

# Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*

Fabiano Cleber Bertoldi\*  
Ernani Sant'Anna\*\*  
Jorge Luiz Barcelos Oliveira\*\*\*  
Andrey Martinez Rebelo\*\*\*\*

## Resumo

A microalga *Chlorella vulgaris* foi avaliada quanto à biorremocão de nitrogênio e fósforo quando cultivada a  $25 \pm 2$  °C com iluminação contínua de  $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  em solução hidropônica residual com três diferentes concentrações: SHR, solução hidropônica residual; SHR50, solução hidropônica residual diluída em água deionizada à concentração de 50% e SHR25, solução hidropônica residual diluída à concentração de 25%. Os cultivos foram avaliados nos parâmetros de amônia, nitrato e nitrito, obtendo os seguintes percentuais médios de remoção para SHR, SHR50 e SHR25 respectivamente: amônia (82,2%; 82,4%; 65,7%), nitrato (80,5%; 81,4%; 87,0%), nitrito (84,2%; 83,6%; 83,5%), fósforo total (51,9%; 46,0%; 43,1%). A densidade celular aumenta até o final do ciclo, chegando a  $5,7 \times 10^6$  cel.  $\text{mL}^{-1}$  para o cultivo em SHR,  $4,2 \times 10^6$  cel.  $\text{mL}^{-1}$  no cultivo em SHR50 e  $10,15 \times 10^6$  cel.  $\text{mL}^{-1}$  para SHR25. Os resultados evidenciaram que a adaptação de *Chlorella vulgaris* às novas fontes de nutrientes foi eficaz, uma vez que a densidade celular aumentou no decorrer do tempo para todos os cultivos, e que a remoção de nitrogênio e fósforo foi efetiva.

Palavras-chave: Efluentes. Eutrofização. Hidroponia.

\* Doutor em Ciência dos Alimentos; pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), Estação Experimental de Itajaí; Rod. Antônio Heil, Km 6, Cx. P. 277, 88301-970, Itajaí, SC; fabianobertoldi@epagri.sc.gov.br

\*\* Doutor em Ciência dos Alimentos; professor da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos; ernanis@cca.ufsc.br

\*\*\* Doutor em Engenharia Agrícola; professor da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Rural; jbarcelo@cca.ufsc.br

\*\*\*\* Mestre em Farmácia; pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), Estação Experimental de Itajaí; andrey@epagri.sc.gov.br

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1930, na Universidade da Califórnia, o norte-americano William Gericke propôs o termo hidroponia para indicar o cultivo de plantas em meio líquido, popularizando o cultivo de plantas em ausência de solo (JONES JÚNIOR, 1982).

A hidroponia é considerada uma técnica agrícola alternativa. Entretanto, a solução nutritiva que alimenta as plantas precisa ser trocada periodicamente. Dessa forma, o descarte dessa solução gera um efluente composto de nutrientes ricos em nitrogênio e fósforo que, quando descartados diretamente ao meio ambiente, podem causar problemas ambientais, como a eutrofização (BERTOLDI et al., 2006).

Esses compostos também podem causar problemas de saúde ao homem, como é o caso da meta-hemoglobinemia em lactentes, em que o nitrito oxida o  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  presente na hemoglobina, produzindo a meta-hemoglobina que é incapaz de transportar o oxigênio até as células. Além disso, o nitrato também pode formar nitrosamina e nitrosamida, que são compostos cancerígenos, teratogênicos e mutagênicos (MAYNARD et al., 1976; WALKER, 1990; MÉNDEZ, 2003).

A biotecnologia de microalgas demonstra ser versátil, pode atuar em diferentes processos, como no tratamento de efluentes, biorremoval de metais pesados, produção de ração, fertilizantes e química fina (DE LA NOÛE; DE PAUW, 1988).

No processo de biorremoval de nitrogênio e do fósforo, as microalgas assimilam esses nutrientes incorporando-os à sua biomassa, obtendo um produto enriquecido nutricionalmente, que pode ser utilizado como suplemento alimentar, na aquicultura e em várias outras áreas de atuação (METCALF; EDDY, 1995).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de remoção de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual em três diferentes concentrações, por meio da biorremoval da microalga *Chlorella vulgaris*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A microalga *Chlorella vulgaris* foi obtida do Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e cultivada em *Bold Basal Medium* (BBM). A cultura foi mantida sob aeração constante, temperatura controlada a  $25 \pm 2$  °C, pH 6,8 e iluminação contínua de  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40W. O crescimento até a fase exponencial ( $2,5 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>) serviu como inóculo, que foi transferido em um volume correspondente a 4,5% (v/v) para biorreatores cônicos invertidos de 4.000 mL, contendo 3.700 mL de solução hidropônica residual com três diferentes concentrações: solução hidropônica residual pura (SHR), SHR50 e SHR25 diluídas em água deionizada obtendo concentrações de 50% e 25% respectivamente, totalizando, dessa forma, três tratamentos experimentais (SHR, SHR50 e SHR25), realizados em quatro repetições independentes. Para eliminar bactérias e protozoários, a solução hidropônica residual foi filtrada e esterilizada em autoclave por 20 minutos à temperatura de 121 °C.

A solução hidropônica residual foi obtida do cultivo de alface hidropônica produzido no Laboratório de Hidroponia (Labhidro) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e sua caracterização (Tabela 1) foi determinada segundo metodologia da American Public Health Association (1998).

Tabela 1: Características físico-químicas da solução hidropônica residual

Parâmetros	Valor médio
pH	5,0
Condutividade	1,9 mS.cm <sup>-1</sup>
Demanda Química de Oxigênio	23,94 mg.L <sup>-1</sup>
Demanda Bioquímica de Oxigênio	5,40 mg.L <sup>-1</sup>
Amônia	26,60 mg.L <sup>-1</sup>
Nitrato	226,50 mg.L <sup>-1</sup>
Nitrito	0,27 mg.L <sup>-1</sup>
Fósforo total	35,00 mg.L <sup>-1</sup>
Cálcio	99,17 mg.L <sup>-1</sup>
Magnésio	22,12 mg.L <sup>-1</sup>
Ferro	1,95 mg.L <sup>-1</sup>
Manganês	0,26 mg.L <sup>-1</sup>
Cobre	0,04 mg.L <sup>-1</sup>
Zinco	0,11 mg.L <sup>-1</sup>

A população de *Chlorella vulgaris* foi obtida pela densidade celular, mediante contagem do número de células, usando câmara de *Neubauer Hematocytometer* em microscópio ótico acoplado a um computador com captura de imagem.

A medida do pH e da temperatura também foram monitoradas. As remoções de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica foram determinadas no tempo inicial e final (sétimo dia) do ciclo de cultivo. Para a realização das concentrações de N e P da solução hidropônica residual foi tomado 100 mL da suspensão algal de cada um dos tratamentos e filtrada em membrana de 0,45µm. O filtrado foi recuperado para determinar amônia, nitrato, nitrito e fósforo total, seguindo metodologia descrita pela American Public Health Association (1998).

Visando examinar diferenças entre as médias de cada tratamento para remoção de amônia, nitrato, nitrito e fósforo total, foram realizadas análises estatísticas por meio de análise de variância (Anova) e teste *Tukey* em nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento de *Chlorella vulgaris* nos diferentes tratamentos (Gráfico 1) mostrou que a adaptação da microalga à solução hidropônica residual foi eficaz, uma vez que a densidade celular aumentou no decorrer dos sete dias de cultivo. No início do experimento cada cultivo foi inoculado com o mesmo volume e concentração de *Chlorella vulgaris*, assim obteve-se uma densidade celular inicial igual para todos os tratamentos ( $1,0 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>).

Até o segundo dia de crescimento as culturas mantiveram-se em fase de adaptação aos meios, com pouco aumento na densidade celular, atingindo  $6,0 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> para SHR,  $3,8 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> para SHR50 e  $7,5 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> para SHR25. A partir do segundo e até o sétimo dia de cultivo, observou-se a fase exponencial de crescimento na qual a densidade celular foi de  $5,7 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> para SHR, de  $4,2 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> para SHR50 e de  $1,0 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> para SHR25.

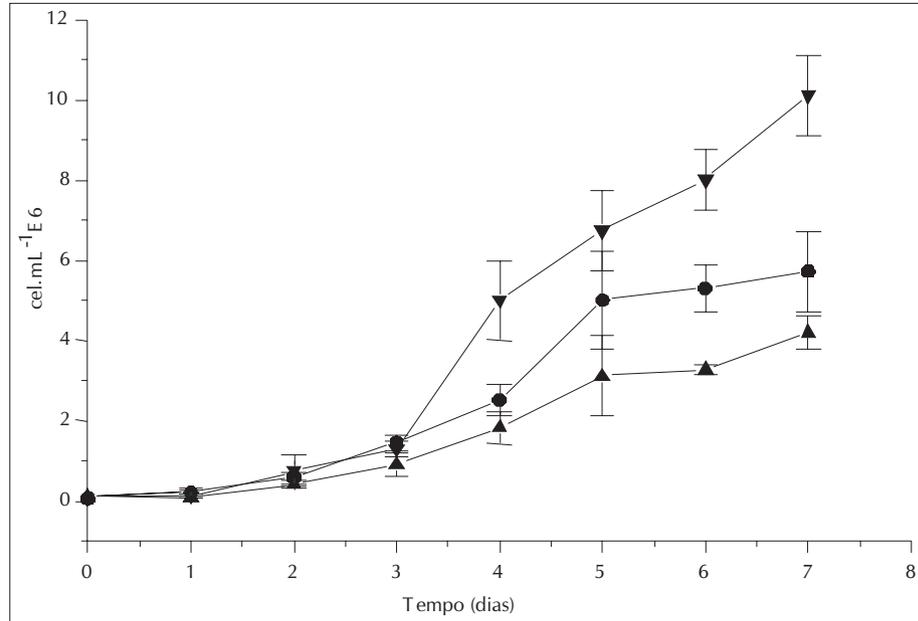


Gráfico 1: Curva de crescimento de *Chlorella vulgaris* em SHR (●); SHR50 (▲) e SHR25(▼) durante 7 dias de cultivo

Os valores de pH inicial foram de 5,0 para tratamento SHR, 5,4 para tratamento SHR50 e 5,8 para tratamento SHR25. Os valores de pH também aumentaram no decorrer do crescimento algal atingindo, no final, 5,3 no cultivo em SHR, 7,0 e 9,5 nos cultivos SHR50 e SHR25, respectivamente. Esse comportamento era esperado, uma vez que o aumento da densidade celular das microalgas faz com que a atividade fotossintética reduza o teor de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo, aumentando, consequentemente, o pH. O cultivo SHR25 foi o que apresentou maior densidade celular, consumindo possivelmente maior quantidade de CO<sub>2</sub> do meio e, elevando consideravelmente o valor de pH após sete dias de cultivo.

Considerando os teores de nitrogênio e fósforo como mostra a Tabela 2, pode-se observar que a biorremoção (Tabela 3) foi efetiva em todas as concentrações da solução hidropônica residual.

Tabela 2: Valores médios em mg.L<sup>-1</sup> ± desvio padrão de amônia, nitrato, nitrito e fósforo na solução hidropônica residual no início e no final do cultivo (7 dias), em três diferentes concentrações (continua)

Tratamentos	Parâmetros	Inicial	Final	Δ
SHR	Amônia	26,66 ± 0,29	4,75 ± 0,21	-21,91
	Nitrato	226,00 ± 2,83	44,07 ± 1,63	-181,93
	Nitrito	0,27 ± 0,01	0,042 ± 0,005	-0,23
	ΣNi	252,93	48,86	-204,07
	Fósforo	35,00 ± 0,09	16,82 ± 0,55	-18,18
SHR50	Amônia	17,75 ± 0,35	3,33 ± 0,30	-14,42
	Nitrato	116,50 ± 0,70	21,65 ± 0,35	-94,85
	Nitrito	0,167 ± 0,005	0,027 ± 0,005	-0,14
	ΣNi	134,42	25,01	-109,41
	Fósforo	19,58 ± 0,43	10,57 ± 0,32	-9,01
SHR25	Amônia	4,5 ± 1,47	1,44 ± 0,14	-3,06
	Nitrato	82,00 ± 1,41	10,71 ± 0,08	-71,29

Tabela 2: Valores médios em mg.L<sup>-1</sup> ± desvio padrão de amônia, nitrato, nitrito e fósforo na solução hidropônica residual no início e no final do cultivo (7 dias), em três diferentes concentrações (conclusão)

Tratamentos	Parâmetros	Inicial	Final	Δ
	Nitrito	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00	-0,05
	ΣNi	90,81	12,16	-78,65
	Fósforo	9,26 ± 0,51	5,25 ± 0,10	-4,01

Legenda: ΣNi: Total de nitrogênio inorgânico

Δ: Diferença do valor inicial.

Em sete dias de cultivo, a média de nitrogênio inorgânico removido foi de 204,07 mg.L<sup>-1</sup> para SHR, 109,41 mg.L<sup>-1</sup> para SHR50 e 78,65 mg.L<sup>-1</sup> para SHR25. Já para fósforo total os teores removidos foram de 18,18 mg.L<sup>-1</sup> para SHR, 9,01 mg.L<sup>-1</sup> para SHR50 e 4,01 mg.L<sup>-1</sup> para SHR25.

Tabela 3: Valores médios de remoção (%) de amônia, nitrato, nitrito e fósforo da solução hidropônica residual em três diferentes concentrações pela microalga *Chlorella vulgaris*

Parâmetros	SHR	SHR50	SHR25
Amônia	82,2 <sup>a</sup>	82,4 <sup>a</sup>	65,7 <sup>b</sup>
Nitrato	80,5 <sup>a</sup>	80,4 <sup>a</sup>	87,0 <sup>b</sup>
Nitrito	84,2 <sup>a</sup>	83,6 <sup>a</sup>	83,5 <sup>a</sup>
Fósforo	51,9 <sup>a</sup>	46,0 <sup>a</sup>	43,1 <sup>b</sup>

Nota: médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente (p>0,05).

As remoções de amônia, nitrato e fósforo são significativamente maior (p<0,05) nos cultivos SHR e SHR50. Entretanto, para a biorremocão de nitrito, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Ainda são escassas as pesquisas em relação ao destino da solução hidropônica residual. Percebe-se que a maioria dos produtores que se utiliza dessa técnica de cultivo descarta a solução diretamente no meio ambiente, podendo causar um desequilíbrio na fisiologia e biologia das plantas, sem contar que o nitrato é móvel no solo, alcançando rapidamente o lençol freático, contaminando as águas subterrâneas e os rios, causando possível impacto ambiental.

Além do mais, vê-se a necessidade de maiores estudos sobre a potencialidade de microalgas no tratamento de resíduos hidropônicos, possibilitando a utilização da biomassa algal em uma ampla ordem de compostos com aplicação na elaboração de rações e extração de bioprodutos, como corantes naturais e ácidos graxos.

Quando comparado a outros estudos pode-se observar que os resultados obtidos são coerentes com os encontrados por outros autores, como Valderrama et al. (2002), que conseguiram remover 71,6% de amônia e 28% de fósforo em um período de quatro dias de cultivo de *Chlorella vulgaris* em efluente industrial. Em outro estudo realizado por Méndez (2003), mostra que as remoções de amônia, nitrato e fósforo pela *Chlorella* spp. em águas residuais atingiram 69,82%; 61,45% e 61,68%, respectivamente.

O nitrato é a forma de nitrogênio inorgânico que se apresentou em maior concentração na solução hidropônica residual. No entanto, as altas concentrações de nitrato não inibem o crescimento da microalga. Esse fenômeno foi citado por Jeanfils, Cnisius e Burlion (1993), no qual os autores relatam que a assimilação do nitrato é dependente da atividade redutase, aumentando a atividade e, conseqüentemente, a assimilação, à medida que se aumenta a concentração de nitrato no meio. Esse fato é demonstrado no tratamento SHR, em que a concentração removida de 181,93 mg.L<sup>-1</sup> de nitrato é consideravelmente efetiva para uma densidade celular de 5,7x10<sup>6</sup> cel.mL<sup>-1</sup>.

Ayala e Vargas (1987), trabalhando com *Spirulina* sp. no tratamento de diferentes efluentes, concluíram que muitos eram tóxicos para a microalga quando cultivados sem diluição, e que, ao mesmo tempo, a disponibilidade de nitrogênio torna-se um dos mais importantes fatores limitantes para o crescimento intensivo da microalga.

O aumento do pH é outro fator importante no crescimento algal, pois faz com que ocorra a formação de gás de amônia a partir da dissociação do íon amônio, tornando-se tóxico para microalga. Estudos reportam que a fotossíntese algal é inibida com concentração de amônia acima de 28 mg.L<sup>-1</sup> em cultivo com pH excedente a 8,0 (AZOV; GOLDMAN, 1982).

Os cultivos com maior concentração de amônia, SHR e SHR50, apresentaram menor densidade celular em relação ao cultivo SRH25. Isso provavelmente aconteceu pelo fato de seus valores de pH não terem ultrapassado de 8,0. Entretanto, o tratamento SHR25, apesar de ter superado esse valor de pH, não obteve inibição, possivelmente pelo fato de seu meio apresentar uma concentração relativamente baixa de amônia decorrente da diluição.

Muitos autores relatam que a diluição de águas residuais no cultivo de microalgas é necessária para diminuir o efeito tóxico da amônia (POULIOT et al., 1984; KONIG; PEARSON; SILVA, 1987; DE LA NOÛE; BASSÉRES, 1989).

#### 4 CONCLUSÃO

Nesse experimento pode-se concluir que a *Chlorella vulgaris* é efetiva na remoção de nitrogênio e fósforo, e que, a princípio, não haveria a necessidade de diluir a solução hidropônica residual para a realização da biorremoção. Além disso, a solução hidropônica residual apresentou ser uma alternativa como meio de cultura para a produção de biomassa algal, possibilitando a reciclagem desse resíduo.

#### ***Bioremoval of nitrogen and phosphorus from hydroponic wastewater by Chlorella vulgaris***

##### Abstract

*Chlorella vulgaris* microalgae was evaluated according to nitrogen and phosphorus bioremoval when cultivated at 25±2 °C with continuous light of 150 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> in hydroponic wastewater at three different concentrations: HW, pure hydroponic wastewater, HW50, wastewater diluted in deionized water at 50% concentration and HW25, hydroponic wastewater diluted in deionized water at 25% concentration. The cultures were evaluated according to ammonia, nitrate and nitrite parameters, obtaining the following average percentage of removal in HW, HW50 and HW25 respectively: ammonia (82,2; 82,4; 65,7%), nitrate (80,5; 81,4; 87,0%), nitrite (84,2; 83,6; 83,5%) and phosphorus (51,9; 46,0; 43,1%). The growing algal enlarges up to the end of the cycle, reaching cellular density of 5,7x10<sup>6</sup> cell.mL<sup>-1</sup> in HW, 4,2 x10<sup>6</sup> in HW50 and 10,15x10<sup>6</sup> cell.mL<sup>-1</sup> in HW25. The results showed that *Chlorella vulgaris* adaptation to a new source of nutrition was efficacious and nitrogen and phosphorus removal was effective.

**Keywords:** Effluent. Eutrophication. Hydroponic.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. New York: American Public Health Association, 1998. 1.325 p.
- AYALA, F.; VARGAS, T. Experiments on Spirulina culture on waste-effluent media and at the pilot plant. **Hydrobiology**, v. 151, p. 91-93, 1987.
- AZOV, Y.; GOLDMAN, J. C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 43, p. 735-739, 1982.
- BERTOLDI, F. C. et al. Lipids, fatty acids composition and carotenoids of Chlorella vulgaris cultivated in hydroponic wastewater. **Grasas y Aceites**, v. 57, p. 270-274, 2006.
- CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; ESPINOZA-CHÁVEZ, F. Acute toxicity to Daphnia magna of effluents containin Cd, Zn, and mixture Cd-Zn, after metal removal by Chlorella vulgaris. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 160-164, 2000.
- DE LA NOÛE, J.; BASSÉRES, A. Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. **Biological Wastes**, v. 29, p. 17-31, 1989.
- DE LA NOÛE, J.; DE PAUW, N. The potencial of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 6, p. 725-770, 1988.
- JEANFILS, J.; CNISIUS, M. F.; BURLION, N. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized Chlorella vulgaris cells. **J. Appl Phycol.**, v. 5, p. 369-374, 1993.
- JONES JUNIOR, B. Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. **J. Plant Nutrition**, v. 5, p. 1.003-1.030, 1982.
- KONIG, A.; PEARSON, H. W.; SILVA, A. Ammonia toxicity to algal growth in waste stabilization ponds. **Water Science and Technology**, v. 19, p. 115-122, 1987.
- MAYNARD, D. N. et al. Nitrate accumulation in vegetables. **Advances in Agronomy**, v. 28, p. 71-118, 1976.

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

METCALF; EDDY. **Ingeniería de Aguas Residuales** – tratamento vertido y reutilización. 3. ed. Espanha: MacGRAW Hill, 1995.

POULIOT, Y. et al. Culture of cyanobacteria for tertiary wastewater treatment and biomass production. **Biological Wastes**, v. 29, p. 81-91, 1984.

VALDERRAMA, L. T. et al. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the macrophite *Lemna minuscula*. **Water Research**, v. 36, n. 17, p. 4.185-4.192, oct. 2002.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. **Food Additives & Contaminants**, v. 7, p. 717-768, 1990.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Petrobras (Projeto n. 360-2002) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Recebido em 9 de setembro de 2009

Aceito em 16 de outubro de 2009