos de produção para suprir esta demanda (Little et al., 2016).

Nesse contexto, os sistemas de recirculação de água (*Recirculating Aquaculture Systems* - RAS) despontam como métodos intensivos e altamente eficazes de produção aquícola em ambientes controlados. Tais sistemas não apenas proporcionam cronogramas previsíveis e taxas de crescimento monitoradas, mas também reduzem consideravelmente os riscos associados a surtos de doenças (Ebeling e Timmons, 2012; Bueno e Soto, 2017; Chen et al., 2018; Ahmed e Turchini, 2021). Além disso, sua característica mais marcante reside na sustentabilidade, permitindo a reciclagem de 90-99% da água utilizada, tornando-os consideravelmente menos dependentes de recursos hídricos em comparação com métodos convencionais (Ebeling e Timmons, 2012).

Entretanto, apesar da notável eficiência no uso da água (Naylor et al., 2000; Ahmed et al., 2019; Ahmed e Turchini, 2021), os sistemas intensivos de cultivo em RAS enfrentam um desafio substancial, a tendência à acumulação de compostos nitrogenados e fosfatados, provenientes tanto da ração quanto do metabolismo dos organismos (Rurangwa e Verdegem, 2014; Ahmed e Turchini, 2021). Dado que o efluente do RAS apresenta concentrações elevadas de compostos que podem induzir à eutrofização do meio ambiente e que, a presença desses compostos pode causar danos ao nível de oxigênio dissolvido na água, o que pode ter um impacto negativo no estado trófico e na vida aquática, ocasionando o crescimento de fitoplâncton e florações de algas, causando eutrofização (Metcalf & Eddy, 2003). Uma das abordagens para lidar com estes compostos nitrogenados tóxicos, reside no uso de filtros biológicos nitrificantes, onde as bactérias desempenham um papel crucial ao oxidar a amônia ( $NH_4^+$ ) a nitrito ( $NO_2^-$ ) e, em seguida, a nitrato ( $NO_3^-$ ), que tende a se acumular no sistema (Hagopian e Riley, 1998, Ebeling e Timmons, 2012). No entanto, estudos demonstram que concentrações elevadas de nitrato na água podem causar toxicidade aos organismos, oxidando a hemoglobina no plasma (Monsees et al., 2017; Yu et al., 2022) e consequentemente, reduzindo o crescimento e a sobrevivência dos peixes (Monsees et al., 2017; Yang et al., 2019; Isaza et al., 2020; Yu et al., 2021).

Outro desafio premente é a presença de fosfato (PO4<sup>3-</sup>) nos RAS, decorrente do excesso de fósforo adicionado na formulação da ração, que muitas vezes não é consumido pelos organismos cultivados ou é excretado por estes (Rodehutscord e Pfeffer, 1995; Coloso et al., 2003). Embora não seja diretamente tóxico para os organismos cultivados, o fosfato liberado nos efluentes de RAS pode também desencadear problemas de eutrofização (EPA, 1973; Coloso et al., 2003; Cao et al., 2020). Diante desse cenário, torna-se crucial explorar alternativas para a remoção eficaz desses compostos, tanto de forma biológica quanto química (Li et al., 2023).

Nesse contexto, as microalgas emergem como potenciais aliadas contra a acumulação de nutrientes no RAS (Posadas et al., 2015; Gao et al., 2016; Egloff et al., 2018; Han et al., 2019; Huang et al., 2020; Tom et al., 2021; Mahari et al., 2022; Sarkheil et al., 2022). Esses organismos unicelulares fotossintéticos, notórios por sua capacidade de converter dióxido de carbono, luz e nutrientes como nitrato e fosfato em biomassa, apresentam-se como essenciais para o tratamento biológico de águas residuais (Olaizola,

2003; Chinnasamy et al., 2010). Dentro desse contexto, as microalgas do gênero *Nannochloropsis*, reconhecida por sua alta produtividade e aplicação na aquicultura (Ma et al., 2016; Radakovits et al., 2013).

É reconhecido que as microalgas são capazes de assimilar diretamente compostos nitrogenados e fosfatados, e essa abordagem já vem sendo estudada sem a necessidade de imobilizá-las (de la Noue e de Pauw, 1988; Becker, 2004; Han et al., 2019). No entanto, a aplicação em suspensão apresenta limitações no tratamento de efluente, especialmente na retirada ou separação da biomassa de algas do efluente tratado. Ademais, a aplicação de microalgas em suspensão em sistemas de recirculação de água aumenta os riscos de contaminação (bloom) e entupimento dos poros e tubos do biofiltro (Ramli et al., 2017). Uma estratégia promissora para potencializar o papel das microalgas na remoção de nutrientes reside na imobilização desses organismos em matrizes sólidas, destacando-se o alginato como uma abordagem sustentável para aprimorar a qualidade da água e a produção aquática (Ramli et al., 2017). As microalgas imobilizadas ou aderidas oferecem mais estabilidade às células, reduzindo o vazamento de células na fase aquosa e prevenindo potencialmente contaminações e entupimentos. Biopolímeros, como o alginato, não tóxicos, transparentes e hidrofílicos, são comumente empregados (Emparan et al., 2019). A imobilização de microalgas utilizando alginato tem se mostrado eficaz na remoção de nutrientes solúveis de efluentes provenientes da aquicultura (Sarkheil et al., 2022; Ramli et al., 2017). No entanto, a utilização dessa biotecnologia em água doce ou em salinidades baixas é mais recorrente devido, principalmente, à influência da salinidade na força mecânica e na estabilidade das esferas de alginato. Motivada pela perda de afinidade do alginato na presença de cátions divalentes como o cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), utilizado como solução reticulante na preparação dos géis (Martinsen et al., 1989; Braccini e Pérez, 2001; Moreira et al., 2006; De Jesus et al., 2019). Além disso, outro fator que afeta a resistência mecânica das esferas é a presença de bactérias presentes nos RAS, pois utilizam os polímeros de alginato como fonte de carbono, reduzindo sua estabilidade e possuindo a capacidade de quebrar as ligações do alginato, resultando na degradação do gel (Cruz et al., 2013).

Assim, o presente estudo almeja preencher essa lacuna, buscando otimizar a estabilidade de esferas de alginato em água salgada para imobilização de *N. oceanica*. Além disso, visa avaliar o potencial dessas esferas na remoção de nitrato e fosfato em sistemas de recirculação de água, considerando também a influência de fatores bióticos (e.g. bactérias, microrganismos) e abióticos na estabilidade de esferas de alginato.

#### 2. Material e Métodos

#### 2.1. Cultivo de microalgas

*N. oceanica* Suda e Miyashita 2002 (Eustigmatophyceae), foi obtida da coleção do Laboratório e Produção de Microalgas do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG/Brasil). A cepa foi cultivada em meio f/2 (Guillard, 1975) preparado com água do mar natural (salinidade 28). A água do mar foi primeiro filtrada por um filtro de areia, seguido de um filtro de polipropileno de 1,0 µm e autoclavada a 121 °C e 15 PSI por 15 minutos. O inóculo foi transferido um Erlenmeyer de 125 mL, com pH inicial 8, mantido em incubadora a 23 °C, iluminação (100 µmol photons·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) e fotoperíodo controlados (12:12), até a realização do experimento.

#### 2.2. Imobilização em alginato

A preparação das esferas de alginato de sódio foram adaptadas de Emparan et al., (2019), modificando o tempo de agitação e sem autoclavar a solução de alginato. As soluções de alginato de sódio PA (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>(NaO)<sub>6</sub>)n (Dinâmica Ltda. – Indaiatuba, SP, BR) foram preparadas em agitação constante de 300 RPM em um agitador magnético, por aproximadamente 4h, em água destilada. Após completa diluição, a solução de alginato foi diluída com a cultura de *N. oceanica*, previamente concentrada por centrifugação por 10 min a 1610×g. A concentração inicial do cultivo inoculado foi de  $3,5\times10^5$  cel·mL<sup>-1</sup>. A suspensão de microalgas foi misturada com 10 mL de solução de alginato de sódio em uma proporção 1:1 (v/v). A mistura foi extrudada através de uma bureta de 20mL adaptada com uma ponteira de 200 µL, para obter esferas de 3mm, nas soluções de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) em constante agitação, visando o endurecimento das esferas. Após agitação, as esferas foram retiradas da solução de cloreto de cálcio para serem analisadas.

#### 2.3. Planejamento experimental

#### 2.3.1. Delineamento Composto Central Rotacional

Foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) empregando-se um planejamento experimental de Delineamento Composto Central Rotacional, com cinco fatores (concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio, concentração de fosfato, tempo de endurecimento e salinidade) e dois níveis (DCCR 2<sup>5</sup>), usando-se o software JMP (versão 17.2.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Os fatores e níveis do DCCR estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1: Fatores e níveis do DCCR, testando diferentes níveis de alginato, cloreto,
tempo de endurecimento, salinidade e fosfato. Legenda dos padrões: + = nível alto, - =
nível baixo, a = ponto axial inferior, $A = ponto axial superior$ , $0 = ponto central$ .

Fatores	Variáveis	Níveis				
	-	а	-	0	+	Α
Alginato (g/100mL)	$X_1$	1	1,5	2	2,5	3
Cloreto (g/100mL)	$X_2$	2	4,0	6	8,0	10
Fosfato (mg/L)	X3	0	2,5	5	7,5	10
Salinidade (g/L)	$X_4$	0	7,5	15	22,5	30
Tempo (min)	X5	10	15,0	20	25,0	30

Pelo planejamento experimental, foi definida uma matriz com 29 ensaios (veja em Material Suplementar 1, Tabela MS1), representando um experimento fatorial fracionado, sendo 16 ensaios nos níveis baixo (-) e alto (+), 10 ensaios nos pontos axiais (a, A) e, por fim, 3 ensaios nos pontos centrais (0) para determinar a variabilidade do planejamento. As respostas observadas foram a resistência e circunferência das esferas, e crescimento das microalgas, que serão definidas posteriormente. Baseado nos resultados experimentais obtidos, um modelo empírico polinomial quadrático foi ajustado para correlacionar os fatores e as respostas (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{5} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{5} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{4} \sum_{i=1}^{5} \beta_{ij} X_i X_j$$

Onde *Y* é a resposta,  $\beta_0$  é o intercepto,  $\beta_i X_i$  é o efeito linear,  $\beta_{ii} X_i^2$  é o efeito quadrático,  $\beta_{ij} X_i X_j$  é o efeito de interação entre as variáveis independentes ( $X_i \in X_j$ ).

#### 2.3.2. Experimento de otimização

Os 29 ensaios delineados pelo planejamento experimental foram conduzidos de forma simultânea, conforme detalhado no Material Suplementar 1, Tabela MS1. Este experimento foi realizado utilizando frascos de Erlenmeyer com capacidade útil de 50 mL, mantidos em agitação constante a 150 RPM em uma mesa agitadora orbital (MA140/CFT - M T MARCONI, Brasil), ao longo de um período de 14 dias, em disposição aleatória. Cada unidade experimental continha vinte esferas de alginato de sódio para possibilitar a análise, no 14º dia, das respostas de estabilidade, densidade e circunferência das esferas.

#### 2.4. Avaliação da otimização

#### 2.4.1. Análise da estabilidade das esferas

A estabilidade das esferas foi medida pela sua resistência mecânica por meio de um teste de compressão utilizando um texturômetro (Stable Microsystems, SMD TA.XP2i, United Kingdom), equipado com uma célula de carga de 5kg. Os parâmetros para essa análise seguiram a metodologia adaptada De Jesus et al., (2019). A compressão de pelo menos 10 esferas foi realizada, individualmente, até que 70% da esfera fosse deformada, a uma velocidade de compressão de 0,05 mm·s<sup>-1</sup> e aplicando uma força de gatilho de 0,020 N. A distância entre a sonda (P/0.5, diâmetro de 12,7 mm) e a placa plana foi ajustada para 10 mm. A estabilidade nesta análise foi medida de acordo com a resistência de cada esfera (em grama-força).
# 2.4.2. Análise do crescimento celular

O crescimento das microalgas dentro das esferas foi medido por análise da cor. Pelo menos 10 esferas de alginato de cada tratamento foram colocadas em uma caixa de luz, fornecendo iluminação constante e homogênea, e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital. Posteriormente, as imagens foram avaliadas pelo software ImageJ (National Institute of Health, Maryland, EUA) para determinar o crescimento médio baseado na comparação da cor das esferas. A escala de cada imagem foi ajustada com uso de uma escala milimétrica e, em seguida, as esferas foram reconhecidas pelo programa ajustando-se a configuração de limite de cor. Uma vez reconhecidas, foram medidas a área, a média, o desvio padrão e valor máximo e mínimo de cinza. A descrição detalhada de como utilizar o ImageJ para medição de crescimento encontra-se no Material Suplementar 2.

# 2.4.3. Análise de circunferência

As imagens capturadas anteriormente também foram utilizadas para analisar a circunferência das esferas. Após ajuste da escala, a imagem foi transformada para preto e branco do tipo 8 bits. Após isto, foi ajustado o limite de preto e branco para o reconhecimento das esferas pelo programa. Uma vez reconhecidas as esferas, foram medidas a área, o valor médio de cinza, e os valores de forma e diâmetro de Feret. Para isso, foi selecionada a análise de partículas e de sobreposição das partículas. A descrição detalhada de como utilizar o ImageJ para medição de tamanho consta do Material Suplementar 3.

# 2.4.4. Validação do modelo empírico polinomial quadrático

Após os processos de otimização, foi realizada a validação conjunta do modelo empírico polinomial quadrático. Para isto, foi empregado o índice de desejabilidade, ou seja, a combinação das variáveis significativas que gera a melhor resposta global. A validação foi realizada seguindo a mesma metodologia do experimento de otimização (Item 2.3.2), porém, apenas a melhor combinação de fatores foi testada. O modelo é considerado validado se a resposta global obtida estiver dentro do intervalo de confiança do modelo.

# 2.5. Caracterização do efluente

O efluente utilizado neste trabalho foi coletado de um tanque de recirculação da Estação Marinha de Aquicultura (EMA – FURG) são cultivados os reprodutores de miragaia (*Pogonias courbina*). O tanque de recirculação tem uma capacidade de 12.000 L e utiliza água natural do mar com as seguintes características de temperatura = 26,49 ± 0,59 °C, pH = 7,69 ± 0,11, oxigênio dissolvido = 5,3 ± 0,62, e salinidade = 35,9 ± 1,35 g.L<sup>-1</sup>.

### 2.6. Remoção de nutrientes do efluente

Para o monitoramento da remoção de nitrato e fosfato, foi realizada a coleta de 2mL de cultivo a cada 48h. As amostras dos cultivos foram filtradas em microfiltro de fibra de vidro (Nuclepore, 28 mm de diâmetro e retenção de partículas de até 0,6  $\mu$ m) e o filtrado foi utilizado para determinação das concentrações de nitrato (N<sup>-</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e Fosfato (P<sup>-</sup>PO<sub>4</sub> <sup>-</sup> <sup>3</sup>), seguindo a metodologia de Strickland e Parsons (1972).

# 2.7. Assimilação de nutrientes

Após o processo de otimização, um experimento de assimilação de nutrientes seguindo as mesmas condições foi realizado. Em unidades experimentais com volume útil de 50mL foram adicionadas 20 esferas de alginato feitas de acordo com o resultado encontrado no experimento de otimização. Nesse experimento foram comparados o crescimento e a eficiência das esferas de alginato contendo microalgas, quando comparadas com células livres de microalgas, na remoção de nutrientes. A montagem do experimento de assimilação foi conduzindo com microalgas livres e imobilizadas, em efluente ou em meio f/2, e esferas de alginato sem microalgas foram usadas como controle (Tabela 2). Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas. A concentração inicial do cultivo inoculado foi de  $3,5 \times 10^5$  cel·mL<sup>-1</sup>. Para as análises de remoção de nutrientes foram coletados, a cada 48h, 1 ml de cada unidade experimental e filtrados através de um filtro de seringa adaptado com microfiltro de fibra de vidro (Nuclepore, 28 mm de diâmetro e retenção de partículas de até 0,6 µm) para análise de nitrato e fosfato.

Tratamentos	Descrição				
T1	Esferas em branco em efluente				
T2	Microalga imobilizada em efluente				
Τ3	Microalga livre em efluente				
T4	Microalga imobilizada em f/2				
Τ5	Microalga livre em f/2				

Tabela 2: Tratamentos do experimento de assimilação

#### 2.8. Determinação da taxa de crescimento celular da microalga

Para os tratamentos com microalgas livres, alíquotas de 2 mL foram coletas e fixadas com formol (100  $\mu$ L) para realização da contagem celular. Para os tratamentos com microalgas imobilizadas, adaptamos a metodologia descrita por Murujew et al. (2021), onde para cada esfera foram adicionados 300  $\mu$ L de citrato de sódio (solução 0,5 M) em tubos de Eppendorf que foram, posteriormente, concentrados por centrifugação durante 5 min a 1610×g (Rondo, CR-1512 – CAPP) e resuspendidas com 100  $\mu$ L de formol 4% (v/v). A contagem de células foi realizada em microscópio óptico (objetiva × 40) em câmara de Neubauer.

## 2.9. Experimento de banho de reforço

Nesta etapa, foram refeitos os experimentos de otimização das esferas e o de assimilação dos nutrientes, para avaliar a eficiência do banho de reforço na estabilidade das esferas, adicionando dessa vez banhos de CaCl<sub>2</sub> a cada cinco dias. Em unidades experimentais de 50mL, foram adicionadas vinte esferas de alginato feitas de acordo com o resultado encontrado no experimento de otimização. Elas foram retiradas do meio e expostas ao banho de CaCl<sub>2</sub> (6%) por vinte minutos, depois eram devolvidas a mesa agitadora em seus respectivos meios. O experimento teve duração de 14 dias e ao final, foram realizadas análises de resistência, crescimento celular e circunferência.

# 2.10. Presença de bactérias

Para avaliar a influência de fatores bióticos, comunidades bacterianas, na estabilidade das esferas no efluente do RAS, foi analisado o efeito da autoclavagem nos meios onde as esferas foram colocadas. O experimento consistiu em três tratamentos: um efluente

sintético filtrado e autoclavado (ES); um efluente natural filtrado e autoclavado (EA); e um efluente natural apenas filtrado (EF). Em unidades experimentais de 50 mL foram adicionadas vinte esferas de alginato, sem microalga, seguindo os mesmos critérios do experimento de otimização. Todos os tratamentos foram feitos em triplicatas e o experimento foi iniciado com 3,6 mg/L de fosfato. Os tratamentos foram expostos às mesmas condições dos experimentos anteriores durante quatro dias. A medição de tamanho foi realizada utilizando o software ImageJ (Item 2.4.2).

# 2.10.1. Contagem celular de bactérias

Amostras de 20mL foram fixadas em solução de formalina 4% (concentração final) e mantidas em tubos de centrifugação. Para a determinação da abundância de bactérias, as amostras fixadas foram filtradas em membranas de policarbonato (Nuclepore, 25 mm e diâmetro do poro de 0,2 μm) previamente escurecidas com Irgalan Black e coradas com 1% de solução de laranja de acridina a uma concentração de 1 μg·mL<sup>-1</sup> (Hobbie et al., 1977). As bactérias foram fotografadas usando uma câmera acoplada a um microscópio Axioplan-Zeiss de epifluorescência, com uma ampliação final de 1000×, para contagem posterior de 20 campos aleatórios. As bactérias foram classificadas em cocos, bacilos e filamentos.

# 2.11. Análise estatística

Os resultados do experimento de otimização, isto é, os efeitos dos fatores e suas interações, foram analisados através da ANOVA, com nível de significância de 5%, com a foi utilização do software JMP versão 17.2.0. Os demais experimentos foram analisados por teste t de Student ou por ANOVA, ambos com nível de significância de 5%, seguido

de teste *post hoc* de Tukey utilizando o software Prism versão 7.0e (GraphPad Software Inc., Boston, MA, EUA).

# 3. Resultados

# 3.1. Otimização das esferas e validação do modelo

Na Tabela 3 estão apresentados os efeitos principais, as interações de duas vias e os termos quadráticos considerados significativos ( $\alpha = 0,05$ ) para construção do modelo de superfície de resposta. Os efeitos principais de cloreto e da salinidade foram considerados significativos, assim como os seus termos quadráticos. Apesar do alginato não ter sido considerado significativo (P=0,08217), foi mantido para a construção do modelo devido ao efeito da hereditariedade, que recomenda que termos de ordem inferior (efeitos principais) sejam mantidos se termos de ordem superior (interações ou termos quadráticos) forem significativos. O termo quadrático do alginato foi considerado e a sua interação com cloreto foram considerados significativos (P < 0,003). Por fim, os fatores concentração de fosfato e tempo de endurecimento não foram considerados significativos (P > 0,05) e, como não possuíam termos de ordem superior, foram excluídos do modelo.

Tabela 3: Sumário dos efeitos significativos para construção do modelo de superfície de resposta.

Termos	Valor P
Cloreto	0,00042
Alginato × Alginato	0.00060
6 6	,
	0.00072
Salinidade × Salinidade	0,00073
Salinidade	0,00171

Alginato $\times$ Cloreto	0,00363
Cloreto × Cloreto	0,00638
Alginato	0,08217

A análise de variância demonstrou que o modelo para a resposta resistência foi significativo (P = 0,0053). De acordo com o modelo empírico obtido para resistência, alginato ( $X_1$ ) e cloreto ( $X_2$ ) apresentaram efeitos positivos, assim como sua interação ( $X_1X_2$ ), enquanto salinidade ( $X_4$ ) apresentou efeito negativo (Equação 2).

$$Y = 12,16 + 8,70 \times X_1 + 5,10 \times X_2 - 27,46 \times X_4 + 8,78 \times X_1X_2 - 6,09 \times X_1^2 - 9,45 \times X_2^2 + 65,86 \times X_4^2$$

A Figura 1A apresenta a interação entre as concentrações de alginato e cloreto sobre a resposta resistência. Percebe-se que a resistência das esferas de alginato possui uma relação direta com as concentrações de alginato e cloreto empregadas.



Figura 1: Superfícies da interação entre alginato × cloreto para as respostas resistência(A), circunferência (B) e crescimento das microalgas (C).

Para a resposta circunferência, a análise de variância demonstrou que o modelo também foi significativo (P = 0,0159). Pelo modelo empírico obtido, observa-se que alginato ( $X_1$ ) e salinidade ( $X_4$ ) apresentaram efeitos positivos, assim como a interação entre alginato e cloreto ( $X_1X_2$ ), enquanto cloreto ( $X_2$ ) apresentou efeito negativo (Equação 3).

$$Y = 0,90 + 0,0023 \times X_1 - 0,002 \times X_2 + 0,00083 \times X_4 + 0,0055 \times X_1X_2 - 0,017 \times X_1^2 + 0,004 \times X_2^2 + 0,002 \times X_4^2$$

A Figura 1B apresenta a interação entre as concentrações de alginato e cloreto sobre a resposta circunferência. Percebe-se que a circunferência das esferas de alginato possui um máximo de resposta com uma concentração de alginato em torno de 2 g·100mL<sup>-1</sup>. Para a concentração de cloreto, percebe-se que concentrações menores são mais eficientes.

Para a resposta crescimento, a análise de variância demonstrou que o modelo foi altamente significativo (P < 0,0001). Pelo modelo empírico, observa-se que alginato ( $X_1$ ), cloreto ( $X_2$ ) e salinidade ( $X_4$ ) apresentaram efeitos negativos, enquanto a interação entre alginato e cloreto ( $X_1X_2$ ) foi positiva (Equação 4).

 $Y = 73,43 - 2,011 \times X_1 - 4,605 \times X_2 - 3,956 \times X_4 + 8,834 \times X_1X_2 + 2,366 \times X_1X_1 + 6,304 \times X_2^2 + 2,348 \times X_4^2$ 

A Figura 1C apresenta a interação entre as concentrações de alginato e de cloreto sobre a resposta crescimento. Percebe-se que o crescimento das microalgas nas esferas de alginato possui uma relação inversa com ambas as concentrações.

Como os comportamentos das respostas divergiram quanto aos níveis ótimos dos fatores, fez-se necessária à sua otimização conjunta, empregando-se para isso o índice de desejabilidade (Figura 2). De acordo com a análise, a resposta global média capaz de ser obtida é de 51,2 ± 34,1 gramas-força de resistência, 0,903 ±0,008 de circunferência e 71,1 ± 4,25 de cinza (i.e. crescimento) para a combinação de 2 g·100mL<sup>-1</sup> de alginato, 7 g·100mL<sup>-1</sup> de cloreto e 30 g·L<sup>-1</sup> de salinidade (Tabela 5). Para a validação do modelo empírico, os fatores concentração de fosfato e tempo de endurecimento foram mantidos nos seus valores do ponto central, 5 mg·L<sup>-1</sup> e 20 minutos, respectivamente (Tabela 1). De uma fora geral, o modelo empírico não foi validado, pois os valores observados de resistência e de crescimento estiveram fora do intervalo de confiança predito, sendo 12,7 gramas-força e 61,0 de cinza, respectivamente. Apenas o valor observado de circunferência coincidiu com o predito (0,903).



Figura 2: Análise de desejabilidade dos fatores concentração de alginato, cloreto e salinidade.

# 3.2. Assimilação de nutrientes

A Figura 3 apresenta os resultados para a assimilação de nitrato, para microalgas imobilizadas e livres, tanto em efluente quanto em meio f/2. As concentrações iniciais de nitrato entre os tratamentos com efluente e com meio f/2 foram estatisticamente diferentes (P < 0,0001), sendo 55 mg·L<sup>-1</sup> e 75 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente. De uma forma geral, observam-se dois grupos estatisticamente distintos (P < 0,003) ao longo do experimento. Curiosamente, os tratamentos em efluente não apresentaram diferença estatística entre si, independente da presença de microalgas ou de esferas, atingindo uma assimilação média de 45% do nitrato inicial após nove dias. Já os tratamentos em meio f/2, também não apresentaram diferença estatística entre si, porém, apresentaram uma assimilação média de nitrato superior ao dos tratamentos em efluente, de cerca de 81%.



Figura 3: Resultado da ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) para a assimilação de nitrato. (T1) Esferas em branco em efluente, (T2) Microalga imobilizada em efluente, (T3) Microalga livre em efluente, (T4) Microalga imobilizada em f/2 e (T5) Microalga livre em f/2.

A Figura 4 apresenta os resultados para a assimilação de fosfato, para microalgas imobilizadas e livres, tanto em efluente quanto em meio f/2. Assim como no nitrato, as concentrações iniciais de fosfato diferiram entre efluente e meio f/2 (P < 0,0001). Porém, o comportamento do fosfato apresentou variações ao longo do experimento. Curiosamente, no efluente, as concentrações de fosfato aumentaram no fim do experimento, atingindo concentrações superiores à inicial, sendo 104% no tratamento T1, 118% no tratamento T2 e 139% no tratamento T3, porém, não apresentaram diferença estatística entre si. Ao contrário, no meio f/2, as concentrações de fosfato após nove dias foram consideravelmente menores, de cerca de 58%.



Figura 4: Resultado da ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) para a assimilação de fosfato. (T1) Esferas em branco em efluente, (T2) Microalga imobilizada em efluente, (T3) Microalga livre em efluente, (T4) Microalga imobilizada em f/2 e (T5) Microalga livre em f/2.

O crescimento das microalgas nos diferentes tratamentos está apresentado na Figura 5. Todos os tratamentos apresentaram crescimento, em relação ao inóculo, porém o tratamento T4 foi o que apresentou maior crescimento (P < 0,003), com uma média de  $8,4\times10^6 \pm 2,7\times10^6$  células·mL<sup>-1</sup>. Os tratamentos T2, T3 e T5 não diferiram entre si, apresentando um crescimento médio de  $2,2\times10^6 \pm 5,7\times10^5$  células·mL<sup>-1</sup>.



Figura 5: Resultado da ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) para crescimento das microalgas. (T2) Microalga imobilizada em efluente, (T3) Microalga livre em efluente, (T4) Microalga imobilizada em f/2 e (T5) Microalga livre em f/2.

Em comparação com o resultado da validação, as esferas tiveram uma resistência significativamente inferior (P < 0,0001), caindo de 12,72 gramas-força para 5,37 gramas-força, apresentando apenas 42% da resistência medida anteriormente.

# 3.3. Efeito do banho de reforço

O banho permitiu um aumento de 27% na resistência das esferas (P = 0,017). Porém, o aumento na resistência resultou num efeito negativo no crescimento (P < 0,0001), com

uma diminuição de 6%. Em contraste com o experimento de assimilação de nutrientes, as esferas do experimento que receberam banho não resistiram e se dissolveram, quase totalmente. Apesar disto, o comportamento de assimilação de nutrientes foi semelhante entre os dois experimentos (Figura 6). Os tratamentos em efluente reduziram nitrato em 44%, enquanto o tratamento em meio f/2 reduziu em 86%. Da mesma forma, para o fosfato, os tratamentos em efluente tiveram uma produção de cerca de 23% de fosfato, enquanto o tratamento em meio f/2 consumiu 65% (Figura 7). Em comparação com o crescimento, o tratamento em efluente (T2,  $3,0\times10^6 \pm 6,2\times10^5$  células·mL<sup>-1</sup>) foi estatisticamente inferior (P = 0,03) ao tratamento em meio f/2 (T4,  $6,8\times10^6 \pm 1,9\times10^6$  células·mL<sup>-1</sup>).



Figura 6: Resultado da ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) para a assimilação de nitrato com banho de NaCl. (T1) Esferas em branco em efluente, (T2) Microalga imobilizada em efluente e (T4) Microalga imobilizada em f/2.



Figura 7: Resultado da ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) para a assimilação de fosfato com banho de NaCl. (T1) Esferas em branco em efluente, (T2) Microalga imobilizada em efluente e (T4) Microalga imobilizada em f/2.

# 3.4. Efeito da presença de bactérias

A Figura 8 apresenta as concentrações dos diversos morfotipos de bactérias encontradas nos tratamentos. A concentração de bactérias cocóides não apresentou diferença (P = 0,6) entre os tratamentos, com uma média de  $9,4\times10^3 \pm 3,9\times10^6$  células·µL<sup>-1</sup> (Figura 1A). Bacilos foi o morfotipo mais abundante (Figura 1B), sendo que o tratamento EF apresentou a maior concentração  $(2,8\times10^4 \pm 8,6\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , sendo estatisticamente diferente (P < 0,03) dos tratamentos EA  $(1,2\times10^4 \pm 5,5\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$  e ES  $(3,3\times10^3 \pm 2,2\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre si. As bactérias filamentosas foram o morfotipo menos abundante, sendo que o tratamento EF apresentou a maior concentração  $(5,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , sendo estatisticamente diferente (P < 0,005) dos tratamentos EA  $(1,6\times10^3 \pm 7,7\times10^2 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$  e ES  $(1,4\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre si. O presentou a maior concentração (2,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1}) e ES  $(1,4\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre diferente (P < 0,005) dos tratamentos EA  $(1,6\times10^3 \pm 7,7\times10^2 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$  e ES  $(1,4\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre SI (1,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})) e ES  $(1,4\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre SI (1,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})) e ES  $(1,4\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre SI (1,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})) e ES  $(1,4\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre SI (1,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})) e ES  $(1,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre SI (1,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})) e ES  $(1,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , que não diferiram entre SI (1,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})

densidade bacteriana (4,5×10<sup>4</sup> ± 1,0×10<sup>4</sup> células· $\mu$ L<sup>-1</sup>), estatisticamente superior (P < 0,048) aos tratamentos EA (2,1×10<sup>4</sup> ± 1,1×10<sup>4</sup> células· $\mu$ L<sup>-1</sup>) e ES (1,4×10<sup>4</sup> ± 7,8×10<sup>3</sup> células· $\mu$ L<sup>-1</sup>) que, novamente, não diferiram entre si.



Figura 8: Resultado da ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) para a contagem de bactérias. (EF) Efluente natural apenas filtrado, (EA) Efluente natural filtrado e autoclavado e (ES) Efluente sintético filtrado e autoclavado.

Quanto ao tamanho das esferas, os resultados variaram de acordo com os tratamentos. O tratamento ES apresentou esferas com cerca de  $3,28 \pm ,13$  mm de diâmetro, sendo estatisticamente maiores (P < 0,0001) que as esferas do tratamento EA, que tinham 2,52  $\pm 0,21$  mm de diâmetro, enquanto todas as esferas do tratamento EF se dissolveram. A assimilação de fosfato apresentou o mesmo comportamento, onde o tratamento ES foi

mais eficiente (P < 0,43), removendo 74% do fosfato. Os tratamentos EA e EF removeram, respectivamente, 53% e 35%, porém não apresentaram diferença estatística.

### 4. Discussão

### 4.1. Otimização das esferas e validação do modelo

O experimento de otimização testou a influência de cinco fatores (concentração de alginato de sódio, de cloreto de cálcio, de fosfato, tempo de endurecimento e salinidade) na resistência e circunferência das esferas, e no crescimento das microalgas. As concentrações mais elevadas de alginato (2,5% e 3%) dificultaram o gotejamento e a sua produção, resultando em esferas mais achatadas. Estes resultados corroboram com resultados previamente reportados por De Jesus et al. (2019) e Damayanti et al. (2021). A circunferência das esferas na imobilização celular, quando o objetivo é a remoção de poluentes, tem um efeito evidente em sua estabilidade mecânica e química, uma vez que regula a velocidade de difusão, ou seja, quanto menor o tamanho das esferas, mais elevada a eficiência do processo (De Jesus et al., 2019).

As concentrações de fosfato utilizadas foram significativamente altas em relação ao que pode ser encontrado em RAS, no entanto, não tiveram efeitos significativos em nenhuma das respostas avaliadas. Ao longo do experimento, as 20 esferas estiveram imersas em 50mL de água marinha, contendo 5 mg/L de fosfato e salinidade 30 e, ao final do experimento, a recuperação das esferas foi de 100%. Apesar disso, os resultados encontrados foram inferiores aos preditos pelo modelo, possivelmente devido à presença de outras propriedades químicas que afetam a estabilidade das esferas. Ainda que o

fosfato seja um fator que pode desestabilizar as esferas, Tam e Wong (2000) demonstraram que concentrações abaixo de 6 mg  $L^{-1}$  não afetam a estabilidade química.

A maior durabilidade e resistência para matrizes reticuladas foi com a concentração de 6% de CaCl<sub>2</sub>, não afetando o crescimento celular das microalgas. De acordo com Cabrita et al. (2013), as esferas produzidas com concentrações superiores a 5% (p/v) de CaCl<sub>2</sub> são mais resistentes à salinidade e suportam melhor a agitação mecânica. Em relação ao crescimento celular, os resultados obtidos demonstraram uma performance inferior àquela prevista pelo modelo predito (61,0), possivelmente atribuível à difusão de nutrientes para o interior da esfera. Cabrita et al. (2013) monitoraram o crescimento de Phaeodactylum tricornutum imobilizada em esferas de alginato em águas estuarinas (salinidade 27). Os autores concluíram que géis espessos, reticulados com concentrações de CaCl<sub>2</sub> acima de 4% (p/v), tinham alta resistência a difusão, contribuindo para dificultar a substituição de  $Ca^{2+}$  pelo Na<sup>+</sup> presente na água, ocasionando na diminuição da perda de estabilidade das esferas. Esses resultados são similares aos encontrados por De Jesus et al. (2019), onde observou-se uma melhoria significativa no crescimento celular da microalga Desmodesmus subspicatus ao reticular as esferas com concentrações superiores a 5% de CaCl<sub>2</sub>. Os autores explicam que quanto menor a concentração de agente reticulante utilizada, maior a porosidade da matriz de alginato, facilitando a difusão de nutrientes e consequentemente desestabilizando o polímero. Esses resultados corroboram e reforçam as respostas observadas em relação ao crescimento celular no presente trabalho.

# 4.2. Assimilação de nutrientes

O experimento de assimilação de nutrientes, embora não tenha sustentado as esferas que estavam em efluente por mais de 72h, obteve resultados positivos. Os tratamentos que continham esferas em meio f/2 (T4; T5) apresentaram resultados melhores em termos de assimilação de nutrientes e durabilidade que os tratamentos mantidos no efluente de RAS (T2; T3), em virtude da dissolução completa das esferas, como dito anteriormente. No entanto, em ambos os casos, a assimilação foi positiva. Esse desempenho positivo pode ser explicado pelo crescimento de *N. oceanica* nos tratamentos que continham células imobilizadas. Contudo, no efluente a presença da microalga não teve diferença significativa.

O aumento nas concentrações de fosfato nos tratamentos com efluente pode estar relacionado à influência de microrganismos presentes no meio, não havendo consumo do fosfato devido à falta de adaptação das microalgas ao efluente. Estudos indicam que as microalgas acumulam ortofosfato na forma de polifosfatos e esse mecanismo é aumentado quando as células são privadas de nutrientes (De-Bashan et al., 2002; Kaplan et al., 2017). A cultura centrifugada para a imobilização no experimento não estava privada de nutrientes antes da imersão nos respectivos meios, portanto, é possível que as células possam acumular mais fosfato do que o apresentado no presente estudo, o que foi inviabilizado por fatores bióticos. Ainda assim, houve a redução, em meio f/2, de 58% do valor inicial em nove dias, valor próximo ao encontrado por Sarkheil et al. (2022) utilizando outra microalga verde (*Scenedesmus quadricauda*) que removeu 61% de fosfato de águas residuais artificiais em seis dias de experimento.

O maior crescimento celular observado no tratamento com microalga imobilizada em f/2comparado aos demais tratamentos podem ser explicado pode ser explicado pela maior eficiência de culturas imobilizadas na remoção de nutrientes quando comparada as células livres, como já foi demonstrado por Soo (2017). Contudo, as microalgas utilizadas neste trabalho já estavam aclimatadas no meio f/2, talvez seja necessário, a melhor aclimatação da microalga ao efluente. Segundo Emparan et al. (2019), Nannochloropsis sp. imobilizadas apresentam melhor atividade catalítica, viabilidade e taxa de crescimento do que os tratamentos com células livres. Esses reforçam as respostas de crescimento realizadas no presente trabalho. Foi observado, uma possível influência do efluente no crescimento celular, aumentando consequentemente a concentração de fosfato. O valor de referência para o crescimento em f/2 não foi atingido, indicando haver um desafio significativo nesse aspecto. O ideal seria que a cultura crescesse tão bem no efluente quanto em condições padrão, mas infelizmente isso não está acontecendo. É recomendável, para trabalhos futuros, a implementação de um tratamento prévio do efluente e mais tempo de aclimação das microalgas em efluente, antes de prosseguir para as próximas etapas do processo com as esferas. Essa abordagem pode contribuir para a diminuição dos efeitos inibitórios que observamos no crescimento.

A diminuição da resistência das esferas, quando em comparação ao resultado de validação, por ter sido ocasionada devido à presença de microrganismos naturalmente presentes em RAS. Durante bastante tempo, a literatura predominante argumentou que a degradação das esferas de alginato em certas aplicações, como o tratamento de efluentes, e a subsequente liberação dos microrganismos imobilizados, que diminui a eficácia do processo, são causadas pela dissolução química das esferas (Cruz et al., 2013).

Covarrubias et al. (2011) descreve duas situações em que um agente de biotratamento é introduzido em águas residuais: (i) no melhor cenário ele enfrenta competição com a população bacteriana local, e (ii) no pior cenário, acaba atuando como uma fonte adicional de nutrientes para essa microfauna predatória, diminuindo em ambos os casos a eficácia do biofiltro. Os resultados apresentados por Cruz et al. (2013) corroboram os resultados obtidos nesse estudo, uma vez que em seus experimentos não houve degradação quando as águas residuais foram autoclavadas.

A partir dessas observações, é possível propor algumas maneiras de como esses resultados poderiam contribuir para a sustentabilidade e eficiência dos sistemas de aquicultura em recirculação. Primeiramente, o uso de esferas imobilizadas em meio f/2 demonstrou uma maior capacidade de assimilação de nutrientes em comparação com as células livres, sugerindo que essa abordagem pode ser mais eficiente na remoção de nutrientes de efluentes aquáticos. Portanto, a implementação de esferas imobilizadas em sistemas de aquicultura em recirculação pode melhorar a qualidade da água ao remover eficientemente nutrientes indesejados, contribuindo para a sustentabilidade desses sistemas.

### 4.3. Experimento de banho

Até o momento, este estudo foi pioneiro ao propor a recuperação das esferas após a exposição, com o intuito de reforçar o banho de CaCl<sub>2</sub>. A resposta desse experimento foi positiva, apesar de ter efeito negativo no crescimento. O que pode indicar que o aumento da resistência dificultou a difusão de nutrientes para dentro das esferas, ocasionando a redução do crescimento. Para futuras pesquisas, recomenda-se ajustes na metodologia, como possivelmente diminuir o intervalo de tempo entre os banhos de reforço.

# 4.4. Experimento de bactérias

Nos resultados obtidos, foram encontrados diversos morfotipos de bactérias, entre eles os principais foram: bactérias cocóides  $(9,4\times10^3 \pm 3.9\times10^6 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ , bactérias filamentosas  $(5,6\times10^3 \pm 1,1\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$  e bacilos  $(2,8\times10^4 \pm 8,6\times10^3 \text{ células}\cdot\mu\text{L}^{-1})$ <sup>1</sup>). O morfotipo predominante foi o de bacilos, com maior concentração no tratamento com efluente natural não autoclavado. Esse tratamento apresentou as maiores concentrações de morfotipos em relação aos outros dois tratamentos, validando a hipótese de que o processo de autoclavagem era o que diferenciava a durabilidade dos tratamentos. A desintegração das esferas de alginato está ligada a presença de populações microbianas no efluente natural, uma vez que quando realizado o processo de autoclavagem dos tratamentos, como evidenciado pelo fato de que apenas as esferas imersas em efluente natural não autoclavado se desintegraram completamente em 72 horas. O autor Covarrubias et al. (2011) identificou nove cepas de bactérias potencialmente degradadoras de alginato, membros do gênero Acinetobacter, naturalmente presentes em águas residuárias. As bactérias pertencentes a esse gênero podem ser da classe dos bacilos ou cocobacilos, o que corrobora com os morfotipos encontrados nesta pesquisa. De acordo com Tang et al. (2009) a degradação de alginato, em especial o polimerizado, é dificultada pela complexidade da molécula. No entanto, segundo Cruz et al. (2013), essas bactérias têm capacidade de degradar os blocos de construção do polímero por meio de suas enzimas quando o crescimento principal de sua população é sustentado por outras fontes de carbono. Os autores ainda relatam que mesmo que por um período curto de observação (96 horas), todas as cepas bacterianas sobreviveram e mantiveram suas populações, o que não poderiam fazer sem a ocorrência de monômeros de alginato. Em relação à presença de bactérias nos tratamentos com efluentes não tratados, é plausível que as esferas de microalgas possam exercer um efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano. Este fenômeno pode ser atribuído à possível liberação de substâncias antibacterianas por certas espécies de microalgas ou à competição por nutrientes, onde as microalgas podem consumir nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano. Embora não tenham sido realizados testes específicos para investigar esses efeitos, é uma consideração pertinente para ser explorada em futuras pesquisas.

# 4.5. Implicações práticas na Aquicultura

Além dos resultados que evidenciam a eficácia na remoção de nutrientes no tanque de recirculação, as esferas de alginato contendo microalgas apresentam diversas vantagens em sua aplicabilidade na aquicultura e sustentabilidade. A imobilização das microalgas dentro das esferas facilita sua remoção, pois não estão dispersas livremente no tanque, tornando o processo mais simples, podendo ser realizado facilmente com o auxílio de uma peneira. Isso reduz os custos associados à remoção das microalgas do tanque, uma vez que, se estivessem livres, seria necessário filtrar todo o volume do tanque. Além disso, essa abordagem é mais econômica, pois permite a remoção dos nutrientes de forma biológica, sem a necessidade de investimentos em grandes maquinários, estruturas ou reagentes químicos, que poderiam comprometer a saúde dos organismos cultivados no sistema de recirculação. Por fim, essa técnica viabiliza a realização de estudos futuros sobre a reutilização dessa biomassa, como por exemplo, sua utilização na alimentação do zooplâncton que será incorporado ao cultivo, fechando assim o ciclo de utilização desse bioproduto. Contudo, a presença de comunidades microbianas no efluente pode ser um fator negativo sobre a resistência e durabilidade das esferas de alginato. Sugere-se para futuras pesquisas investigar a diversidade e atividade das cepas bacterianas degradadoras de alginato em diferentes condições de efluente, bem como explorar estratégias para mitigar o impacto dessas bactérias na estabilidade das esferas de alginato.

# 5. Conclusão

O alginato de sódio como biopolímero na produção de esferas para a imobilização de Nannochloropsis oceanica se mostrou mais adequado na faixa de concentração de 2%, resultando em matrizes mais uniformes. A perspectiva da produção de esferas seguida de banhos reforço de CaCl<sub>2</sub> é promissora, no entanto, recomenda-se o refinamento da metodologia células microalgas imobilizadas adotada. As de cresceram consideravelmente nas esferas e tiveram resultados promissores na remoção de nutrientes quando comparadas às células livres. Microrganismos naturalmente presentes em efluentes de RAS, como as bactérias degradadoras de alginato, podem afetar negativamente a estabilidade das esferas.

# 6. Agradecimentos

Agradecemos imensamente a Dra. Camila Martins por disponibilizar os equipamentos utilizados na realização dos experimentos. Ao técnico Sandro Fabres pelo auxílio nas análises de leitura de nitrato e fosfato. Agradecemos também à M.Sc. Sheron Medeiros pela ajuda na montagem e realização dos experimentos. Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores também expressam gratidão pelos recursos fornecidos pela CAPES em apoio ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da FURG.

# 7. Referências

Ahmed, N., Thompson, S., Glaser, M., 2019. Global Aquaculture Productivity, Environmental Sustainability, and Climate Change Adaptability. *Environmental Management*, 63:159–172. <u>https://doi.org/10.1007/s00267-018-1117-3</u>

Ahmed, N., Turchini, G.M., 2021. Recirculating aquaculture systems (RAS): Environmental solution and climate change adaptation. *Journal of Cleaner production*, 297, 126604.

Ahn, Y. H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. Process Biochemistry, v.41, n.8, p.1709–1721. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.033

Becker, W., 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. *Amos Richmond*, 312-351. https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch18

Bueno, P.B., Soto, D., 2017. Adaptation Strategies of the Aquaculture Sector to the Impacts of Climate Change, vol. 1142. FAO *Fisheries and Aquaculture Circular* No., Rome.

Braccini, I., Pérez, S., 2001. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089-1096. https://doi.org/10.1021/bm010008g

Cabrita, M.T., Raimundo, J., Pereira, P., Vale, C., 2013. Optimizing alginate beads for the immobilisation of *Phaeodactylum tricornutum* in estuarine waters. *Marine environmental research*, 87, 37-43.

Cao, B., Abakari, G., Luo, G., Tan, H., Xia, W., 2020. Comparative analysis of nitrogen and phosphorus budgets in a bioflocs aquaculture system and recirculation aquaculture system during over-wintering of tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). Aquacultural Engineering, 89:102026. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102026.

Chen, M., Chen, Y., Dong, S., Lan, S., Zhou, H., Tan, Z., Li, X., 2018. Mixed nitrifyingbacteria culture under different temperature dropping strategies: Nitrification performance, activity, and community. *Chemosphere*, 195:800-809. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.129

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 (9), 3097-3105. <u>https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.026</u>.

Cruz, I., Bashan, Y., Hernàndez-Carmona, G., De-Bashan, L.E., 2013. Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 9847-9858.

Coloso, R.M., King, K., Fletcher, J.W., Hendrix, M.A., Subramanyam, M., Weis, P., Ferraris, R.P., 2003. Phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed practical diets and its consequences on effluent phosphorus levels. *Aquaculture*, 220(1-4), 801-820. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00403-9

Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M., Bashan, Y., 2012 Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:2669–2680

Damayanti, A.C.K.A., Kumoro, A.C., Bahlawan, Z.A.S., 2021. Review calcium alginate beads as immobilizing matrix of functional cells: extrusion dripping method, characteristics, and application. In: IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*, Vol. 1053, No. 1, p. 012017.

De-Bashan, L.E., Moreno, M., Hernandez, J.P., Bashan, Y., 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water research*, 36(12), 2941-2948. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00522-X

de Jesus, G.C., Bastos, R.G., da Silva, M.A., 2019. Production and characterization of alginate beads for growth of immobilized *Desmodesmus subspicatus* and its potential to remove potassium, carbon and nitrogen from sugarcane vinasse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101438. <u>https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101438</u> de la Noue, J., de Pauw, N., 1988. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology advances*, 6(4),725-770. https://doi.org/10.1016/0734-9750(88)91921-0

Diaz, R. J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321(5891), 926-929.

Dortch, Q., 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Marine ecology progress series*, 61(1), 183-201.

Ebeling, J.M., Timmons, M.B., 2012. Recirculating aquaculture systems. *Aquaculture production systems*, 245-277. https://doi.org/10.1002/9781118250105.ch11

Egloff, S., Tschudi, F., Schmautz, Z., Refardt, D., 2018. High-density cultivation of microalgae continuously fed with unfiltered water from a recirculating aquaculture system. *Algal Research*, 34, 68-74. <u>https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.004</u>

Emparan, Q., Harun, R., Jye, Y.S., 2019. Phycoremediation of treated palm oil mill effluent (TPOME) using *Nannochloropsis* sp. cells immobilized in the biological sodium

alginate beads: effect of POME concentration. *BioResources* 14 (4), 9429-9443. https://doi.org/10.15376/biores.14.4.9429-9443

Environmental Protection Agency (EPA), 1973. Pollution as a result of fish culture activities. USAEP, EPA-R3-73-009, Washington, DC.

FAO., 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. *Towards Blue Transformation*. Rome. <u>https://doi.org/10.4060/cc0461en</u>

Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vörösmarty, C.J., 2004. Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry*, *70*(2), 153-226. <u>https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0</u>

Gao, F., Li, C., Yang, Z.H., Zeng, G.M., Feng, L.J., Liu, J.Z., Liu, M., Cai, H.W., 2016. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecological engineering*, 92, 55-61. <u>https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.03.046</u>

Guillard, R. L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animal*, p.29–60.

Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural engineering*, 18(4), 223-244. <u>https://doi.org/10.1016/S0144-</u>8609(98)00032-6

Han, P., Lu, Q., Fan, L., Zhou, W., 2019. A review on the use of microalgae for sustainable aquaculture. *Applied Sciences*, 9(11), 2377. <u>https://doi.org/10.3390/app9112377</u>

Hii, Y.S., Soo, C.L., Chuah, T.S., Mohd-Azmi, A., Abol-Munafi, A.B., 2011. Interactive effect of ammonia and nitrate on the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp. *Journal of Sustainability Science and Management*, 6(1):60-68.

Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology*, *33*(5), 1225-1228. https://doi.org/10.1128/aem.33.5.1225-1228.1977

Huang, X., Guida, S., Jefferson, B., Soares, A., 2020. Economic evaluation of ionexchange processes for nutrient removal and recovery from municipal wastewater. *NPJ Clean Water*, 3(1), 7. <u>https://doi.org/10.1038/s41545-020-0054-x</u>

Isaza, D.F.G., Cramp, R.L., Franklin, C.E., 2020. Living in polluted waters: A metaanalysis of the effects of nitrate and interactions with other environmental stressors on freshwater taxa. *Environmental Pollution*, 261, 114091.

Kaplan, D., Richmond, A., Dubinsky, Z., Aaronson, S., 2017. Algal nutrition. In: Handbook of Microalgal Mass Culture (1986). *CRC Press*, pp. 147–198.

Klas, S., Mozes, N., Lahav, O., 2006. Development of a single-sludge denitrification method for nitrate removal from RAS effluents: lab-scale results vs. model prediction. *Aquaculture*, 259(1-4), 342-353. <u>https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.049</u>

Krummenauer, D., Seifert Junior, C.A., Poersch, L.H.D.S., Foes, G.K., Lara, G.R.D., Wasielesky Junior, W., 2012. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água. *Atlântica*, Rio Grande, 34(2) 103-111.

Lamarra, J., Rivero, S., & Pinotti, A., 2016. Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science and Engineering*, 67, 717-726. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.072 Li, H., Cui, Z., Cui, H., Bai, Y., Yin, Z., Qu, K., 2023. Hazardous substances and their removal in recirculating aquaculture systems: A review. *Aquaculture*, 739399.

Little, D., Newton, R., Beveridge, M., 2016. Aquaculture: A rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential. *Proceedings of the Nutrition Society* 75 (3), 274-286. doi:10.1017/s0029665116000665

Ma, X.N., Chen, T.P., Yang, B., Liu, J., Chen, F., 2016. Lipid production from *Nannochloropsis*. *Marine Drugs*, 14(4), 61. <u>https://doi.org/10.3390/md14040061</u>

Mahari, W.A.W., Razali, W.A.W., Manan, H., Hersi, M.A., Ishak, S.D., Cheah, W., Chan, D.J.C., Sonne, C. Show, P.L., Lam, S.S., 2022. Recent advances on microalgae cultivation for simultaneous biomass production and removal of wastewater pollutants to achieve circular economy. *Bioresource Technology*, 128085. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128085

Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., 1989. Alginate as immobilization material:
I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(1), 79-89. <u>https://doi.org/10.1002/bit.260330111</u>
Metcalf, L., Eddy, H.P., 2003. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4th
Edition, *McGraw-Hill*, New York.

Monsees, H., Klatt, L., Kloas, W., Wuertz, S., 2017. Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture Research*, 48(7), 3482-3492. https://doi.org/10.1111/are.13174

Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2006. Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments:

bead stability and suitability. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 135 – 141. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.005

Moreno-Garrido, I., 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99, 3949–3964. <u>https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040</u> Murujew, O., Whitton, R., Kube, M., Fan, L., Roddick, F., Jefferson, B., Pidou, M., 2021. Recovery and reuse of alginate in an immobilized algae reactor. *Environmental Technology*, 42(10), 1521-1530.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2009. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments (3rd ed.). *John Wiley & Sons*.

Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405, 1017e1024. <u>https://doi.org/10.1038/35016500</u>

Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular engineering*, *20*(4-6), 459-466.

Perez-Garcia, O., Escalante, F.M., De-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037

Podevin, M., De Francisci, D., Holdt, S.L., Angelidaki, I., 2015. Effect of nitrogen source and acclimatization on specific growth rates of microalgae determined by a highthroughput in vivo microplate autofluorescence method. *Journal of applied phycology*, 27, 1415-1423.

Posadas, E., Muñoz, A., García-González, M.C., Muñoz, R., García-Encina, P.A., 2015. A case study of a pilot high rate algal pond for the treatment of fish farm and domestic wastewaters. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 90(6), 1094-1101. https://doi.org/10.1002/jctb.4417

Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlage, R.E., Boore, J.L., Posewitz, M.C., 2013. Corrigendum: Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature Communications*, 4, 2356. <u>https://doi.org/10.1038/ncomms3356</u>

Ramli, N.M., Verdegem, M.C.J., Yusoff, F.M., Zulkifely, M.K., Verreth, J.A.J., 2017. Removal of ammonium and nitrate in recirculating aquaculture systems by the epiphyte *Stigeoclonium nanum* immobilized in alginate beads. *Aquaculture Environment Interactions* 9, 213-222. <u>https://doi.org/10.3354/aei00225</u>

Roalkvam, I., Drønen, K., Dahle, H., Wergeland, H.I., 2020. Comparison of active biofilm carriers and commercially available inoculum for activation of biofilters in marine recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquaculture* 514, 734480. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734480

Rodehutscord, M., Pfeffer, E., 1995. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Science and technology*, 31(10), 143-147. <u>https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00433-</u><u>N</u>.

Rodrigues, R.V., Pedron, J.D.S., Romano, L.A., Tesser, M.B., Sampaio, L.A., 2015. Acute responses of juvenile cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766) to acid stress. *Aquaculture Research*, 46(5), 1241-1247.

Rurangwa, E., Verdegem, M.C., 2014. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Reviews in aquaculture*, 7(2), 117-130. https://doi.org/10.1111/raq.12057 Sampaio, L.A., Tesser, M.B., Wasielesky Júnior, W., 2010. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. *Revista brasileira de Zootecnia*, 39, 102-111.

Sarkheil, M., Ameri, M., Safari, O., 2022. Application of alginate-immobilized microalgae beads as biosorbent for removal of total ammonia and phosphorus from water of African cichlid (*Labidochromis lividus*) recirculating aquaculture system. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13.

Soo, C.L., Chen, C.A., Bojo, O., Hii, Y.S., 2017. Feasibility of marine microalgae immobilization in alginate bead for marine water treatment: Bead stability, cell growth, and ammonia removal. *International Journal of Polymer Science*, 2017:7. https://doi.org/10.1155/2017/6951212

Strickland, J. D. H., 1965. A manual of sea-water analysis. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, 125, 1-203.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, 107(1), 145-151. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00118-9

Tang, K., Baskaran, V., Nemati, M. 2009. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, *44*(1), 73-94. <u>https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.12.011</u>

Tom, A.P., Jayakumar, J.S., Biju, M., Somarajan, J., Ibrahim, M.A., 2021. Aquaculture wastewater treatment technologies and their sustainability: *A review*. Energy Nexus, 4, 100022. <u>https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100022</u>

Tomovic, N., Trifkovic, K., Rakin, M., Rakin, M.B., 2015. Influence of compression speed and deformation percentage on mechanical properties of calcium alginate particles.

*Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 21, 411-417. https://doi.org/10.2298/CICEQ140228043T

Van Rijn, J., 1996. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture—a review. *Aquaculture* 139, 181–201. https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01151-X

Wang, C., Li, Z., Wang, T., Xu., X., Zhang, X., Li, D., 2021. Intelligent fish farm-the future of aquaculture. *Aquaculture International* 29 (6), 2681-2711. https://doi.org/10.1007/s10499-021-00773-8

Wasielesky 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(1-4), 396-403. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030

Yang, X., Song, X., Peng, L., Hallerman, E., Huang, Z., 2019. Effects of nitrate on aquaculture production, blood and histological markers and liver transcriptome of *Oplegnathus punctatus*. *Aquaculture* 501, 387–396. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.048

Yu, J., Xiao, Y., Wang, Y., Xu, S., Zhou, L., Li, J., Li, X., 2021. Chronic nitrate exposure cause alteration of blood physiological parameters, redox status and apoptosis of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 283, 11710. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117103 Yu, J., Wang, X., Qian, S., Liu, P., Li, X., Li, J., 2022. Exposure to nitrate induces alterations in blood parameter responses, liver immunity, and lipid metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquatic Toxicology*, 251, 106280. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106280

# Material suplementar 1

Tabela MS1: Matriz do DCCR com 29 ensaios, testando diferentes níveis de alginato, cloreto, tempo de endurecimento, salinidade e fosfato. Legenda dos padrões: + = nível alto, - = nível baixo, a = ponto axial inferior, A = ponto axial superior, 0 = ponto central.

		Alginato	Cloreto	Tempo	Salinidade	Fosfato
Ensaio	Padrão	(g/100ml)	(g/100ml)	(min)	(g/L)	(mg/L)
1	a0000	1,0	6	20	15,0	5,0
2		1,5	4	15	7,5	2,5
3	++	1,5	4	15	22,5	7,5
4	+-+	1,5	4	25	7,5	7,5
5	++	1,5	4	25	22,5	2,5
6	-++	1,5	8	15	7,5	7,5
7	-+-+-	1,5	8	15	22,5	2,5
8	-++	1,5	8	25	7,5	2,5
9	-++++	1,5	8	25	22,5	7,5
10	0a000	2,0	2	20	15,0	5,0
11	00a00	2,0	6	10	15,0	5,0
12	000a0	2,0	6	20	0,0	5,0
13	0000a	2,0	6	20	15,0	0,0
14	00000	2,0	6	20	15,0	5,0
15	00000	2,0	6	20	15,0	5,0
16	00000	2,0	6	20	15,0	5,0
17	0000A	2,0	6	20	15,0	10,0
18	000A0	2,0	6	20	30,0	5,0
----	-------	-----	----	----	------	-----
19	00A00	2,0	6	30	15,0	5,0
20	0A000	2,0	10	20	15,0	5,0
21	++	2,5	4	15	7,5	7,5
22	++	2,5	4	15	22,5	2,5
23	+-+	2,5	4	25	7,5	2,5
24	+-+++	2,5	4	25	22,5	7,5
25	++	2,5	8	15	7,5	2,5
26	++-++	2,5	8	15	22,5	7,5
27	+++-+	2,5	8	25	7,5	7,5
28	++++-	2,5	8	25	22,5	2,5
29	A0000	3,0	6	20	15,0	5,0

**Material Suplementar 2** 

#### Medição de Cor de esferas de alginato no Image J

1. Abrir a imagem no ImageJ.



- 2. Usar o **zoom** para aumentar a visualização do papel milimetrado.
- 3. Selecionar a ferramenta linha c e medir o papel milimetrado.
- Selectionar Analyze > Set Scale... e inserir o valor medido no campo Known distance. Inserir a unidade (mm) no campo Unit of length > OK.



5. Selecionar a ferramenta **retângulo** e selecionar apenas as esferas de alginato.

Selecionar Image > Crop para eliminar a parte desnecessária da imagem.



6. Selecionar Image > Adjust > Color Threshold para o programa reconhecer as esferas. O reconhecimento ocorre automaticamente, apenas feche a janela.



Selectionar Analyze > Set Measurements. Selectionar as opções: Area, Mean gray value, Standard deviation, e Min & Max gray value > OK.

8. Selecionar a ferramenta varinha e clicar duas vezes em cima. Ajustar
Tolerance para 100 e Mode para Legacy > OK.

	Wand Tool	
Tolerance:	-	100
Mode:	Legacy 📀	
Smo	oth if thresholded	

9. Com a ferramenta varinha itivada, clicar na primeira esfera. Selecionar Edit > Selection > Add to Manager. A esfera aparecerá listada no ROI Manager.Selecionar as opções Show All e Labels. Repetir o processo para as outras esferas, individualmente, clicando no botão Add do Roi Manager para adicioná-las à lista. Após todas as esferas listadas, clicar em Measure no Roi Manager.



10. Salvar a tabela de resultados como um arquivo .csv que pode ser importado para o Excel. Também salvar a imagem com as esferas reconhecidas, selecionando a opção
Flatten no ROI Manager.

### Material suplementar 3

#### Medição de tamanho e esfericidade das esferas de alginato no Image J

1. Abrir a imagem no ImageJ.



- 2. Usar o **zoom** para aumentar a visualização do papel milimetrado.
- 3. Selecionar a ferramenta linha e medir o papel milimetrado.
- 4. Selecionar Analyze > Set Scale e inserir o valor medido no campo Known distance.

Inserir a unidade (mm) no campo **Unit of length > OK**.



Selecionar a ferramenta retângulo e selecionar apenas as esferas de alginato.
 Selecionar Image > Crop para eliminar a parte desnecessária da imagem.



6. Selecionar **Image** > **Type** > **8-bit** para converter a imagem em P&B.



Selecionar Image > Adjust > Threshold para o programa reconhecer as esferas.
 Selecionar a opção Auto.



- Selecionar Analyze > Set Measurements. Selecionar as opções Area, Mean grey value, Shape descriptors e Feret's diameter > OK.
- 9. Selecionar Analyze > Analyze Particles, Selecionar Show > Overlays Masks.



 Salvar a tabela de resultados como um arquivo .csv que pode ser importado para o Excel. Também salvar a imagem com as esferas reconhecidas. Também salvar todas as imagens dos passos 5, 6, 7 e 9.

# 4. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- A microalga *Nannochloropsis oceanica* foi eficiente na remoção de nitrato e fosfato em efluente proveniente de sistemas de recirculação;
- A metodologia de planejamento experimental resultou em esferas de alginato com circunferência ideal para a produção das esferas, no entanto, os resultados de resistência e densidade não foram satisfatórios, ficando abaixo do predito;
- A presença de microrganismos naturalmente presentes em efluentes de sistemas de recirculação, como diferentes morfotipos de bactérias são um fator crucial na estabilidade das esferas;
- Concentrações de fosfato até 10mg·L<sup>-1</sup> não afetaram significativamente a estabilidade das esferas.
- Nannochloropsis oceanica foi mais eficiente na remoção de nitrato e fosfato em todos os tratamentos, no entanto, quando comparados, as microalgas imobilizadas se saíram melhor que as células livres.

## 5. PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS

A partir das hipóteses estudadas e resultados obtidos novos questionamentos surgiram, dentre eles:

- Foram feitas análises somente de nitrato e fosfato, porém outros componentes presentes em RAS podem estar afetando o crescimento das microalgas, como por exemplo íons de amônia remanescentes dos sistemas;
- Os experimentos de reforço de banho de CaCl<sub>2</sub> podem ser otimizados, diminuindo o tempo entre os banhos;
- Avaliar outros meios de tratamento prévio do efluente antes de expor as esferas ao meio, como UV ou ozônio, por exemplo.
- Realizar a análise completa dos componentes químicos do efluente visando identificar os íons que vão competir com o CaCl<sub>2</sub> na estabilidade química das esferas.
- A utilização da biomassa produzida pode ser testada para outras aplicações como a produção de compostos bioativos, bioenergia e até mesmo alimentação de zooplâncton para a aquicultura.