

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

MONICA DE ALBUQUERQUE BONINI

**CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Aphanothece microscopica* Nägeli
e *Chlorella vulgaris* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E
EM VINHAÇA**

**Araras
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

MONICA DE ALBUQUERQUE BONINI

**CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Aphanothece microscopica* Nägeli
e *Chlorella vulgaris* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E
EM VINHAÇA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Agricultura e Ambiente como
requisito para obtenção do título de **Mestre
em Agricultura e Ambiente.**

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

**Araras
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B715ch

Bonini, Monica de Albuquerque.

Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça / Monica de Albuquerque Bonini. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
96 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Cianobactéria. 3. Microalga. 4. Cultivo heterotrófico. 5. Águas residuais. 6. Vinhaça. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE

MONICA DE ALBUQUERQUE BONINI

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
E AMBIENTE, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, **EM 08 DE
MARÇO DE 2012.**

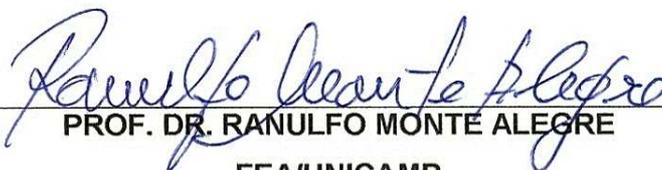
BANCA EXAMINADORA:



PROF. DR. REINALDO GASPAR BASTOS

ORIENTADOR (A)

DTAiSER/UFSCar



PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE

FEA/UNICAMP



PROF. DR. JORGE JOSÉ CÔRREA LOPES

DTAiSER/UFSCar

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos, mas especialmente:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, sugestões, orientação e convivência harmoniosa durante todo o curso do Mestrado, além do incentivo constante ao meu progresso na área acadêmica;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/CCA/UFSCar), alunos, técnicos e estagiários, Aline, Bruno (Paçoca), Bruno Tini, Cláudia, Flávia, Juliana, Larissa, Maikon, Vanessa, Victor, Tati e Tina, pela convivência diária, pelos conselhos, pela amizade constante e pelos momentos de lazer;

Ao pessoal do Laboratório de Análise e Simulação Tecnológica (LAST/CCA/UFSCar), especialmente a Sílvia, por compartilharem seu tempo e espaço todas as vezes que precisei;

À Prof. Dr^a Maria Helena Andrade Santana e os mestrandos Felipe Ferrari e Leandro Benedini, do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da FEQ/Unicamp, pelas análises de HPLC;

À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA), pela oportunidade oferecida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo suporte financeiro durante a pesquisa;

A todos os colegas do PPGAA, especialmente Lucas e Mariane, pelo companheirismo durante o decorrer desses dois anos de mestrado;

Aos Profs. Drs. Claudinei Fonseca Souza e Marcio Roberto Soares, por sua amizade e por contribuírem, há anos, com minha formação;

Aos meus pais, Fernando e Nilsa, por seu amor e paciência todos esses anos, pela minha formação como pessoa, e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões;

À minha irmã Marina que, mesmo distante, sempre demonstrou seu carinho e torceu por mim;

Ao meu noivo, amigo e companheiro Felipe, por seu amor, carinho e paciência infinita durante todos esses anos de vida compartilhada;

A todos os meus amigos e amigas, os mais próximos e os mais distantes, simplesmente por existirem;

A Deus, responsável por tudo, sem o qual nada seria possível.

RESUMO

O termo microalga inclui tanto algas clorofíceas quanto cianobactérias. Recentemente estes micro-organismos têm despertado interesse devido ao seu metabolismo versátil, uma vez que algumas linhagens apresentam, além da fotossíntese como modelo de cultivo preferencial, a capacidade de desenvolverem-se no escuro a partir do consumo de moléculas orgânicas simples, tais como glicose, acetato e glicerol. Esta habilidade sugere a aplicação destes micro-organismos em diversas áreas, como o tratamento biológico de águas residuárias agroindustriais, visando a remoção de nutrientes e matéria orgânica. Apesar disso, são raros os trabalhos na literatura que avaliam o cultivo heterotrófico e o consumo ou incorporação de moléculas orgânicas por microalgas ou cianobactérias. O Estado de São Paulo responde por grande parte da produção nacional de etanol a partir da cana-de-açúcar, gerando uma quantidade considerável de vinhaça. A vinhaça é a principal água residuária do setor sucroenergético, sendo normalmente aplicada nos canaviais como fertirrigação. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estender os estudos a respeito do cultivo mixotrófico e heterotrófico da cianofíceia *Aphanothece microscopica Nägeli* e da clorofíceia *Chlorella vulgaris* em meios com adição de fontes de carbono orgânico e em vinhaça, visando a produção de biomassa e aplicação no tratamento de águas residuárias. Ensaio mixotróficos foram conduzidos visando selecionar a concentração ideal de substrato orgânico para o cultivo das microalgas, as quais foram posteriormente avaliadas em sistemas heterotróficos. Paralelamente foram conduzidos ensaios com vinhaça, avaliando-se a remoção de DQO e incorporação de glicose e potássio pelas microalgas. Dos ensaios mixotróficos foram selecionadas as concentrações ótimas de 25 e 12,5 g.L⁻¹ de glicose, 0,5 e 1,25 g.L⁻¹ de acetato de potássio e 0,46 e 0,92 g.L⁻¹ de glicerol como ideais para o cultivo de *Aphanothece* e *Chlorella*, respectivamente, refletindo em velocidades específicas de crescimento entre 0,0072 e 0,043 h⁻¹. Nos ensaios heterotróficos verificaram-se velocidades específicas de crescimento iguais ou superiores para ambas as microalgas em todas as fontes de carbono avaliadas, com reduções entre 30,4 e 90% da concentração inicial dos substratos. Os ensaios com vinhaça demonstraram a possibilidade de utilização desta água residuária como meio de cultivo para ambas as microalgas, com alta conversão em biomassa pela *Aphanothece*. Nestas condições, verificaram-se remoções de 55,5% de glicose, 60,8% de DQO e 13% de potássio para a cianobactéria, e de 83,7% de glicose, 25% de DQO e 13,8% de potássio para *Chlorella*. Os resultados obtidos sugerem a presença do metabolismo heterotrófico nestes micro-organismos e apontam uma alternativa interessante para o aproveitamento de águas residuárias, com a possibilidade de produzir biomassa de alto valor agregado a partir de um meio de baixo custo.

Palavras-chave: *Aphanothece microscopica Nägeli*. *Chlorella vulgaris*. Cultivo heterotrófico. Água residuária. Vinhaça.

ABSTRACT

Microalgae include both algae Chlorophyceae and cyanobacteria. These organisms have attracted interest due to its versatile metabolism, since some strains have, additionally to photosynthetic metabolism, ability to grow in the dark by the consumption of simple organic molecules, such as glucose, acetate and glycerol. This ability suggests the application of these microorganisms in several areas, such as biological treatment of agroindustrial wastewater, aiming the removal of nutrients and organic matter. São Paulo/Brazil is one of the main producers of ethanol from sugarcane, generating a considerable amount of vinasse. Vinasse represents the main wastewater from de sugarcane agroindustry, being usually applied as fertigation in sugarcane crops. In this context, this study aimed to evaluate the heterotrophic growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nägeli* and the chlorophyceae *Chlorella vulgaris* in synthetic culture media supplemented with organic carbon source and in vinasse, aiming to produce biomass and application it in wastewater treatment. Mixotrophic cultures were conducted to select the optimal concentration of organic substrate for the growth of microalgae, which were evaluated in heterotrophic cultures. Additionally, experiments have been conducted with pre-treated vinasse, evaluating the COD removal and the glucose and potassium incorporation. By the mixotrophic tests was selected the optimal concentrations of 25 and 12.5 g.L⁻¹ glucose, 0.5 and 1.25 g.L⁻¹ potassium acetate and 0.46 and 0.92 g.L⁻¹ glycerol as ideal for the cultivation of *Aphanothece microscopica Nägeli* and *Chlorella vulgaris*, respectively, which reflected on the maximum specific growth rate between 0.0072 and 0.043 h⁻¹. In the heterotrophic cultures the maximum specific growth rate was greater or equal to both microalgae in all carbon sources, with reduction between 30.4 and 90% of the initial concentrations of substrates. The experiments demonstrated possibility to use vinasse as culture media for both microalgae, especially *Aphanothece microscopica Nägeli*. In this conditions, results indicated the maximum removals of glucose (55.5%), COD (60.8%) and potassium (13%) by the cyanobacterium, and 83.7% of glucose, 25% of COD and 13.8% of potassium by *Chlorella vulgaris*. The results suggest the heterotrophic metabolism for both microorganisms, pointing an interesting alternative to use of wastewater as culture media to produce high-value biomass from a low-cost way.

Key-words: *Aphanothece microscopica Nägeli*. *Chlorella vulgaris*. Heterotrophic cultures. Wastewater. Vinasse.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Perfis de biomassa de *Aphanothece microscopica Nægeli* em cultivo mixotrófico em meio BGN suplementado com diferentes concentrações de glicose.....29
- FIGURA 2. Perfis de biomassa de *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico em meio WC suplementado com diferentes concentrações de glicose.....29
- FIGURA 3. Ajuste da velocidade específica de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* pelo Modelo de Haldane.....33
- FIGURA 4. Ajuste da velocidade específica de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* pelo Modelo de Haldane.....34
- FIGURA 5. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nægeli* em meio BGN suplementado com 25 g.L⁻¹ de glicose.....35
- FIGURA 6. Perfil das concentrações de glicose durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nægeli* em meio BGN suplementado com 25 g.L⁻¹ de glicose.....36
- FIGURA 7. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio WC suplementado com 12,5 g.L⁻¹ de glicose.....36
- FIGURA 8. Perfil das concentrações de glicose durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio WC suplementado com 12,5 g.L⁻¹ de glicose.....37
- FIGURA 9. Perfis de biomassa de *Aphanothece microscopica Nægeli* em cultivo mixotrófico em meio BGN suplementado com diferentes concentrações de glicerol.....39
- FIGURA 10. Perfis de biomassa de *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico em meio WC suplementado com diferentes concentrações de glicerol.....39

FIGURA 11. Ajuste da velocidade específica de crescimento da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> pelo Modelo de Haldane.....	42
FIGURA 12. Ajuste da velocidade específica de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> pelo Modelo de Haldane.....	42
FIGURA 13. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> em meio BGN suplementado com 0,46 g.L ⁻¹ de glicerol.....	44
FIGURA 14. Perfil das concentrações de glicerol durante o cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> em meio BGN suplementado com 0,46g.L ⁻¹ de glicerol.....	44
FIGURA 15. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio WC suplementado com 0,92 g.L ⁻¹ de glicerol.....	45
FIGURA 16. Perfil das concentrações de glicerol durante o cultivo heterotrófico de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio WC suplementado com 0,92 g.L ⁻¹ de glicerol.....	45
FIGURA 17. Perfis de biomassa de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> em cultivo mixotrófico em meio BGN suplementado com diferentes concentrações de acetato de potássio.....	48
FIGURA 18. Perfis de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> em cultivo mixotrófico em meio WC suplementado com diferentes concentrações de acetato de potássio.....	48
FIGURA 19. Aspecto de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> cultivada durante 80 horas em condições mixotróficas com concentrações crescentes de acetato de potássio.....	51
FIGURA 20. Ajuste da velocidade específica de crescimento da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> pelo Modelo de Haldane.....	51

FIGURA 21. Ajuste da velocidade específica de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> pelo Modelo de Haldane.....	52
FIGURA 22. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> em meio BGN suplementado com 0,5 g.L ⁻¹ de acetato de potássio.....	54
FIGURA 23. Perfil das concentrações de acetato durante o cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> em meio BGN suplementado com 0,5 g.L ⁻¹ de acetato de potássio.....	54
FIGURA 24. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio WC suplementado com 1,25 g.L ⁻¹ de acetato de potássio.....	55
FIGURA 25. Perfil das concentrações de acetato durante o cultivo heterotrófico de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio WC suplementado com 1,25 g.L ⁻¹ de acetato de potássio.....	55
FIGURA 26. Teores de glicose em vinhaça hidrolisada com diferentes concentrações de HCl.....	58
FIGURA 27. Variação dos teores de glicose com o tempo de aquecimento das amostras de vinhaça adicionadas de HCl concentrado.....	59
FIGURA 28. Variação dos teores de DQO com o tempo de aquecimento das amostras de vinhaça adicionadas de HCl concentrado.....	60
FIGURA 29. Perfil de biomassa de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> durante cultivo heterotrófico em vinhaça.....	61
FIGURA 30. Perfil de glicose durante o cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> em vinhaça.....	62
FIGURA 31. Perfil de DQO durante o cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i> em vinhaça.....	63

FIGURA 32. Perfis dos rendimentos $Y_{X/S}$ para as primeiras 20 horas de cultivo de <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i> em vinhaça.....	65
FIGURA 33. Perfil de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> durante cultivo heterotrófico em vinhaça.....	65
FIGURA 34. Perfil de glicose durante o cultivo heterotrófico de <i>Chlorella vulgaris</i> em vinhaça.....	66
FIGURA 35. Perfil de DQO durante o cultivo heterotrófico de <i>Chlorella vulgaris</i> em vinhaça.....	67
FIGURA 36. Perfis dos rendimentos $Y_{X/S}$ para as primeiras 10 horas de cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em vinhaça.....	68
FIGURA 37. Variação do pH durante cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> em vinhaça.....	71
FIGURA 38. Perfil das concentrações de potássio durante o cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i> em vinhaça.....	71
FIGURA 39. Perfil das concentrações de potássio durante o cultivo heterotrófico de <i>Chlorella vulgaris</i> em vinhaça.....	72
FIGURA 40. Meio de cultura BGN cultivado com <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i> após processo de coagulação com cloreto férrico.....	79
FIGURA 41. Vinhaça cultivada com <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i> após processo de coagulação com cloreto férrico.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Composição química média da vinhaça obtida a partir da fermentação de diferentes mostos.....	18
TABELA 2.	Composição do meio de cultivo BGN.....	21
TABELA 3.	Composição do meio de cultivo WC.....	22
TABELA 4.	Velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i> em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de glicose.....	30
TABELA 5.	Velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria <i>Chlorella vulgaris</i> em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de glicose.....	30
TABELA 6.	Velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i> em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de glicerol.....	40
TABELA 7.	Velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria <i>Chlorella vulgaris</i> em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de glicerol.....	41
TABELA 8.	Velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i> em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de acetato de potássio.....	50
TABELA 9.	Velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria <i>Chlorella vulgaris</i> em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de acetato de potássio.....	50
TABELA 10.	Caracterização de alguns parâmetros da vinhaça “in natura” utilizada nos experimentos.....	58

TABELA 11. Composição protéica e lipídica dos inóculos de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli e <i>Chlorella vulgaris</i> cultivados em meios BGN e WC.....	74
TABELA 12. Composição protéica e lipídica dos inóculos de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli e <i>Chlorella vulgaris</i> após cultivo heterotrófico em meio suplementado com glicose, glicerol e acetato e em vinhaça.....	75
TABELA 13. Remoção de turbidez e número de células de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada em meio BGN após processo de coagulação com cloreto férrico.....	78
TABELA 14. Remoção de DQO, turbidez e número de células de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada em vinhaça após processo de coagulação com cloreto férrico.....	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	3
	2.1 Objetivo geral	3
	2.2 Objetivos específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
	3.1 Microalgas	4
	3.2 Cultivo de microalgas	7
	3.3 Tratamento biológico de águas residuárias.....	13
	3.4 Vinhaça	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
	4.1 Inóculo	20
	4.2 Vinhaça	20
	4.3 Ensaios	22
	4.3.1 Cultivos mixotróficos.....	22
	4.3.2 Cultivos heterotróficos	24
	4.3.3 Cultivos em vinhaça.....	24
	4.4 Caracterização da biomassa microalgal	26
	4.5 Separação da biomassa	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
	5.1 Cultivos em meio de cultura suplementado com glicose.....	28
	5.1.1 Cultivo mixotrófico	28
	5.1.2 Cultivo heterotrófico	34
	5.2 Cultivos em meio de cultura suplementado com glicerol.....	38
	5.2.1 Cultivo mixotrófico	38
	5.2.2 Cultivo heterotrófico	43

5.3 Cultivos em meio de cultura suplementado com acetato de potássio.....	47
5.3.1 Cultivo mixotrófico	47
5.3.2 Cultivo heterotrófico	53
5.4 Cultivos em vinhaça.....	57
5.4 Caracterização da biomassa microalgal	74
5.5 Separação da biomassa	78
6 CONCLUSÕES.....	82
7 REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES	94

1 INTRODUÇÃO

“Microalga” é um termo genérico, sem efeito taxonômico, que envolve tanto organismos eucarióticos, como as algas microscópicas, quanto procarióticos, como cianobactérias, formalmente conhecidas como cianofíceas.

Por décadas estes micro-organismos têm sido estudados visando a produção de biomassa para diferentes aplicações. A primeira cultura de microalga foi estabelecida por Beijerinck, em 1980, constituindo-se na espécie *Chlorella vulgaris*. Em escala comercial, a produção de microalgas iniciou-se no Japão, na década de 60, com espécies do gênero *Chlorella* sp., visando a utilização como suplemento alimentar. A partir daí, o cultivo de microalgas passou a ser gradativo no mundo inteiro, destinando-se às mais variadas aplicações, como produção de proteínas unicelulares, lipídios, clorofila, carotenóides, enzimas, agentes antioxidantes, vitaminas, antibióticos etc. (BOROWITZKA, 1998; PULZ; GROSS, 2004; RICHMOND, 2004; TOMASELLI, 2004; QUEIROZ et al., 2011).

Recentemente estes micro-organismos passaram a ser vistos como agentes potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias, uma vez que possuem habilidade de remover matéria orgânica e nutrientes dos efluentes, incorporando-os à biomassa. Esta aplicação, entretanto, encontra limitações principalmente devido ao custo e operação dos sistemas autotróficos, além do fato das águas residuárias, de maneira geral, apresentarem turbidez elevada, dificultando a penetração de luz solar.

No entanto, a literatura reporta há algumas décadas que, embora sejam organismos naturalmente fotossintetizantes, algumas linhagens de microalgas apresentam a distinta capacidade de desenvolverem-se na ausência de luz a partir do consumo de moléculas orgânicas solúveis (FAY, 1983). Nestes tipos de cultivos, denominados mixotróficos e heterotróficos, substitui-se a fixação do CO₂ atmosférico que ocorre nas culturas autotróficas por uma fonte de carbono orgânico dissolvido no meio de cultura. Nesse sentido, glicose, acetato e glicerol são as fontes de carbono mais frequentemente utilizadas, havendo também a possibilidade do aproveitamento de águas residuárias. Contudo, a literatura ainda é pouco conclusiva no que diz respeito a faixa de concentração ideal das fontes de carbono que permita o desenvolvimento satisfatório destes micro-organismos sem efeito inibitório.

A vinhaça é um resíduo líquido proveniente da destilação da solução obtida do processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar, do melaço, ou da mistura destes. Dentre todos os resíduos gerados pela indústria sucroalcooleira é o que apresenta o maior impacto ambiental, uma vez que é gerada na proporção de cerca de 10 litros para cada litro de etanol produzido a partir dos processos convencionais de fermentação utilizados no Brasil (UNICA, 2011). A aplicação de vinhaça nos canaviais como fertirrigação é uma prática antiga e muito difundida, sendo relatados diversos benefícios de ordem química, física e biológica ao solo, bem como aumento da produtividade da cultura da cana-de-açúcar. O valor fertilizante da vinhaça advém fundamentalmente do elevado teor de potássio e, em segundo plano, da matéria orgânica contida no efluente. Entretanto, os mesmos elevados teores de potássio e matéria orgânica solúvel, aliados à elevada DQO e baixo pH desta água residuária, sugerem que sua aplicação no solo deve ser feita de maneira criteriosa.

Apesar do potencial da vinhaça como meio nutritivo, existem poucos estudos na literatura sobre sua utilização como meio de cultivo para micro-organismos. No tocante às microalgas, os pioneiros Oliveira e Cáceres (1986) e Oliveira (1988) relatam a utilização de vinhaça de cana-de-açúcar como complemento do meio de cultivo para espécies de água doce, em pesquisa realizada na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Mais recentemente, Barrocal et al. (2010) utilizaram vinhaça de beterraba como complemento do meio para cultivo de *Spirulina maxima*.

Chlorella vulgaris, uma clorofícea de água doce, é uma das microalgas mais estudadas no tratamento de água residuárias. Já *Aphanothece microscopica Nægeli* é uma cianobactéria de grande aplicação na valoração de resíduos agroindustriais no sul do Brasil, reconhecida pelo seu elevado teor protéico (“single cell protein”) e pelo potencial de remoção de matéria orgânica de efluentes agroindustriais em cultivos heterotróficos.

O presente estudo pretende aprofundar os conhecimentos a respeito do metabolismo heterotrófico destes micro-organismos, no que diz respeito à concentração ideal da fonte de carbono visando intensificar a produção de biomassa. Além disso, como aplicação prática no tratamento de águas residuárias, foi avaliado o crescimento das microalgas em vinhaça, considerada a principal água residuária da indústria sucroenergética, setor que encontra-se fortemente inserido na cidade de Araras/SP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o cultivo heterotrófico da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* e da clorofícea *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a cinética de crescimento das microalgas *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico suplementado com glicose, glicerol e acetato;
- Avaliar o consumo e incorporação dos substratos pelas microalgas em sistema heterotrófico nas condições previamente selecionadas pelos cultivos mixotróficos;
- Avaliar a cinética de crescimento e perfis de assimilação de glicose, DQO e potássio pela *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* em cultivo heterotrófico utilizando vinhaça;
- Caracterizar a biomassa microalgal obtida em termos de proteínas e lipídios;
- Avaliar a separação da biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* cultivada em vinhaça.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

O termo microalga engloba uma série de micro-organismos de natureza distinta, incluindo tanto organismos eucarióticos (algas verdes, vermelhas, diatomáceas e dinoflagelados) quanto procarióticos (algas verde-azuladas ou cianobactérias) (MADIGAN et al., 2004; TOMASELLI, 2004). Apesar da ocorrência estimada de mais de 50000 espécies de microalgas no mundo, apenas cerca de 30000 já foram reconhecidas e analisadas (RICHMOND, 2004).

Olaizola (2003) define que, para ser chamado de microalga, um organismo necessita ser pequeno (geralmente microscópico), unicelular (embora possa formar colônias com diferenciação de células), colorido (devido à fotossíntese e presença de pigmentos acessórios), ocorrer principalmente (mas não necessariamente) em água, e provavelmente, mas também não necessariamente, ser fotoautotrófico. Podem ser micro-organismos recentes ou muito antigos e, filogeneticamente, eucarióticos ou procarióticos.

As microalgas constituem um grupo extremamente heterogêneo, sendo encontradas em todo o mundo, principalmente em ambientes aquáticos, mas também na superfície de todos os tipos de solos. Embora sejam normalmente organismos de vida livre, algumas espécies podem viver em associação simbiótica com outros organismos (TOMASELLI, 2004). Embora exista uma grande diversidade, de todas as espécies distribuídas no mundo apenas cerca de 1000 cepas são mantidas em coleções, apenas algumas centenas têm sido investigadas quanto ao conteúdo bioquímico e poucas vêm sendo cultivadas em escala industrial (OLAIZOLA, 2003).

Tradicionalmente, as microalgas têm sido classificadas quanto ao tipo de pigmento, natureza química dos produtos de reserva e constituintes da parede celular, além de critérios citológicos e morfológicos (TOMASELLI, 2004). As microalgas eucarióticas apresentam estrutura celular simples e grande superfície volumétrica, o que lhes permite absorver grande quantidade de nutrientes. Devido à sua estrutura simplificada, são normalmente mais eficientes em converter a energia solar do que plantas superiores, embora o mecanismo da fotossíntese seja semelhante. Além disso, pelo fato de crescerem principalmente em suspensão aquosa, têm acesso mais eficiente a água, CO₂ e outros nutrientes (KHAN et al.,

2009).

Uma das vertentes dos estudos com microalgas refere-se ao seu cultivo visando a alimentação animal e humana, além da extração de compostos de elevado valor agregado, como ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides, ficofobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis, compostos bioativos naturais e toxinas com atividade biológica (PULZ; GROSS, 2004; DERNER et al., 2006; SPOLAORE et al., 2006; HARUN et al., 2010). Dentre os gêneros mais cultivados visando a nutrição humana destacam-se *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus*, atingindo uma produção de biomassa de cerca de 10000 toneladas por ano (BENEMANN, 2009). Neste sentido, a produção de microalgas em escala comercial teve início na década de 60, com o cultivo de diversas espécies visando a produção de suplementos alimentares (*Spirulina* sp. e *Chlorella* sp.), obtenção de β -caroteno (*Dunaliella salina*), e várias espécies para aplicação na aquicultura (BENEMANN, 1990).

Numa segunda vertente, as microalgas passaram a ser estudadas com relação ao seu potencial para produção de biocombustíveis. Por vários anos, estes micro-organismos têm sido estudados visando à produção de gás hidrogênio, metano e bioetanol. Mais recentemente, um dos principais focos das pesquisas refere-se à otimização do acúmulo de lipídios na forma de triglicerídios, os quais poderiam ser convertidos em biodiesel (CHISTI, 2007; CHISTI, 2008; RODOLFI et al., 2008; BENEMANN, 2009; WEN; JONHSON, 2009; HARUN et al., 2010). As células das microalgas possuem composição bioquímica diversificada em termos de carboidratos, proteínas e lipídios, os quais estão relacionados à natureza da espécie, fatores ambientais e meio de cultivo. Com relação à produção de biocombustíveis, o teor lipídico das microalgas é o fator mais importante e pode apresentar ampla variação, dependendo da espécie. *Botryococcus braunii*, por exemplo, pode atingir 75% da sua massa seca em lipídios, embora este acúmulo esteja associado à baixa produtividade em biomassa. Outras espécies, como *Chlorella*, *Dunaliella* e *Nannochloropsis*, atingem níveis entre 20 e 60%, mas com produtividades mais elevadas (CHISTI et al., 2007; MATA et al., 2010; HUANG et al., 2010).

Segundo Benemann (2009) o cultivo de microalgas em escala comercial visando a produção de biocombustíveis ainda é uma perspectiva de longo prazo, a qual necessita de esforços na área de pesquisa visando a redução dos custos de produção. Neste sentido, uma alternativa interessante seria aliar a produção de biocombustíveis com o tratamento de águas residuárias, que podem servir como meio de cultivo para o crescimento das algas, fornecendo os nutrientes essenciais para seu desenvolvimento (RODOLFI et al., 2008;

BENEMANN, 2009; WEN; JONHSON, 2009; XIN et al., 2010).

Uma terceira vertente, com estudos também iniciados na década de 60, refere-se à utilização de microalgas como agentes importantes na mitigação de problemas ambientais. Neste contexto existem trabalhos relativos ao seqüestro de carbono por cianobactérias (JACOB-LOPES et al., 2008) e ao tratamento de águas residuárias (Seção 3.3).

Microalgas e cianobactérias têm se mostrado agentes potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias, uma vez que possuem a habilidade de remover matéria orgânica e nutrientes dos efluentes incorporando-os à biomassa (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; DE-BASHAN; BASHAN, 2010). A utilização destes microorganismos na remoção da matéria orgânica e nutrientes de águas residuárias industriais vem sendo estudada devido aos baixos custos envolvidos, eficiência, valorização dos resíduos e obtenção de biomassa passível de ser utilizada, seja na fertilização dos solos, na forma de proteínas unicelulares ou na obtenção de biocombustíveis (TAM; WONG, 2000; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007).

Taxonomicamente, as algas procarióticas podem ser agrupadas nas divisões Cyanophyta e Prochlorophyta, enquanto as eucarióticas são agrupadas em Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta e Chlorophyta (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

O grupo das Chlorophytas ou algas verdes constitui o mais diversificado de todas as algas, tanto na morfologia quanto no histórico de vida, compreendendo cerca de 7000 espécies. Possuem clorofilas *a* e *b*, além de caroteno e várias xantofilas. A parede celular é composta por celulose e, assim como as plantas superiores, acumulam amido (α -1,4-glicano) como carboidrato de reserva. Apresentam cloroplastos envoltos por um envelope de duas membranas, sem retículo endoplasmático, e, dentro dos cloroplastos, tilacóides empilhados formando granas. Os representantes deste grupo habitam os mais diferentes nichos, estando presentes tanto em águas doces quanto marinhas, além de ambientes terrestres. O grupo engloba representantes macroscópicos e microscópicos e, na classe das Chlorophyceae, onde predominam os organismos de água doce, encontra-se a ordem Chlorococcales, caracterizada por organismos não flagelados, livres ou em colônias, onde situa-se o gênero *Chorella* sp. (CHAPMAN, 1977; RAVEN et al., 1992; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

As algas da divisão Cyanophyta são também conhecidas por cianobactérias pelo fato de pertencerem ao Reino Monera. Embora sejam organismos procariotos, são capazes de

realizar fotossíntese com produção de oxigênio da mesma forma que as algas eucarióticas. As cianobactérias são importantes componentes do fitoplâncton tanto em águas doces quanto marinhas, podendo ocasionalmente formar florações em corpos d'água eutrofizados. Além disso, estão presentes na maioria dos solos e em associações simbióticas com diatomáceas, samambaias, líquens e esponjas. Apresentam clorofila *a* como pigmento principal, além de β -caroteno e pigmentos acessórios conhecidos como ficobilinas, que podem ser azuis ou vermelhos. Os pigmentos acessórios encontram-se em estruturas conhecidas como ficobilissomas, as quais se localizam na superfície externa dos tilacóides. Os tilacóides se encontram livres no citoplasma e não são organizados em pilhas. A parede celular é composta por peptidoglicano e a reprodução estritamente assexuada, por divisão celular simples. Algumas linhagens possuem a habilidade de fixar nitrogênio atmosférico, conferindo a estes organismos as necessidades nutricionais mais simples de todos os seres conhecidos. O gênero *Aphanothece* sp. pertence a classe das Cyanophyceae, ordem Chroococcales (FOGG, 1977; SCHMETTERER, 1994; RAVEN et al., 1992; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

3.2 Cultivo de microalgas

Atualmente, o método mais comum para cultivo de microalgas é o crescimento autotrófico, uma vez que microalgas são seres fotossintetizantes, com algumas espécies especialmente eficientes em converter a energia solar (PEREZ-GARCIA et al., 2011a). Em cultivos autotróficos, as células das microalgas utilizam energia solar e CO₂ como fonte de carbono para realização da fotossíntese (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

Os sistemas utilizados para cultivo de microalgas são os tanques abertos e os fotobiorreatores. Os tanques ou lagoas abertas são os sistemas de cultivo mais simples e antigos, onde as microalgas se desenvolvem sob condições idênticas às do ambiente externo. Constituem-se de lagoas construídas artificialmente, com plástico, vidro ou concreto, dotadas de sistemas de agitação e aeração. Este sistema apresenta como vantagens os baixos custos de instalação e operação e a possibilidade de se trabalhar em grande escala, podendo até mesmo ser construídos em áreas degradadas não utilizadas pela agricultura. Como inconvenientes, são bastante dependentes das condições ambientais, como radiação solar e temperatura, suscetíveis às contaminações, além de

apresentarem custo elevado no tocante à recuperação da biomassa devido à baixa densidade de células.

Para superar estas limitações inerentes aos sistemas abertos de cultivo de microalgas surgiram os fotobiorreatores fechados, os quais possibilitam melhor controle de temperatura, pH e difusão de gases, além da manutenção de condições assépticas, reduzindo a possibilidade de contaminações e contribuindo para maior produtividade. Por outro lado, há um elevado custo inicial e limitação de volume (50-100L), uma vez que volumes maiores dificultam a dispersão da luz no seu interior. Assim, as células próximas às paredes do reator ficam expostas a altas intensidades de luz, enquanto as localizadas no centro ficam sob escuro, afetando a produtividade final dos cultivos (CHEN, 1996; ERIKSEN, 2008; HARUN et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

Em cultivos fotoautotróficos, a produtividade das culturas é limitada principalmente pela fonte de luz e pela baixa eficiência fotossintética, ou seja, conversão da energia luminosa em biomassa (ERIKSEN, 2008). Sob baixa iluminação, a energia disponível é insuficiente, enquanto sob elevada iluminação ocorre foto-inibição (YAN et al., 2011).

Em se tratando de tratamento de águas residuárias, a utilização de microalgas vem sendo estudada há décadas, mas encontra limitações devido ao custo das condições autotróficas. Além disso, como as águas residuárias normalmente apresentam turbidez elevada, a luz não penetra de maneira homogênea nos efluentes (HEREDIA-ARROYO et al., 2011).

Uma alternativa viável para culturas autotróficas em fotobiorreatores, mas restrita apenas a algumas espécies de microalgas, é a utilização de cultivos heterotróficos ou mixotróficos. Embora apresentem a fotossíntese como modelo metabólico preferencial, algumas linhagens de microalgas e cianobactérias são capazes de usufruir do metabolismo heterotrófico no escuro, consumindo moléculas orgânicas solúveis tais como açúcares, ácidos orgânicos e acetato (FAY, 1983; FAY, 1992; DUMAS et al., 1998; QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

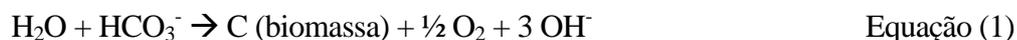
Segundo Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), os termos mixotrófico e foto-heterotrófico não são bem definidos, tendo uma diferença particular na fonte de energia necessária para suportar o crescimento e a produção de metabólitos específicos pelas microalgas. A fotoautotrofia envolve a utilização de luz como fonte única de energia, a qual

é convertida em energia química através de reações fotossintéticas (HATA et al., 2000). Sob estas condições de cultivo, a atividade fotossintética está intimamente relacionada ao crescimento, sendo que a luz pode ser considerada como um substrato, com sua intensidade influenciando a taxa específica de crescimento e frequentemente descrita pelos modelos de Monod ou Haldane, conforme observa-se ou não a foto-inibição (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). A heterotrofia, por sua vez, pode ser definida como a utilização somente de compostos orgânicos como fonte de carbono e de energia. Tal metabolismo consiste na substituição da fixação do CO₂ atmosférico que ocorre nos cultivos autotróficos pela adição de uma fonte de carbono orgânico no meio de cultivo, possibilitando o aumento da concentração de biomassa e sua produtividade (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011a). Droops (1974) e Kaplan et al. (1986), citados por Perez-Garcia et al. (2011a), definem como heterotróficos os organismos cujo substrato e necessidades energéticas são derivadas de compostos orgânicos sintetizados por outros organismos, ao passo que heterotrofismo refere-se a utilização de compostos orgânicos para o crescimento de determinado micro-organismo. Finalmente, o termo mixotrofia é definido como um processo metabólico em que a fotossíntese é a principal fonte de energia, embora tanto compostos orgânicos quanto CO₂ sejam essenciais. Sendo assim, um organismo mixotrófico é aquele capaz de assimilar compostos orgânicos como fonte de carbono enquanto utiliza compostos inorgânicos como doadores de elétrons (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). O regime mixotrófico é uma variante do heterotrófico, onde o CO₂ e o carbono orgânico são simultaneamente assimilados e ambos os metabolismos, respiratório e fotossintético, operam simultaneamente (LEE, 2004; KAPLAN et al., 1986 citado por PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

Segundo Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), várias tentativas têm sido feitas para explicar o mecanismo de crescimento mixotrófico das microalgas, particularmente com relação à contribuição das fases autotróficas e heterotróficas. Marquez et al. (1995), durante cultivo mixotrófico de *Spirulina platensis*, verificaram que a biomassa total produzida sob condições mixotróficas coincide com a soma das biomassas produzidas isoladamente em cultivos autotróficos e heterotróficos.

Num outro ponto de vista, os metabolismos envolvidos podem ser diferenciados de acordo com alterações no pH do meio de cultivo. No caso do metabolismo autotrófico, o pH do meio torna-se mais alcalino devido ao consumo de CO₂ (Equação 1); enquanto no heterotrófico torna-se mais ácido, devido ao CO₂ produzido a partir da fonte orgânica de

carbono (Equação 2). Em cultivos mixotróficos o valor do pH dependerá do metabolismo dominante, mas na maioria das vezes permanecerá aproximadamente constante (Equação 3) (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).



Segundo Perez-Garcia et al. (2011a), a utilização de sistemas heterotróficos para o cultivo de microalgas elimina as duas principais deficiências dos fotobiorreatores, uma vez que permite o uso de praticamente qualquer fermentador convencional como biorreator e reduz os custos de produção da biomassa, por ser independente da luminosidade e passível de utilização de águas residuárias com carga orgânica. Além disso é possível obter, heterotroficamente, elevadas concentrações celulares, o que torna mais viável o processo de produção de biomassa em grande escala. Com relação ao cultivo mixotrófico, além destas vantagens, há o benefício de permitir a produção de metabólitos fotossintéticos (CHEN, 1996).

Segundo Heredia-Arroyo et al. (2010), os cultivos heterotróficos e mixotróficos de microalgas são menos estudados do que o cultivo convencional devido à necessidade de uma fonte orgânica de carbono, o que poderia competir com a dieta humana. Assim, torna-se necessário buscar espécies capazes de crescer a partir de fontes de carbono simples ou resíduos agro-industriais.

Ao mesmo tempo em que diversas fontes de carbono têm sido propostas para o cultivo heterotrófico de microalgas, uma avaliação prática mostra que somente poucos substratos são passíveis de uso pelos micro-organismos (PEREZ-GARCIA et al., 2011a). As fontes de carbono frequentemente utilizadas para os cultivos heterotróficos e mixotróficos de microalgas são glicose, acetato e glicerol, além da utilização direta de águas residuárias (HEREDIA-ARROYO et al., 2010; HEREDIA-ARROYO et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011a; PEREZ-GARCIA et al., 2011b). Entretanto, informações sobre a concentração inicial ou faixa necessária para o crescimento heterotrófico são ainda muito dispersas (PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

A glicose é a fonte de carbono mais comumente utilizada, tanto para microalgas como outras espécies de micro-organismos. Em geral, quando se utilizam outros

substratos, as microalgas requerem um período de adaptação, representado pela extensa fase lag, necessária para a síntese das enzimas e dos sistemas de transporte específicos para a assimilação e o consumo das moléculas. Uma vez que a glicose é considerada o substrato preferido pelas microalgas, o consumo das outras fontes de carbono pode ser reduzido na sua presença, já que as enzimas que catalisam o consumo de substratos alternativos são dificilmente sintetizadas nessas condições (LEWIN; HELLEBUST, 1978; RATLEDGE et al., 2001; NARANG; PILLYUGIN, 2005 citados por PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

Em cultivos mixotróficos, a maioria das microalgas e cianobactérias utiliza o período escuro para ajuste da fotossíntese e dos mecanismos de biossíntese, para uma posterior fase ativa na presença de luz (ARDELAN; ZARNEA, 1998; ZAK et al., 2001). O glicogênio é o principal carboidrato de reserva, podendo, assim como glicose exógena, ser convertido em glicose-6-fosfato e metabolizado via respiratória. Algumas enzimas do Ciclo de Krebs são detectadas com atividades extremamente baixas e o metabolismo no escuro está ligado à presença de oxigênio, sendo que a principal rota é a Via das Pentose-fosfato. A glicose 6-fosfato é oxidada e descarboxilada em ribulose 5-fosfato. As reações são catalisadas pela glicose 6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogluconato-desidrogenase, respectivamente. Ambas as enzimas estão presentes em altas concentrações nas cianobactérias e duas moléculas de NADPH são geradas, com subsequente oxidação na cadeia respiratória, rendendo 2 ATPs. Análises dos extratos celulares revelaram que a ribulose-1,5-difosfato é forte inibidora da glicose 6-fosfato-desidrogenase, a primeira enzima da via oxidativa (PELROY; BASSHAM, 1973). A transferência das culturas para cultivo no escuro está ligada ao imediato desaparecimento deste metabólito, com ativação da via metabólica oxidativa. Os componentes da cadeia respiratória parecem estar presentes nas cianobactérias, apesar das poucas informações sobre o fluxo de elétrons entre NADPH e oxigênio (FAY, 1983). No entanto, sabe-se que a síntese de ATP no escuro é dependente do oxigênio (fosforilação oxidativa) e encontra-se ligada à cadeia de transporte de elétrons. Além do metabolismo energético no escuro apresentar dependência em relação ao oxigênio de forma diferenciada, seu consumo no período escuro não é necessariamente devido à respiração, podendo ocorrer, por exemplo, a oxidação de aminoácidos (SCHMETTERER, 1994).

À medida que as cianobactérias têm se tornado extremamente úteis na

elucidação de estudos do mecanismo fotossintético, há um acréscimo de atenção ao fato de que estas células são as únicas capazes de realizar respiração aeróbia e fotossíntese nos mesmos compartimentos. Assim, não parece existir uma cadeia de transporte de elétrons exclusiva para respiração, sendo que diversos produtos são utilizados nas vias fotossintéticas e respiratórias (SCHMETTERER, 1994).

Independente do substrato orgânico ou da espécie de microalga utilizada, o suprimento de oxigênio é considerado fator-chave para o cultivo heterotrófico de microalgas, sendo que sua limitação pode reduzir a velocidade específica de crescimento e a produtividade de biomassa das culturas (WU; SHI, 2007; PEREZ-GARCIA et al., 2011a). A transferência de oxigênio para as células é um dos fenômenos mais importantes para manutenção dos micro-organismos aeróbios. Assim, o coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (K_{La}) é a variável mais importante a ser considerada nestes processos (MONTES et al., 1999; GALACTION et al., 2004). Apesar de ser uma ferramenta fundamental no estudo do escalonamento de processos aeróbios, a estimativa do K_{La} em cultivos com cianobactérias e/ou microalgas é objeto de raros estudos (GANTZER; MAIER, 1988; BASTOS; QUEIROZ, 2008). A literatura indica baixas taxas de consumo de oxigênio para cianobactérias em cultivo heterotrófico e este fenômeno parece estar ligado à via oxidativa usada por estes micro-organismos (BASTOS; QUEIROZ, 2008; BASTOS et al., 2009b). Do ponto de vista prático, estas baixas taxas de consumo de oxigênio tornam-se interessantes no escalonamento visando a aplicação destes micro-organismos no tratamento de águas residuárias, devido às baixas exigências de aeração.

A principal limitação prática dos sistemas de cultivo industrial de microalgas e cianobactérias refere-se à recuperação da biomassa final (DE-BASHAN; BASHAN, 2010). Buscando solucionar este problema, têm sido estudadas técnicas de imobilização celular e processos de separação da biomassa suspensa por coagulação-floculação (LEE et al. 1998; GRIMA et al. 2003; MORENO-GARRIDO, 2008). Bastos et al. (2010b) verificaram a viabilidade de imobilização da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em esferas de alginato de 0,7mm, evidenciado pelo consumo de glicose seguindo comportamento não limitante de ordem zero. Em outro trabalho, Matos e Bastos (2011) verificaram ligeiro decréscimo do tamanho médio das partículas de alginato de cálcio no cultivo de *Aphanothece* em vinhaça, o que não influenciou o consumo heterotrófico de glicose do meio e o crescimento da cianobactéria.

As células das microalgas carregam em sua superfície uma carga negativa que impede sua agregação quando em suspensão. Esta carga pode ser neutralizada pela adição de determinados produtos químicos catiônicos, conhecidos como floculantes, que são capazes de coagular as células das algas sem afetar sua composição química (HARUN et al., 2010).

O floculante ideal deve ter baixo custo, ser atóxico e eficaz em baixa concentração. Dentre os sais mais comumente utilizados, destacam-se sulfato de alumínio $[Al_2(SO_4)_3]$, cloreto férrico ($FeCl_3$) e sulfato férrico $[Fe_2(SO_4)_2]$ (GRIMA et al., 2003; HARUN et al., 2010). Neste sentido, trabalhando com sais de ferro e alumínio na floculação de microalgas e cianobactérias, Manetti (2008) e Papazi et al. (2010) obtiveram resultados promissores. Manetti (2008) utilizou *Aphanothece microscopica Nägeli* no tratamento do efluente de processamento de pescado e, posteriormente, avaliou o efeito de coagulantes na separação da biomassa desta cianobactéria. O autor verificou remoções de 85; 97 e 93% de DQO, turbidez e sólidos suspensos, respectivamente, utilizando 300 mg.L^{-1} de $FeCl_3$. Papazi et al. (2010), com o objetivo de desenvolver um método fácil e eficiente para recuperação da biomassa da microalga *Chlorella minutissima*, avaliaram a capacidade de doze sais na coagulação das células da microalga. Os autores avaliaram concentrações de 0 a 5 g.L^{-1} de cada um dos sais em 20mL de meio de cultura e observaram que, embora os sais de alumínio foram mais eficientes na coagulação, alguns causaram lise celular, mostrando-se inadequados para o processo. Ferro e de zinco também apresentaram resultados, embora os sais férricos em concentrações superiores a 1 g.L^{-1} tenham levado à alterações na coloração das células, enquanto os sais de zinco levaram à formação de agregados celulares na superfície do recipiente.

3.3 Tratamento biológico de águas residuárias

O rápido desenvolvimento das atividades humanas gera elevados volumes de efluentes urbanos e industriais. Tais efluentes não podem ser despejados diretamente nos corpos d'água sem um tratamento adequado que vise reduzir os contaminantes ali presentes a níveis ambientalmente seguros. Além disso, atenção especial deve ser dada à presença de substâncias inorgânicas que favorecem o crescimento vegetal, tais como nitrogênio e fósforo, uma vez que a presença destes nutrientes pode levar à eutrofização

dos corpos d'água receptores, contribuindo para deterioração da qualidade destas águas (MARTÍNEZ et al., 2000; LODI et al., 2003; ASLAN; KAPDAN, 2006; XIN et al., 2010). O tratamento de águas residuárias é normalmente um procedimento que apresenta custos envolvendo a remediação e a disposição da biomassa gerada. Sendo assim, novos processos de remoção de nutrientes e matéria orgânica vêm sendo estudados de modo a combinar estratégias de despoluição e obtenção de produtos biotecnológicos com maior valor agregado (QUEIROZ et al., 2001; MANETTI, 2008; QUEIROZ et al., 2011).

Com relação à presença de nutrientes, o nitrogênio é geralmente removido das águas residuárias por processos físico-químicos e biológicos (BOAVENTURA et al., 2001; AYAZ; AKÇA, 2001), tais como eliminação de amônia em condições alcalinas e altas temperaturas, troca iônica, osmose reversa, eletrodíálises e lagoas de estabilização. Entretanto, a maioria destes métodos não é totalmente eficiente, pois não carreiam as diferentes formas de nitrogênio das águas, representando a perda deste nutriente (ORTIZ et al., 1997).

O meio de cultivo para microalgas deve fornecer nutrientes suficientes para o seu crescimento, dentre os quais os mais importantes são carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (WANG et al., 2008). As águas residuárias agro-industriais geralmente apresentam estes nutrientes, o que sugeriria a sua utilização como meio de cultivo para estes micro-organismos. Nesse contexto, Kumar et al. (2010), avaliando a influência da quantidade de nutrientes e frequência de alimentação de um meio sintético (fonte inorgânica) e um efluente digerido da suinocultura (fonte orgânica) no crescimento de *Chlorella vulgaris*, verificaram que não houve diferença entre os meios orgânico e inorgânico na produção da microalga, concluindo que elevado crescimento pode ser alcançado em pouco tempo desde que haja quantidades suficientes de nutrientes para os micro-organismos. Wang et al. (2008) afirmam que águas residuárias e efluentes secundários constituem fontes de nitrogênio de baixo custo para o cultivo de microalgas, uma vez que contêm grandes quantidades de diferentes formas deste nutriente.

Assim, a utilização de microalgas tem sido proposta para remover nutrientes inorgânicos de águas residuárias por incorporação à biomassa, sendo que, em alguns casos, é possível converter a biomassa cultivada em subproduto útil (LODI et al., 2003; MARTÍNEZ et al., 2010; XIN et al., 2010). Para Aslan e Kapdan (2006) as vantagens de se utilizar microalgas na remoção de fósforo e nitrogênio incluem o baixo custo de operação e a possibilidade de aproveitamento dos nutrientes assimilados na biomassa das algas, evitando

o problema de tratamento do lodo e descarga dos efluentes em corpos d'água.

A absorção é o principal mecanismo de remoção de nutrientes pelas microalgas, existindo uma relação direta entre a velocidade específica de crescimento dos microorganismos e a remoção de nutrientes. Entretanto, nitrogênio e fósforo poderão ser utilizados para o crescimento celular e removidos de forma eficiente somente se a água residuária apresentar relação N/P apropriada (XIN et al., 2010).

Dentre os vários gêneros de microalgas, *Chlorella* e *Scenedesmus* têm sido as mais frequentemente estudadas na remoção de nutrientes de águas residuárias. Tam e Wong (1996), avaliando diferentes concentrações de amônia no crescimento e remoção de amônia do meio por *Chlorella vulgaris*, verificaram máxima remoção de 53% do nitrogênio amoniacal a 20°C. Os autores observaram que a redução no teor de nitrogênio acompanhou o crescimento da microalga, indicando que houve absorção e assimilação do nutriente. González et al. (1997), avaliando a remoção de amônia e fósforo de uma água residuária oriunda de uma indústria de laticínios e suinocultura pelas microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus dimorphus*, observaram alta remoção de amônia (90%) e moderada de fosfato (55%). Martínez et al. (2000), avaliando a remoção de nitrogênio de efluentes artificiais pela microalga *Scenedesmus obliquus*, constataram influência da temperatura e máximos de remoção de 99% em 188 horas, a 25 e 30°C em frascos agitados.

De-Bashan et al. (2002) avaliaram a eficiência de remoção de amônia e fósforo de água residuária sintética pela microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato. Esses autores estudaram também a associação da microalga com a bactéria promotora de crescimento *Azospirillum brasilense* e verificaram que tanto a associação quanto a utilização somente da microalga foram eficientes na remoção do nitrogênio amoniacal, porém não na remoção do fosfato.

Kim et al. (2010), avaliando a capacidade de *Chlorella vulgaris* em remover nitrogênio, na forma do íon amônio, de um efluente de uma planta de tratamento em Cincinnati, Ohio, USA, verificaram remoções de até metade da concentração de nitrogênio em 48 horas.

Feng et al. (2011), avaliando a produção de lipídios por *Chlorella vulgaris* cultivada em água residuária sintética verificaram que, ao mesmo tempo em que foi possível obter produtividade lipídica de 147 mg.(L.d)⁻¹, houve remoção de 86% de DQO, 97% de N-NH₄⁺ e 96% de fosfato total, com os melhores resultados sendo verificados durante a fase de crescimento exponencial, com alta densidade celular e crescimento vigoroso das células da

microalga.

Além de fósforo e nitrogênio, as microalgas têm sido frequentemente relatadas como micro-organismos potenciais para remoção de íons metálicos e metais pesados de águas residuárias (TAM et al., 2001; HARUN et al., 2010). Estes sistemas são eficientes especialmente a baixas concentrações de metais, apresentam baixo custo e são ambientalmente corretos. O mecanismo de remoção de íons metálicos de soluções aquosas por microalgas baseia-se na biossorção, a qual ocorre em dois estágios: adsorção rápida e passiva na superfície, seguida de lento consumo metabólico dos íons no interior das células. A grande vantagem do estudo de células viáveis para remoção de íons metálicos é justamente o contínuo consumo metabólico para a adsorção física. Tam et al. (2001), avaliando a remoção de níquel a partir de duas espécies de *Chlorella* em dez sucessivos ciclos, observaram remoção de até 70% ao final do décimo ciclo. O conteúdo total de níquel acumulado correspondeu a mais que 0,9% da massa seca das células e a formação de clorofila-a foi inibida pela contínua adsorção do metal.

O tratamento simultâneo de carbono e nitrogênio de águas residuárias agroindustriais por incorporação dos nutrientes à biomassa vem sendo investigado como alternativa aos processos convencionais de despoluição (MARTÍNEZ et al., 2000). Neste sentido, a aplicação de cianobactérias destaca-se devido as suas exigências nutricionais e metabolismo versátil (DUMAS et al., 1998; QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006).

A *Aphanothece microscopica Nägeli* é uma cianobactéria de grande ocorrência nos corpos hídricos adjacentes à cidade de Rio Grande/RS e tem sido estudada com relação à produção de proteínas unicelulares, remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007) e de indústrias de pescado visando reúso das águas (MANETTI, 2008). Queiroz et al. (2001), avaliando o potencial de remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz pela *Aphanothece microscopica Nägeli*, constaram máximos de remoção em 24 horas de cultivo a 3000 lux de luminosidade e 30°C. Segundo Queiroz et al. (2002) esta cianobactéria é capaz de desenvolver-se no escuro a partir da matéria orgânica presente neste efluente. Mais recentemente, a *Aphanothece* foi cultivada em fotobiorreatores visando o seqüestro de carbono (JACOB-LOPES et al., 2008) e avaliada quanto ao conteúdo de lipídios e perfil de ácidos graxos da biomassa visando a produção de biodiesel (FRANCISCO et al., 2010).

3.4 Vinhaça

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar, produzindo na safra 2011/2012 um volume de 22,9 bilhões de litros (CONAB, 2012). Neste processo podem ser utilizados mostos de melaço, caldo ou misto. O mosto é submetido à fermentação etanólica, principalmente por leveduras do gênero *Saccharomyces*, obtendo-se o vinho. Após separação das leveduras, o vinho é submetido ao processo de destilação para obtenção do etanol. Durante o processo de destilação, a corrente de fundo da coluna recebe o nome de vinhaça.

Tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo, a vinhaça representa a principal água residuária do setor sucroenergético, uma vez que é produzida na proporção de aproximadamente 10 litros para cada litro de etanol produzido, pelos processos convencionais de fermentação utilizados no Brasil (UNICA, 2011).

A composição química da vinhaça é bastante variável, dependendo da natureza e composição da matéria-prima, do sistema usado no preparo do mosto, do sistema de condução da fermentação e da composição do vinho. Entretanto, de maneira geral, a vinhaça apresenta elevados teores de matéria orgânica e de potássio, seguido do cálcio, sulfatos, nitrogênio, fósforo e magnésio (FREIRE; CORTEZ, 2000; CAZETTA; CELLIGOI, 2005). A Tabela 1 apresenta a composição química de vinhaças oriundas da fermentação a partir de mostos de melaço, de caldo e misto.

Em virtude dos elevados teores de matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade, altos índices de DBO e DQO, além da elevada temperatura com que sai dos destiladores, a vinhaça caracteriza-se pelo seu alto poder poluente (FREIRE; CORTEZ, 2000; SILVA et al., 2007).

Após proibição do despejo de vinhaça diretamente nos cursos d'água (Decreto Lei 303/1967), este efluente passou a ser aplicado nas chamadas “áreas de sacrifício”, locais próximos às destilarias que se tornavam praticamente inutilizáveis para a agricultura, principalmente pelo efeito de salinidade do solo. Com o surgimento do PROÁLCOOL e a conseqüente expansão da indústria sucroalcooleira no país, com aumento significativo da produção de etanol e vinhaça, surgiu a necessidade de se dar um destino adequado ao efluente, que encontrou seu lugar como fonte de nutrientes para a própria cultura da cana-de-açúcar através da fertirrigação (CORTEZ et al., 1992). A aplicação de vinhaça no solo fornece uma série de benefícios de natureza química, física

e biológica, como aumento da disponibilidade de alguns elementos, aumento da CTC (capacidade de troca catiônica), pH e teor de matéria orgânica no solo, com conseqüente melhoria no seu estado de agregação e aumento da capacidade de infiltração de água (FREIRE; CORTEZ, 2000; SILVA et al., 2007; ZAYAS et al., 2007).

Tabela 1. Composição química média da vinhaça obtida a partir da fermentação de diferentes mostos (GLÓRIA; ORLANDO FILHO, 1984, citados por FREIRE; CORTEZ, 2000).

Elemento	Melaço	Misto	Caldo
N (kg.m ⁻³)	0,77	0,46	0,28
P ₂ O ₅ (kg.m ⁻³)	0,19	0,24	0,20
K ₂ O (kg.m ⁻³)	6,00	3,06	1,47
CaO (kg.m ⁻³)	2,45	1,18	0,46
MgO (kg.m ⁻³)	1,04	0,53	0,29
SO ₄ (kg.m ⁻³)	3,73	2,67	1,32
Matéria orgânica (kg.m ⁻³)	52,04	32,63	23,44
Fe (mg.L ⁻¹)	80,00	78,00	69,00
Cu (mg.L ⁻¹)	5,00	21,00	7,00
Zn (mg.L ⁻¹)	3,00	19,00	2,00
Mn (mg.L ⁻¹)	8,00	6,00	7,00
pH	4,40	4,10	3,70

Apesar dos efeitos benéficos, é necessário que se tenha prévio conhecimento do volume adequado de vinhaça a ser aplicada no solo, já que seu excesso pode acarretar efeitos nocivos e queda na produtividade da cultura. Atualmente, a disposição de vinhaça no solo é regulada pelo seu teor de potássio, uma vez que altas concentrações deste íon contribuem para saturação do solo (CETESB, 2006).

Apesar do seu potencial como meio nutritivo, há poucos estudos na literatura acerca da utilização de vinhaça como substrato para o cultivo de micro-organismos, principalmente com o objetivo de despoluição desta água residuária. Navarro et al. (2000) utilizaram vinhaça concentrada como complemento do meio de cultivo para fermentação etanólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Cazetta e Celligoi (2005 e 2009)

utilizaram melão e vinhaça para o cultivo de leveduras e bactérias visando a produção de proteínas e lipídios pelos micro-organismos, com resultados promissores.

Com relação a microalgas, Oliveira e Cáceres (1986), em trabalho pioneiro na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), utilizaram vinhaça diluída para o cultivo de oito espécies de algas de água doce. Durante 30 dias, os autores compararam o crescimento das microalgas cultivadas em solução de vinhaça com as cultivadas em meio sintético e observaram que, das oito espécies estudadas, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus* foram capazes de desenvolver-se melhor em solução de vinhaça do que no meio sintético, atingindo maior concentração celular. Para as outras espécies, o crescimento em solução de vinhaça e em meio sintético foi semelhante ou levemente inferior. Dando seqüência a este trabalho, um dos autores, em sua dissertação de mestrado, aprofundou os estudos com *Chlorella vulgaris*, avaliando parâmetros de adequação da vinhaça para o crescimento heterotrófico e mixotrófico desta microalga. Nas condições ideais (1 g.L⁻¹ de vinhaça, 800 µM de uréia, 10⁵ células.mL⁻¹ e pH 7) o autor verificou crescimento mixotrófico equivalente ao cultivo fotossintético, além do acúmulo de carboidratos pelas células em condições heterotróficas (OLIVEIRA, 1988). Ainda segundo este trabalho, o cultivo de microalgas, especialmente em resíduos líquidos ricos em nutrientes, constitui uma possibilidade promissora de obtenção de uma fonte considerável de compostos e elementos essenciais à nutrição humana, ao mesmo tempo em que possibilita uma forma de combate à poluição dos recursos hídricos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Inóculo

O inóculo da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* foi mantido e propagado no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/CCA/UFSCar) em meio BGN (Braun-Grunow Medium) (RIPKA et al., 1979), assim como o inóculo de *Chlorella vulgaris* em meio WC (Water Culture) (GUILLARD; LORENZEN, 1972). A composição dos meios de cultivo de manutenção e propagação das microalgas é apresentada nas Tabelas 2 e 3. Os pHs foram ajustados com solução de NaOH 1N e os meios esterilizados por 20 minutos a 121°C em autoclave. Previamente a realização de cada experimento foi realizada contagem celular em Câmara de Neubauer para verificar a concentração inicial de células e a pureza dos inóculos.

As suspensões microbianas foram monitoradas ainda pela turbidez mediante leitura em turbidímetro Tecnopon¹. Com os dados obtidos, foram geradas correlações entre concentração celular (cél.mL⁻¹) e turbidez (NTU), as quais foram utilizadas para acompanhar o crescimento das microalgas nos ensaios iniciais utilizando meios BGN e WC.

4.2 Vinhaça

A vinhaça utilizada nos experimentos foi obtida junto a uma Usina de Açúcar e Álcool da região de Araras/SP, diretamente de colunas de destilação a aproximadamente 95°C. As amostras foram imediatamente acondicionadas em garrafas de 2L e congeladas no LABMAC/CCA/UFSCar, permanecendo desta forma até o momento da sua utilização. Anteriormente a cada experimento, as amostras de vinhaça passaram por pré-tratamento incluindo hidrólise ácida, ajuste de pH e esterilização. A hidrólise foi feita pela adição de HCl em banho termostatizado a 60°C. Após a hidrólise, o pH foi ajustado em 7,4-7,6 para cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* ou

¹ Qualquer referência específica às marcas e produtos registrados não constitui endosso.

6,5 para cultivo da *Chlorella vulgaris*, utilizando soluções de NaOH. A amostra de vinhaça pré-tratada foi então esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Tabela 2. Composição do meio de cultivo BGN (RIPKA et al., 1979).

Espécie	Solução estoque	Volume da solução estoque
K ₂ HPO ₄	3 g.100mL ⁻¹	1 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g.100mL ⁻¹	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6 g.100mL ⁻¹	1 mL
Citrato de amônio férrico	0,6 g.100mL ⁻¹	1 mL
Na ₂ EDTA	0,1 g.100mL ⁻¹	1 mL
Ácido cítrico	0,6 g.100mL ⁻¹	1 mL
Na ₂ CO ₃	2 g.100mL ⁻¹	1 mL
NaNO ₃	15 g.100mL ⁻¹	10 mL
NaCl	7,2 g.100mL ⁻¹	1 mL
<u>Metais Traços</u>		1 mL
H ₃ BO ₃	2,860 g.L ⁻¹	
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,810 g.L ⁻¹	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222 g.L ⁻¹	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,390 g.L ⁻¹	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079 g.L ⁻¹	
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,040 g.L ⁻¹	
Água destilada	980mL	
pH	7,4 – 7,6	

Tabela 3. Composição do meio de cultivo WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972).

Espécie	Solução estoque	Volume da solução estoque
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,68 g.100mL ⁻¹	1 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7 g.100mL ⁻¹	1 mL
Na ₂ HCO ₃	1,26 g.100mL ⁻¹	1mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	11,14 g.100mL ⁻¹	1mL
NaNO ₃	8,5 g.100mL ⁻¹	1mL
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	2,12 g.100mL ⁻¹	1mL
<u>Solução de ferro</u>		
Na ₂ EDTA	4,36 g.1000mL ⁻¹	1mL
FeCl ₃ .H ₂ O	3,15 g.1000mL ⁻¹	
<u>Solução de micronutrientes</u>		
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18 g.1000mL ⁻¹	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006 g.1000mL ⁻¹	
H ₃ BO ₃	1 g.1000mL ⁻¹	1mL
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g.1000mL ⁻¹	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022 g.1000mL ⁻¹	
CoCl ₂ .H ₂ O	0,01 g.1000mL ⁻¹	
<u>Solução de vitaminas</u>		
Tiamina HCl	0,1 g.1000mL ⁻¹	1mL
Biotina	0,0005 g.1000mL ⁻¹	
Água destilada		1000mL
pH		6,5

4.3 Ensaios

4.3.1 Cultivos mixotróficos

Os ensaios foram realizados com *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella*

vulgaris em frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 150 mL de meio de cultura (BGN ou WC, para *A. microscopica* e *C. vulgaris*, respectivamente), 10% v/v de inóculo (10^5 cél.mL⁻¹) e uma fonte de carbono orgânico. As fontes de carbono utilizadas foram glicose p.a. (C₆H₁₂O₆), acetato de potássio p.a. (CH₃COOK) e glicerol p.a. (C₃H₈O₃) nas seguintes concentrações:

- Glicose: 0 - 12,5 - 25 - 37,5 - 50 g.L⁻¹;
- Acetato de potássio: 0,5 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 g.L⁻¹;
- Glicerol: 0,46 - 0,92 - 4,6 - 9,2 - 46 g.L⁻¹.

Os ensaios foram conduzidos em estufa de fotoperíodo Eletrolab, a 25°C com fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro) e fluxo luminoso de 30μmol/m².s (aproximadamente 1500 lux) durante 75 horas. Os frascos foram mantidos sob aeração forçada de 1VVM (volume de ar por volume de líquido por minuto) e, periodicamente, as amostras eram coletadas para determinação da concentração celular por contagem direta em microscópio com Câmara de Neubauer. Através do perfil de concentração celular foram obtidas as velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) pela inclinação do ajuste linear das curvas semi-logarítmicas.

O efeito da concentração dos substratos orgânicos foi avaliado pelo Modelo de Monod (Equação 4) e pelo Modelo de Haldane (Equação 5), onde S é a concentração de substrato (g.L⁻¹), k_S a constante de Monod (g.L⁻¹) e k_I a constante de inibição (g.L⁻¹). A concentração ótima de substrato (S_{mi}) foi calculada considerando os efeitos de inibição pelo substrato a partir da Equação 6, conforme proposto por Shi et al. (1999).

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{k_S + S} \quad \text{Equação (4)}$$

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{k_S + S + \frac{S^2}{k_I}} \quad \text{Equação (5)}$$

$$S_{mi} = \sqrt{k_S k_I} \quad \text{Equação (6)}$$

4.3.2 Cultivos heterotróficos

Os ensaios heterotróficos partiram das condições de concentração dos substratos selecionadas nos cultivos descritos no item 4.3.1. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 150 mL de meio com 10% v/v de inóculo (10^5 cél.mL⁻¹) em BGN e WC para *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, suplementados com uma fonte de carbono orgânico na concentração previamente definida. Os ensaios foram conduzidos em estufas de cultura Tecnal, modelo TE-392/1, a 25°C e aeração forçada de 1 VVM durante aproximadamente 40 horas. Para garantir as condições heterotróficas os frascos foram envoltos em papel laminado que impedia qualquer fluxo luminoso. Periodicamente, amostras foram coletadas para monitoramento e análise dos perfis de biomassa e substrato.

A concentração celular foi obtida por contagem direta das amostras em microscópio com Câmara de Neubauer. As velocidades específicas de crescimento máximas foram determinadas pela inclinação da região linear da curva semi-logarítmica concentração celular vs. tempo. As amostras foram filtradas para avaliação do consumo de substratos. Para glicose e glicerol utilizaram-se filtros de 0,45 µm, com monitoramento através dos métodos enzimáticos glicose oxidase-peroxidase e triglicerídeos, respectivamente, com kit LABORLAB[®], a partir das especificações do fabricante e usando curva-padrão para cada reativo. Para o acetato de potássio utilizou-se filtros de 0,2 µm, sendo que 20 µL de amostra filtrada foi injetado em um Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) Shimadzu no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (DPB/FEQ/UNICAMP). O HPLC foi equipado com uma coluna de 7,8 mm × 300 milímetros Aminex HPX-87H (Bio-Rad) e a fase móvel utilizada foi composta de uma solução de H₂SO₄ 0,004 mol.L⁻¹ bombeada a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹ (MACEDO, 2011).

4.3.3 Cultivos em vinhaça

A vinhaça utilizada foi primeiramente avaliada quanto a diferentes condições de pré-tratamento, conforme sugerido por trabalhos anteriores (BASTOS et al., 2009a). Para isto realizaram-se testes utilizando ácido clorídrico (HCl) 1N e p.a. em diferentes

tempos de incubação das amostras em banho termostático (Ética 501-D). A eficiência da hidrólise foi avaliada a partir do conteúdo de glicose obtido na vinhaça pré-tratada, utilizando o método enzimático glicose oxidase-peroxidase, com kit LABORLAB[®] já descrito no item 4.3.2.

Para o HCl 1N foram avaliadas as proporções ácido:vinhaça 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10, enquanto para o HCl concentrado as proporções ácido:vinhaça foram 1:2, 1:20 e 1:71. As amostras foram mantidas em banho termostático a 60°C durante 15 minutos, utilizando vinhaça bruta como controle. Na melhor proporção ácido:vinhaça verificada no teste inicial, partiu-se para avaliação do tempo de permanência das amostras no banho termostático, variando de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 50 minutos.

Os ensaios em vinhaça foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 150 mL de meio com 10% v/v de inóculo (10^6 cél.mL⁻¹) em condições heterotróficas. Os frascos foram envoltos em papel laminado e mantidos em estufa Tecnal, modelo TE-392/1, a 25°C com aeração forçada de 1VVM durante o período de 30 horas. Periodicamente, amostras foram coletadas para serem avaliadas quanto aos perfis de biomassa, pH, DQO, glicose e potássio. A concentração de biomassa foi estimada por gravimetria, determinando o teor de massa seca a 105°C por 24h conforme metodologia proposta pelo Standard Methods (APHA, 2005), descontando-se a quantidade de sólidos presentes na amostra de vinhaça. As velocidades específicas de crescimento máximas foram determinadas pela inclinação da região linear da curva semi-logarítmica biomassa vs. tempo.

As amostras foram centrifugadas a 711xg por 30 minutos em centrífuga Centribio, modelo TDL 80-2B, tendo o sobrenadante coletado para as demais análises.

O teor de glicose foi monitorado através do método enzimático glicose oxidase-peroxidase, com kit LABORLAB[®]. A demanda química de oxigênio (DQO) foi avaliada pelo método colorimétrico em refluxo fechado, sendo as amostras acrescidas de solução digestora (H₂SO₄ + K₂Cr₂O₇) digeridas durante 2 horas em bloco digestor (Modelo MA 4004, Marconi) a 150°C, com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (Modelo SP-22, Biospectro) a 600 nm. As curvas-padrão para análise de DQO foram construídas utilizando biftalato de potássio. Os teores de potássio foram determinados em fotômetro de chama (Modelo B262, Micronal), construindo-se curvas-padrão com cloreto de potássio (APHA, 2005).

A incorporação de glicose e potássio, assim como a remoção de DQO do meio

foram avaliadas através dos seus perfis durante os cultivos. O rendimento de DQO em biomassa ($Y_{X/S}$) foi quantificado de acordo com a Equação (7), calculando-se as taxas de crescimento (r_x) e consumo (r_s) através da derivada do ajuste polinomial X vs. tempo e DQO vs. tempo, respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{(dx/dt)}{(-ds/dt)} = \frac{r_x}{r_s} \quad \text{Equação (7)}$$

4.4 Caracterização da biomassa microalgal

Para a obtenção de biomassa as microalgas foram cultivadas em frascos Erlenmeyers de 1000mL contendo 500mL de meio e 10% de inóculo (10^6 cél.mL⁻¹), em BGN ou WC suplementados com glicose, glicerol e acetato de potássio nas concentrações previamente selecionadas pelos ensaios mixotróficos descritos no item 4.3.1 e em vinhaça. Os cultivos foram conduzidos sob condições heterotróficas em Estufa Tecnal modelo TE-392/1 a 25°C e aeração forçada de 1VVM.

A biomassa foi concentrada por centrifugação a 711xg por 30 minutos em centrífuga Centrifio, modelo TDL 80-2B, e caracterizada quanto aos teores de lipídios e proteínas, no início e no final dos cultivos. O período total de cultivo foi estabelecido com base nos resultados obtidos nos ensaios heterotróficos com os diferentes substratos e nos experimentos com vinhaça, considerando o momento de maior concentração de biomassa para a finalização do experimento.

A determinação de lipídios foi feita através da extração com os solventes clorofórmio e metanol, conforme a metodologia de Bligh e Dyer (1959), sendo quantificado pelo método gravimétrico. A quantificação de proteínas foi estimada pelo teor de nitrogênio total através do método da digestão com persulfato de potássio e hidróxido de sódio, em bloco digestor (HACH DRB200) durante 30 minutos, com leituras a 410nm em Espectrofotômetro HACH DR 5000. A concentração de proteínas foi então estimada usando o teor de nitrogênio total e o fator geral de conversão 6,25 (AOAC, 1990; VOLTOLINA et al., 1999).

4.5 Separação da biomassa

O ensaio de separação da biomassa foi conduzido no Laboratório de Análises e Simulação Tecnológica (LAST/CCA/UFSCar). Previamente, a cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*, microalga selecionada nos ensaios anteriores, foi cultivada no LABMAC/CCA/UFSCar em frascos Erlenmeyers de 1000 mL contendo 500 mL de vinhaça e 10% v/v de inóculo (10^6 cél.mL⁻¹) durante 24 horas, 25°C e aeração forçada de 1 VVM. Como controle foram utilizadas as mesmas condições de cultivo em meio padrão BGN.

A separação da biomassa da cianobactéria foi avaliada por ensaios em jar-test utilizando cloreto férrico (FeCl₃) como agente coagulante (MANETTI, 2008). O tempo de agitação foi de 20 minutos, iniciando-se com 1,21xg (5 minutos), seguido de 0,65xg (10 minutos) e, por fim, 0,048xg (5 minutos). Posteriormente, os frascos foram mantidos em repouso por 15 minutos, para sedimentação do material coagulado.

O experimento foi realizado em duplicata e amostras foram coletadas em três momentos: (1) logo após a mistura do inóculo no meio; (2) após 24 horas de cultivo da cianobactéria; e (3) após o ensaio em jar-test. Para o meio BGN, o monitoramento foi realizado através da turbidez e da contagem direta de células em câmara de Neubauer, enquanto para os testes com vinhaça avaliou-se também a DQO (APHA, 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Cultivos em meio de cultura suplementado com glicose

5.1.1 Cultivo mixotrófico

As Figuras 1 e 2 apresentam os perfis das concentrações celulares das microalgas *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* cultivadas em meios BGN e WC, respectivamente, suplementados com diferentes concentrações de glicose.

As Tabelas 4 e 5 apresentam as velocidades específicas de crescimento máximas e tempos de geração da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli e da microalga *Chlorella vulgaris* em meio de cultivo suplementado com glicose. Os dados indicam perfis característicos de crescimento microbiano em batelada, sugerindo a viabilidade do cultivo das microalgas nestas condições. As velocidades de crescimento para *Aphanothece* sugerem uma faixa ideal de glicose entre 12,5 e 37,5 g.L⁻¹, com ótimo em 25 g.L⁻¹. De fato, quando são comparadas as velocidades de crescimento para *Chlorella* nas diferentes concentrações de glicose verifica-se uma faixa mais restrita de crescimento, com ótimo em 12,5 g.L⁻¹. O crescimento de cianobactérias no escuro suportado pelo consumo de moléculas orgânicas é citado na literatura, sendo condicionado ao tipo de substrato e a espécie de micro-organismo (FAY, 1983).

Para ambas as microalgas verificou-se crescimento mais acentuado nos ensaios com adição de glicose, sendo as menores velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) observadas quando o substrato orgânico não foi adicionado ao meio de cultivo. De fato, a adição de moléculas orgânicas pode ser utilizada como estratégia para aumentar as taxas de crescimento e obter altas concentrações celulares no cultivo de cianobactérias, devido à sua incorporação no período de escuro. Nestas condições, a principal via metabólica do catabolismo da glicose é o ciclo das pentose-fosfato pela glicose 6-fosfato desidrogenase, com síntese de transportadores específicos de prótons e hexose (PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

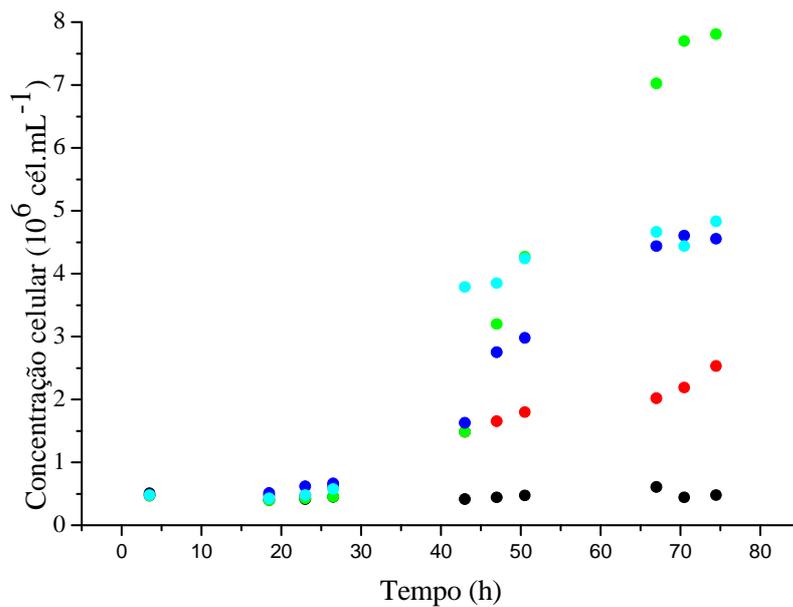


Figura 1. Perfis de biomassa de *Aphanothece microscopica* Nægeli em cultivo mixotrófico em meio BGN suplementado com diferentes concentrações de glicose (●=0; ●=12,5; ●=25; ●=37,5 e ●=50 g.L⁻¹)

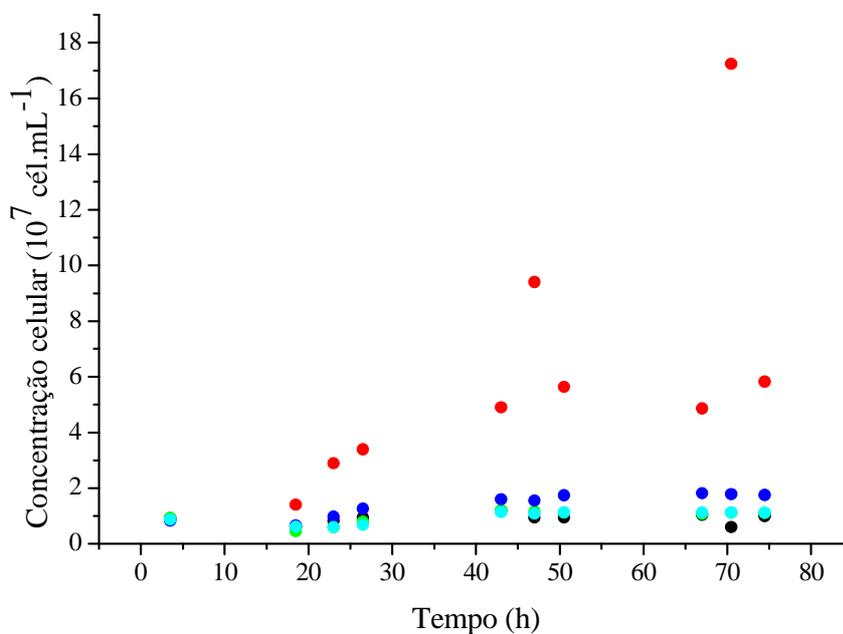


Figura 2. Perfis de biomassa de *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico em meio WC suplementado com diferentes concentrações de glicose (●=0; ●=12,5; ●=25; ●=37,5 e ●=50 g.L⁻¹)

Tabela 4. Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de glicose

Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	R ²	t_g (h)
0	0,002	0,74	346
12,5	0,026	0,92	26,65
25	0,042	0,95	16,5
37,5	0,038	0,94	18,24
50	0,008	0,99	86,64

Tabela 5. Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de glicose

Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	R ²	t_g (h)
0	0,008	0,57	86,64
12,5	0,042	0,95	16,5
25	0,028	0,88	24,7
37,5	0,012	0,92	57,76
50	0,012	0,77	57,76

Em se tratando de cultivos convencionais (fotoautotróficos), a maioria das cianobactérias utiliza o período escuro para ajuste da fotossíntese e dos mecanismos de biossíntese, para uma posterior fase ativa na presença de luz (ARDELAN; ZARNEA, 1998; ZAK et al., 2001), o que também se aplica para microalgas verdes como as clorófitas. Como os meios sintéticos utilizados para o cultivo das microalgas não

apresentam nenhuma fonte orgânica de carbono, o crescimento torna-se inviável na ausência de luz, de modo que a adição de glicose é interessante para manter o metabolismo durante o período de escuro. Adicionalmente, conforme relatam Chojnacka e Marques-Rocha (2004), em culturas mixotróficas a adição de substratos orgânicos resulta em aumento na taxa de crescimento, o que de fato foi verificado para os micro-organismos.

Para ambas as microalgas, a velocidade específica de crescimento máxima foi de $0,042 \text{ h}^{-1}$, refletindo num tempo de geração de 16,5 h. Nos ensaios com *Aphanothece microscopica* Nägeli, $\mu_{\text{máx}}$ foi observado quando se utilizou a concentração intermediária de glicose (25 g.L^{-1}), enquanto para *Chlorella vulgaris* este valor foi verificado na concentração $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose. Este comportamento sugere inibição pelo substrato, o que pode ser observado nas Figuras 3 e 4. De fato, altas concentrações de glicose tem se mostrado inibitórias para o crescimento de microalgas e cianobactérias, conforme reportado na literatura (SHI et al., 1999; LIANG et al., 2009; PEREZ-GARCIA et al., 2011a; YAN et al., 2011).

De acordo com Perez-Garcia et al. (2011a), informações sobre a concentração ideal de glicose para o crescimento ótimo de microalgas são ainda dispersas para se alcançar uma conclusão definitiva. Segundo estes autores, a resposta pode estar relacionada a combinações específicas de fatores, como o tipo de microalga e as condições de cultivo. Além disso, como a assimilação de glicose tende a reduzir a síntese de transportadores de nitrato e nitrito, a assimilação de nitrogênio pode estar sendo limitante nos meios BGN e WC suplementados com glicose. Sendo assim, este efeito inibitório da glicose pode ser minimizado se o cultivo das microalgas for realizado em meios com diferentes fontes de nitrogênio, como por exemplo águas residuárias.

A avaliação do efeito da fonte de carbono no cultivo mixotrófico ou heterotrófico de cianobactérias é objeto de estudos recentes na literatura. Ainda assim, a melhor condição encontrada para *Aphanothece microscopica* Nägeli (25 g.L^{-1} de glicose) corrobora com os resultados obtidos por Bastos et al. (2011) em ensaios heterotróficos com esta mesma cianobactéria a partir de 25 e 100 g.L^{-1} de glicose.

Yan et al. (2011), estudando as características de crescimento da cianobactéria *Synechococcus* sp. em cultivo mixotrófico em meio BGN suplementado com glicose, observaram que a concentração de 4 g.L^{-1} resultou em crescimento celular máximo.

Adicionalmente, os autores relatam que, sob condições mixotróficas, a taxa de crescimento da cianobactéria foi superior ao crescimento fotoautotrófico.

Liang et al. (2009), avaliando a produtividade de biomassa de *Chlorella vulgaris* sob condições mixotróficas, verificaram que a adição de 10 e 20 g.L⁻¹ de glicose ao meio de cultivo refletiu em maior taxa de crescimento do que 50 e 100 g.L⁻¹, sendo que a maior concentração exerceu efeito inibitório. Os autores adotaram a concentração de 10 g.L⁻¹ de glicose como ideal para o cultivo heterotrófico da microalga, visando atingir elevadas produtividades de biomassa e lipídios. Também Perez-Garcia et al. (2011b), utilizando *Chlorella vulgaris* no tratamento de águas residuárias, adotaram a concentração 10 g.L⁻¹ como ideal para o crescimento heterotrófico da microalga. Já Shi et al. (1999), trabalhando com outro gênero de *Chlorella* (*C. protothecoides*), avaliaram diferentes concentrações de glicose (10 a 100 g.L⁻¹) na produção de biomassa e luteína pela microalga, e sugeriram 40 g.L⁻¹ como a concentração ideal a ser suplementada para o cultivo heterotrófico desta microalga, suportando crescimento celular relativamente alto e elevada produção de luteína.

Mesmo a velocidade específica de crescimento máxima obtida nos ensaios com *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* ($\mu_{\text{máx}} = 0,042 \text{ h}^{-1}$) foi inferior às verificadas por Heredia-Arroyo et al. (2011) em cultivo mixotrófico com concentrações iniciais de 5, 15 e 30 g.L⁻¹ de glicose ($\mu_{\text{máx}} = 0,13; 0,13 \text{ e } 0,12 \text{ h}^{-1}$, respectivamente) para *C. vulgaris*. Entretanto, neste trabalho os autores utilizaram meio de cultura relativamente mais rico do que o WC contendo, além dos minerais inorgânicos e da fonte de carbono, extrato de levedura. Por outro lado, a velocidade específica de crescimento máxima de 0,042 h⁻¹ foi superior à observada por Yan et al. (2011), os quais verificaram $\mu = 0,025 \text{ h}^{-1}$ durante o cultivo de *Synechococcus* sp. a partir de 4 g.L⁻¹ de glicose. Já Shi et al. (1999), avaliando o cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides* em meio suplementado com glicose, observaram velocidades semelhantes, de 1,10 e 1,14 d⁻¹, quando o meio foi suplementado com 10 e 40 g.L⁻¹ de glicose, respectivamente.

Considerando os dados apresentados na Figura 3, o comportamento da velocidade específica de crescimento pode ser descrito pelo Modelo de Haldane, onde obtém-se como concentração de glicose ótima (sem efeitos de inibição) 24,48 g.L⁻¹, valor muito próximo do experimental. Até 37,5 g.L⁻¹ a curva segue a cinética de Monod, com constante de saturação de 11 g.L⁻¹. Assim, ocorre inibição acima de 37,5

g.L^{-1} de glicose e há comprometimento no crescimento para concentrações inferiores a 11 g.L^{-1} . Da mesma forma, a Figura 4 também demonstra inibição pelo substrato para a microalga *Chlorella vulgaris*, com concentração ótima de substrato de $5,2 \text{ g.L}^{-1}$. Os dados são comparáveis aos obtidos por Shi et al. (1999) em ensaios com diferentes concentrações de glicose utilizando a microalga *Chlorella protothecoides*. Entretanto, estes autores indicam 40 g.L^{-1} como sendo a concentração inicial de glicose ideal, havendo também para esta microalga inibição pelo substrato estimada pela Equação de Haldane. Segundo Chen (1996), o efeito inibitório de substratos orgânicos resulta não somente no decréscimo da velocidade de crescimento, mas também na diminuição do rendimento total do crescimento celular, uma vez que é necessário aumentar a energia de manutenção das células, em detrimento do crescimento.

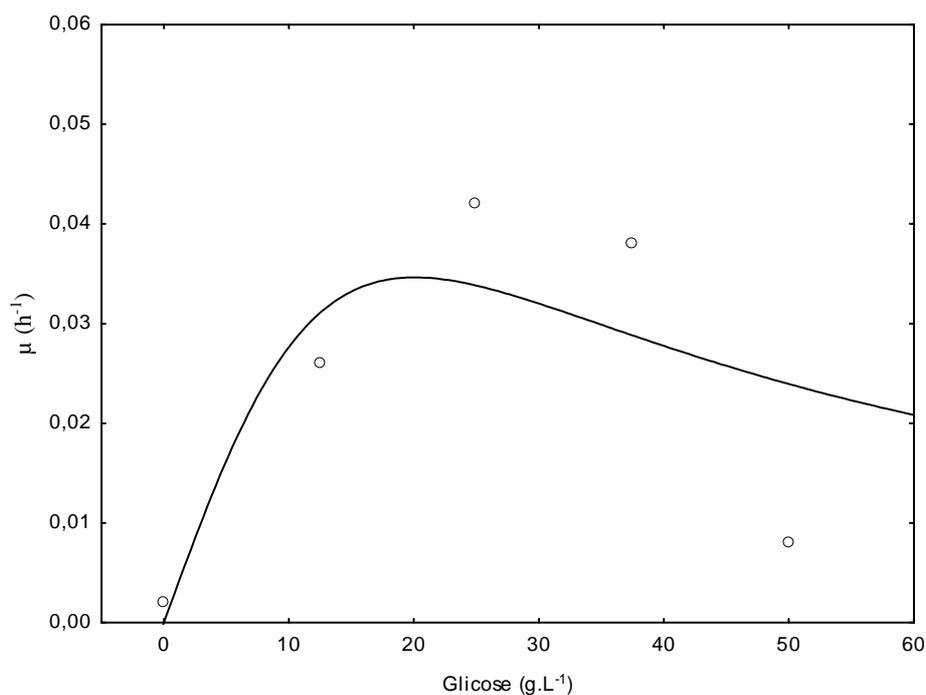


Figura 3. Ajuste da velocidade específica de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* pelo Modelo de Haldane

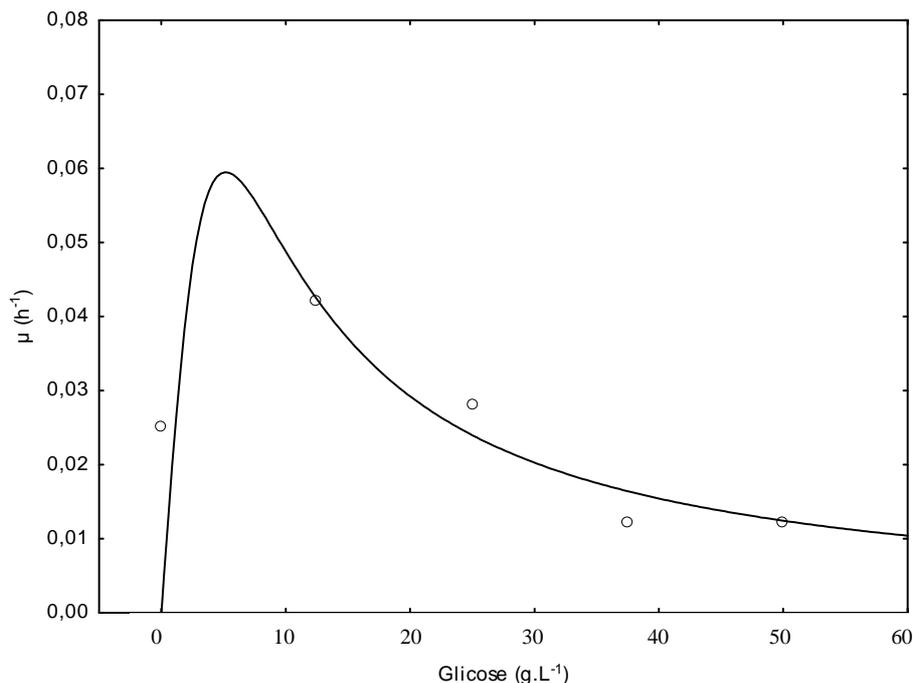


Figura 4. Ajuste da velocidade específica de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* pelo Modelo de Haldane

5.1.2 Cultivo heterotrófico

As Figuras 5, 6, 7 e 8 apresentam as variações de biomassa e glicose da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* e da microalga *Chlorella vulgaris* cultivadas em meios BGN e WC suplementados com 25 g.L⁻¹ e 12,5 g.L⁻¹ de glicose, respectivamente, sob condições heterotróficas. Pelo comportamento das curvas verifica-se crescimento e assimilação de glicose por ambas as microalgas.

Em condições heterotróficas, a velocidade específica máxima de crescimento da *Aphanothece microscopica Nägeli* foi de 0,09 h⁻¹, refletindo num tempo de geração de 7,7h. Para a mesma concentração de glicose (25 g.L⁻¹), a velocidade específica de crescimento no cultivo heterotrófico foi superior à do cultivo mixotrófico (0,042 h⁻¹). O mesmo comportamento foi verificado durante o cultivo heterotrófico da microalga *Chlorella vulgaris*, com máxima velocidade específica de crescimento de 0,089 h⁻¹, ou seja, maior do que a verificada no cultivo mixotrófico (0,042 h⁻¹). Estes resultados sugerem que a assimilação contínua de glicose ocorre não somente no período claro do

cultivo mixotrófico, o que duplicou a velocidade de crescimento máxima das microalgas. A luminosidade é o parâmetro que mais influencia a assimilação de glicose, uma vez que a luz inibe a expressão do sistema de transporte de elétrons e hexoses. Assim, os dados indicam a viabilidade do cultivo de ambos micro-organismos em condição não dependente da luminosidade. De fato, é possível atingir altas velocidades específicas de crescimento e obter altas densidades de células de microalgas e cianobactérias em sistemas heterotróficos, tornando viável o processo de produção de biomassa em grande escala (PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

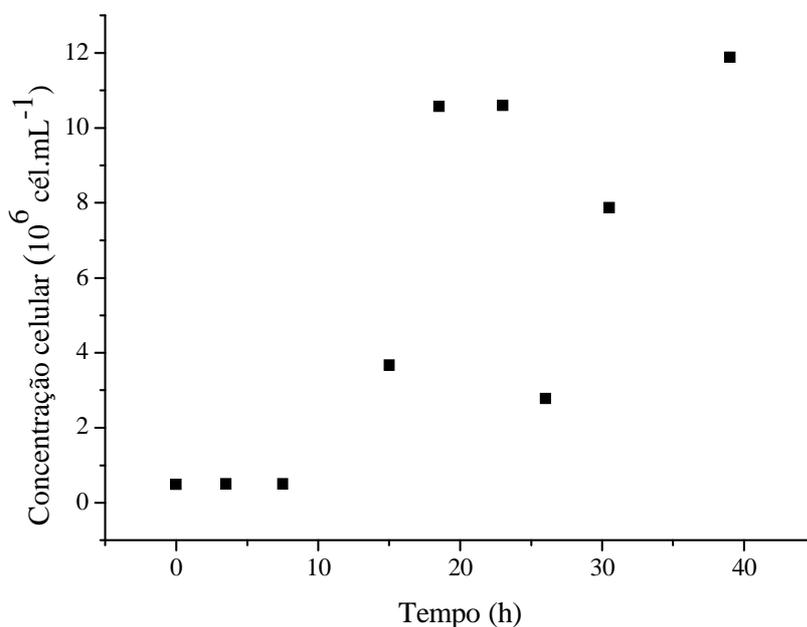


Figura 5. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio BGN suplementado com 25 g.L⁻¹ de glicose

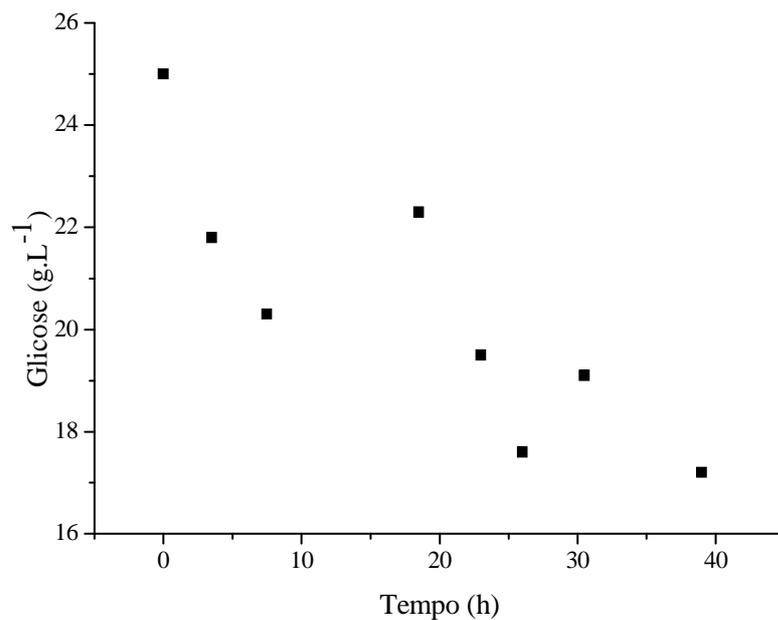


Figura 6. Perfil das concentrações de glicose durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nægeli* em meio BGN suplementado com 25 g.L⁻¹ de glicose

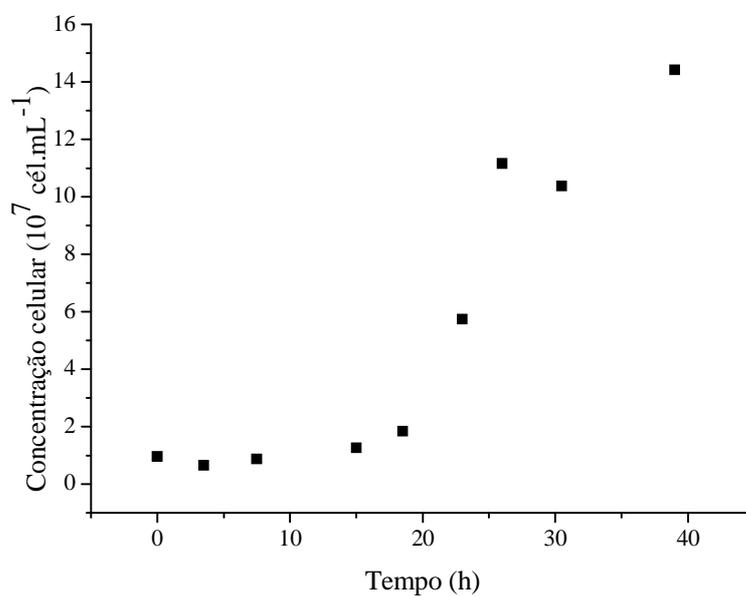


Figura 7. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio WC suplementado com 12,5 g.L⁻¹ de glicose

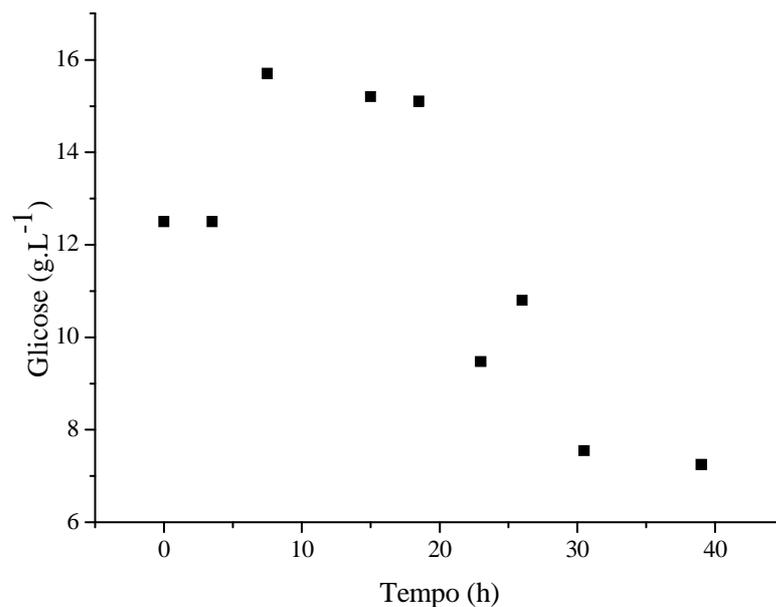


Figura 8. Perfil das concentrações de glicose durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio WC suplementado com 12,5 g.L⁻¹ de glicose

Em condições heterotróficas, a glicose é metabolizada por cianobactérias principalmente pela via das pentose-fosfato, ao invés da glicólise (PEREZ-GARCIA et al., 2011a). O maior fluxo metabólico da via das pentose-fosfato pode explicar a maior velocidade de crescimento das microalgas quando cultivadas heterotroficamente na presença de glicose. Yang et al. (2000) verificaram que o cultivo heterotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* gerou mais ATP a partir do fornecimento de glicose do que cultivos autotróficos e mixotróficos com energia fornecida pela luz.

Para *Aphanothece microscopica Nægeli*, o consumo de glicose foi mais acelerado nas primeiras 10 horas de cultivo, enquanto para *Chlorella vulgaris* o consumo ocorreu mais lentamente, embora as velocidades específicas de crescimento máximas tenham sido semelhantes para ambas as espécies. Entretanto, para os dois microorganismos não houve esgotamento do substrato, com reduções de 30,4 e 42%, para a cianobactéria e a clorofícea, respectivamente, ao fim de 40 horas de cultivo.

Os resultados diferem de alguns trabalhos encontrados na literatura onde utilizou-se meio de cultivo suplementado com glicose. Sansawa e Endo (2004), avaliando o cultivo heterotrófico de *Chlorella regularis* em meio suplementado com 1,5 g.L⁻¹ de glicose, observaram consumo total do substrato em 6 horas de cultivo. Também Liang et al. (2009), trabalhando com *Chlorella protothecoides* em cultivo mixotrófico, observaram esgotamento total do substrato quando o meio foi suplementado com

concentrações de 5 e 15 g.L⁻¹ de glicose em 48 e 144 horas, respectivamente. Os resultados obtidos para *Aphanothece microscopica* e *Chlorella vulgaris* sugerem que, ao se utilizar concentrações superiores de glicose, o tempo de cultivo de 40 horas é insuficiente para o consumo total do substrato. De fato, Shi et al. (1999), utilizando concentrações entre 10 e 60 g.L⁻¹ de glicose no cultivo heterotrófico de *C. protothecoides*, observaram esgotamento da glicose apenas após 6 dias de cultivo. Por outro lado, o prolongamento dos cultivos heterotróficos de microalgas geralmente levam a problemas de contaminação (PEREZ-GARCIA et al., 2011a). Assim, como a glicose é o substrato orgânico mais facilmente assimilável, sua concentração deve ser controlada de modo a obter altas produtividades em biomassa com a menor contaminação possível.

5.2 Cultivos em meio de cultura suplementado com glicerol

5.2.1 Cultivo mixotrófico

As Figuras 9 e 10 apresentam os perfis das concentrações celulares das microalgas *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* durante cultivo mixotrófico em meios BGN e WC, respectivamente, suplementados com diferentes concentrações de glicerol.

Para *Aphanothece microscopica* Nägeli a menor concentração de glicerol (0,46 g.L⁻¹) refletiu na maior concentração celular ao fim de 80 horas de cultivo, enquanto as duas maiores concentrações (9,2 e 46 g.L⁻¹) refletiram nos menores valores finais de crescimento. Com exceção da menor concentração de glicerol, para todas as outras observou-se decréscimo de massa celular da cianobactéria a partir de determinado momento.

Para *Chlorella vulgaris* a maior concentração final de biomassa foi obtida quando o meio foi suplementado com 0,92 g.L⁻¹ de glicerol. Da mesma forma que para *A. microscopica*, para *C. vulgaris* também observou-se decréscimo no número de células nas amostragens finais do experimento quando o meio foi suplementado com as três maiores concentrações de glicerol.

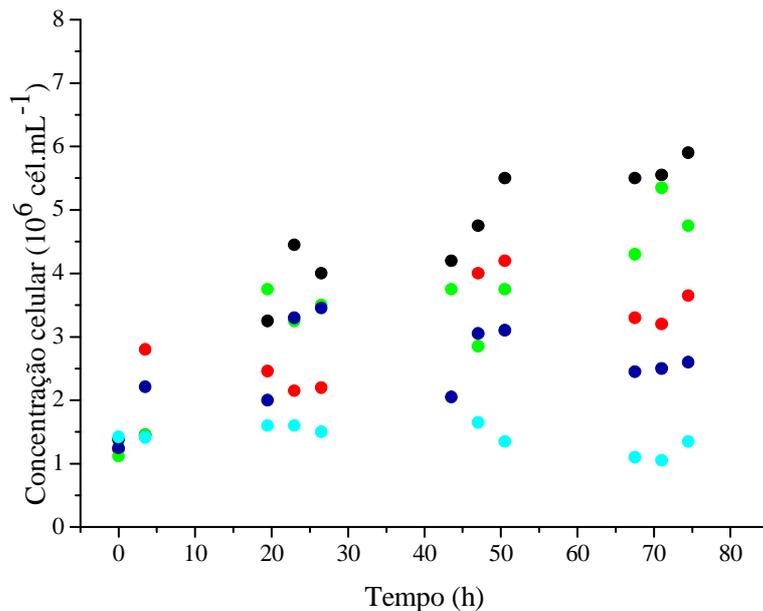


Figura 9. Perfis de biomassa de *Aphanothece microscopica* Nægeli em cultivo mixotrófico em meio BGN suplementado com diferentes concentrações de glicerol (●=0,46; ●=0,92; ●=4,6; ●=9,2 e ●=46 g.L $^{-1}$)

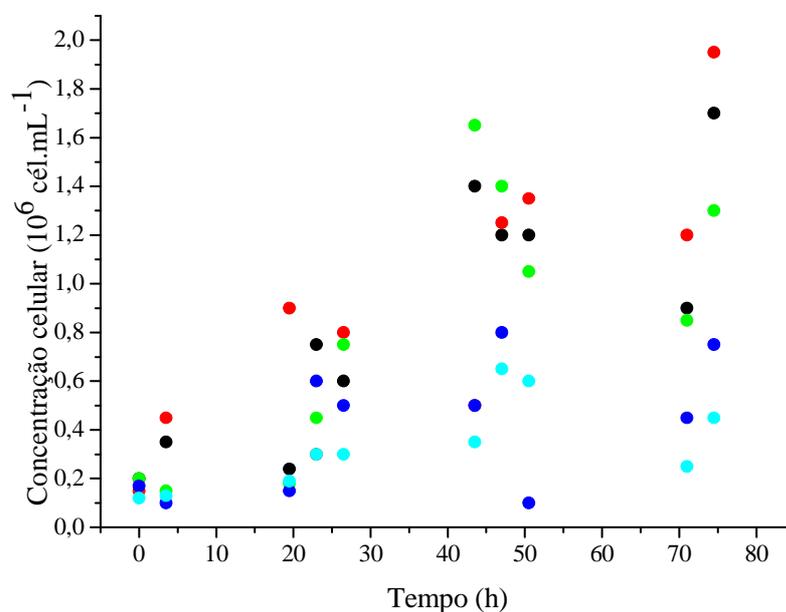


Figura 10. Perfis de biomassa de *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico em meio WC suplementado com diferentes concentrações de glicerol (●=0,46; ●=0,92; ●=4,6; ●=9,2 e ●=46 g.L $^{-1}$)

O decréscimo das concentrações celulares foi considerado na seleção da condição ótima de glicerol para o cultivo heterotrófico de ambas as microalgas. Assim, diferentemente dos experimentos em que se utilizou glicose como substrato, as velocidades específicas máximas de crescimento foram calculadas apenas para o período onde houve crescimento considerável, excluindo-se os pontos finais para todas as concentrações de glicerol avaliadas. Nestas condições, as Tabelas 6 e 7 apresentam as velocidades específicas de crescimento e tempos de geração das microalgas durante o cultivo mixotrófico em meio suplementado com glicerol.

Para *Aphanothece microscopica Nägeli* as três menores concentrações de glicerol refletiram em velocidades específicas de crescimento máximas semelhantes e superiores às verificadas para as maiores concentrações do substrato, enquanto para *Chlorella vulgaris* as máximas velocidades específicas verificadas foram semelhantes para todas as concentrações de glicerol.

O glicerol é assimilado e convertido a piruvato pela via glicolítica, o qual segue para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Logo, a assimilação de glicerol pode estar condicionada a uma disponibilidade de oxigênio maior do que em cultivos com glicose, o que pode explicar em parte as menores velocidades de crescimento. Além disso, a via das pentose-fosfato parece ser inibida quando o glicerol é a única fonte de carbono, o que sugere período de adaptação e velocidades menores pela via glicolítica.

Tabela 6. Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de glicerol.

Concentração de glicerol (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	R ²	t_g (h)
0,46	0,027	0,92	25,7
0,92	0,024	0,94	28,8
4,6	0,029	0,86	23,9
9,2	0,019	0,61	36,5
46	0,0035	0,89	198

Tabela 7. Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de glicerol.

Concentração de glicerol (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	R ²	t_g (h)
0,46	0,037	0,95	18,7
0,92	0,043	0,94	16,1
4,6	0,043	0,89	16,1
9,2	0,039	0,84	17,8
46	0,034	0,97	20,4

A concentração ótima de glicerol para o cultivo heterotrófico das microalgas foi selecionada considerando as velocidades específicas de crescimento máximas, o comportamento das curvas de crescimento e a concentração final de células durante todo o período de cultivo. Assim, foram adotadas as menores concentrações de glicerol, 0,46 e 0,92 g.L⁻¹ para *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, uma vez que nas concentrações superiores houve decréscimo da concentração celular, demonstrando efeito inibitório de elevadas concentrações do substrato no crescimento de ambas as espécies de microalgas. Este efeito inibitório do glicerol pode estar ligado à alteração da pressão osmótica do meio, que foi mais prejudicial para a cianobactéria.

Nesse sentido, as Figuras 11 e 12 apresentam os ajustes das velocidades específicas de crescimento para *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Chlorella vulgaris* pelo modelo de inibição proposto por Haldane.

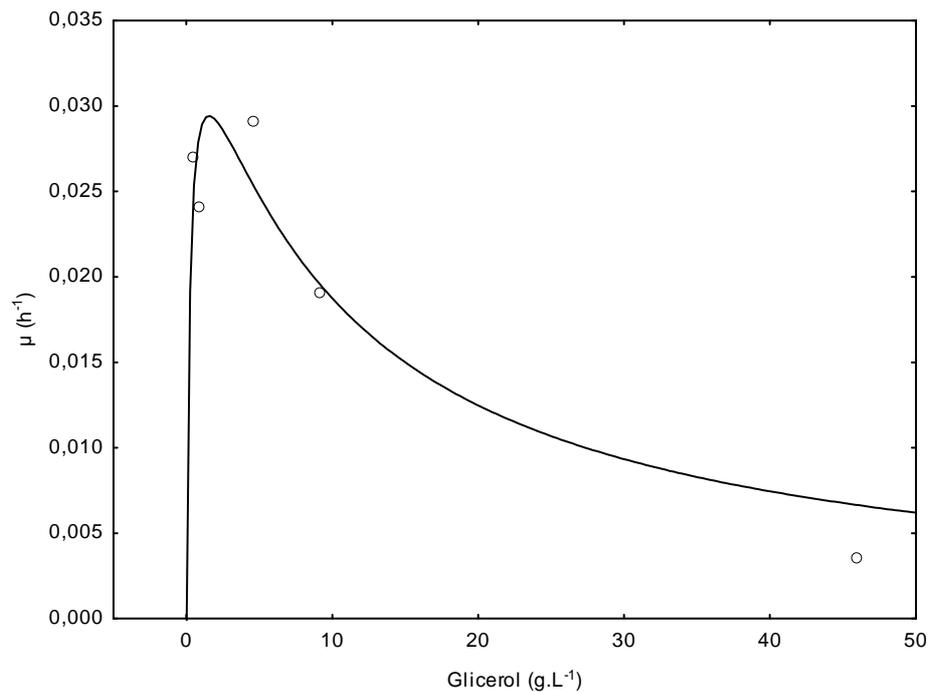


Figura 11. Ajuste da velocidade específica de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli pelo Modelo de Haldane

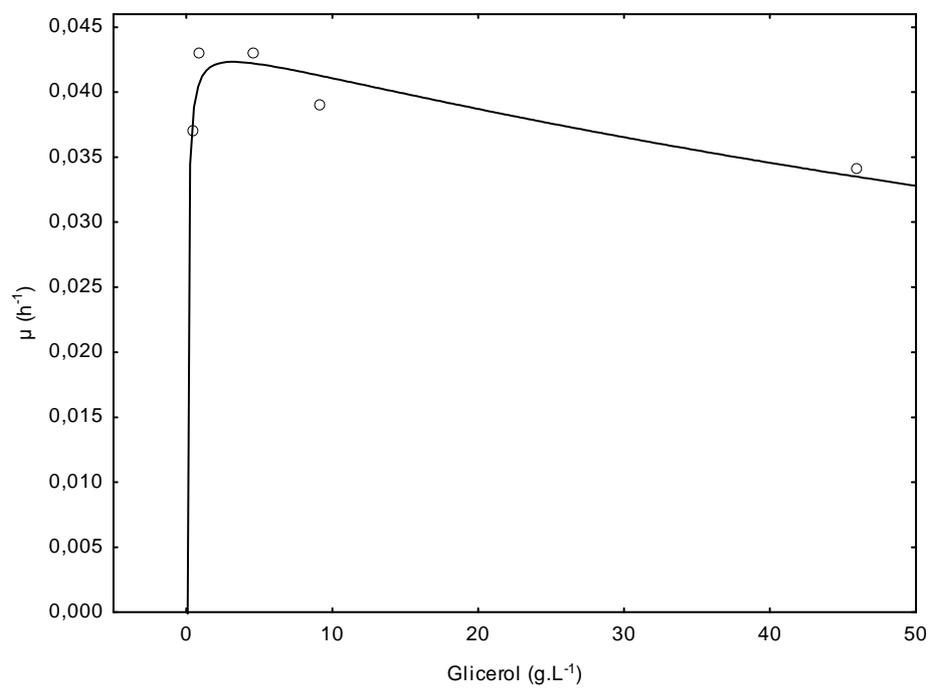


Figura 12. Ajuste da velocidade específica de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* pelo Modelo de Haldane

Considerando os dados da Figura 11 o comportamento da velocidade específica de crescimento da *Aphanothece microscopica Nägeli* pode ser descrito pelo Modelo de Haldane, pelo qual obtém-se como concentração ótima de glicerol (sem efeitos de inibição) $1,55 \text{ g.L}^{-1}$. Da mesma forma, a Figura 12 também demonstra efeito inibitório do substrato durante o cultivo de *Chlorella vulgaris*, com concentração ótima de glicerol de $3,19 \text{ g.L}^{-1}$.

Cerón Garcia et al. (2006), avaliando o efeito de concentrações de glicerol (0; 0,46; 9,2 e $18,4 \text{ g.L}^{-1}$) no cultivo mixotrófico da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, verificaram maior crescimento da microalga nas culturas suplementadas com glicerol quando comparadas a um controle sem o substrato. Entretanto, os autores observaram inibição do crescimento quando se utilizou a maior concentração, sugerindo $9,2 \text{ g.L}^{-1}$ (0,1M) como a concentração ideal de glicerol a ser adicionada ao meio de cultivo, com maior produção de biomassa. Também Liang et al. (2009), avaliando concentrações de 10; 20; 50 e 100 g.L^{-1} de glicerol no crescimento de *C. vulgaris*, verificaram que, embora o crescimento em cultivo mixotrófico tenha sido sempre superior ao autotrófico, a adição de menores concentrações de glicerol ao meio refletiram em maiores produções de biomassa, sendo a maior velocidade de crescimento verificada quando se utilizou 10 g.L^{-1} de glicerol.

Heredia-Arroyo et al. (2011), avaliando o efeito de diferentes combinações de glicose e glicerol no cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris*, verificaram maior produção de biomassa nas combinações de glicose:glicerol = 100:0% ($15:0 \text{ g.L}^{-1}$) e 80:20% ($12:4,1 \text{ g.L}^{-1}$), com efeito inibitório no crescimento celular no tratamento contendo apenas glicerol (glicose:glicerol = 0:20,4 g.L^{-1}). Os autores apontam que a espécie *C. vulgaris* é pouco tolerante ao glicerol, com o crescimento inibido em concentrações superiores a 15 g.L^{-1} .

5.2.2 Cultivo heterotrófico

As figuras 13, 14, 15 e 16 apresentam os perfis das concentrações celulares e das concentrações de glicerol durante cultivo heterotrófico das microalgas *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* em meios BGN e WC suplementados com 0,46 e $0,92 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol, respectivamente.

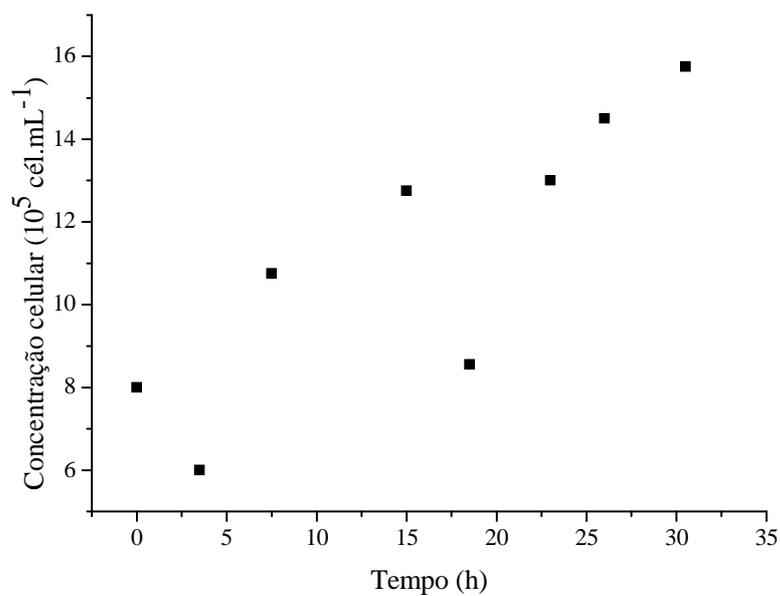


Figura 13. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nägeli* em meio BGN suplementado com 0,46 g.L $^{-1}$ de glicerol

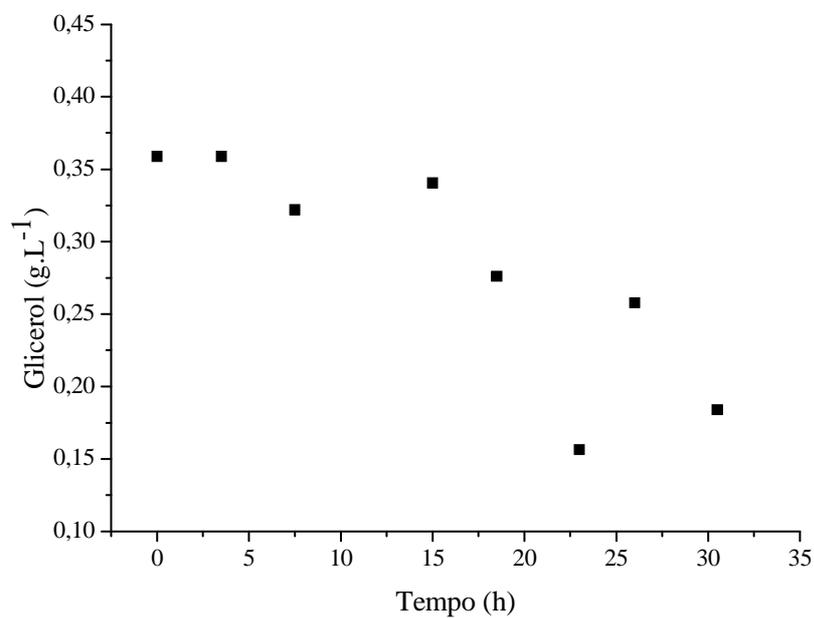


Figura 14. Perfil das concentrações de glicerol durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nägeli* em meio BGN suplementado com 0,46 g.L $^{-1}$ de glicerol

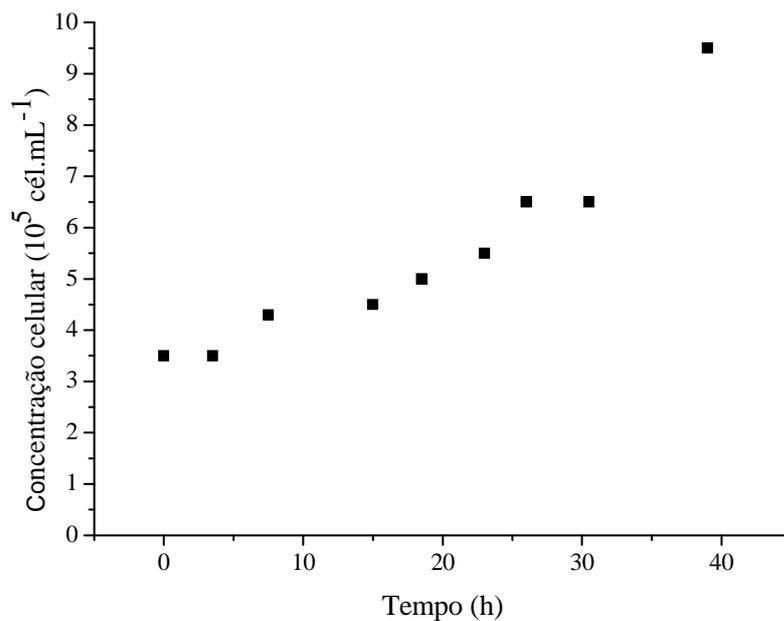


Figura 15. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio WC suplementado com $0,92 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol

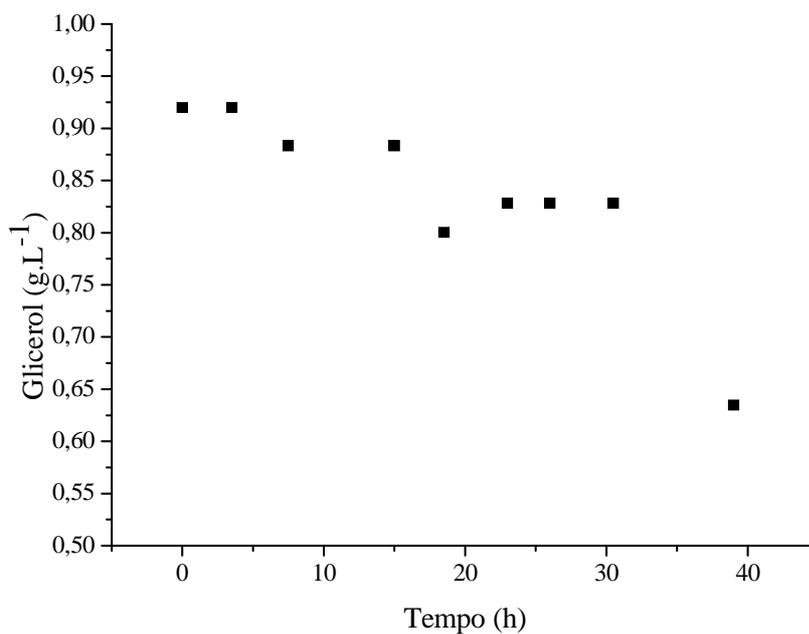


Figura 16. Perfil das concentrações de glicerol durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio WC suplementado com $0,92 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol

Em condições heterotróficas a velocidade específica de crescimento máxima observada para *Aphanothece microscopica Nägeli* foi de $0,02 \text{ h}^{-1}$, refletindo num tempo de geração de 34,7h. Esta velocidade foi ligeiramente inferior à observada durante o

cultivo mixotrófico sob a mesma concentração de glicerol, de $0,027 \text{ h}^{-1}$. Já para *Chlorella vulgaris* a velocidade específica de crescimento máxima observada foi de $0,09 \text{ h}^{-1}$, superior à verificada durante o cultivo mixotrófico ($\mu = 0,043 \text{ h}^{-1}$) e refletindo num tempo de geração de 7,7h.

Comparando os resultados com àqueles obtidos durante o cultivo das microalgas em meio suplementado com glicose observou-se menores velocidades de crescimento da *Aphanothece microscopica Nægeli* nos ensaios com glicerol, tanto no cultivo mixotrófico quanto no heterotrófico. Já a clorofícea *Chlorella vulgaris* apresentou comportamento semelhante nos dois substratos. Os resultados sugerem que a via das pentose-fosfato é mais importante nas cianobactérias e que esta é mais pronunciadamente inibida pela presença de glicerol. Outra possível explicação para o crescimento mais lento da cianobactéria é a redução na síntese de transportadores de nitrato, fonte de nitrogênio presente no meio BGN, devido à presença de glicerol (PEREZ-GARCIA et al., 2011a). O'Grady e Morgan (2011), avaliando a produção de lipídios por *Chlorella protothecoides* em cultivo heterotrófico, também não observaram diferença significativa nas velocidades de crescimento quando a microalga foi cultivada em meio suplementado com os diferentes substratos, sendo relatadas velocidades de $0,096$ e $0,1 \text{ h}^{-1}$ durante os cultivos em glicose e glicerol, respectivamente. Outros autores, entretanto, relatam que, embora seja capaz de utilizar glicerol como fonte de carbono, *C. protothecoides* apresenta crescimento melhor quando se utiliza glicose no meio de cultivo (HEREDIA-ARROYO et al., 2010).

Para ambas as espécies não houve esgotamento do substrato durante o cultivo heterotrófico, chegando ao fim de 40 horas a uma remoção de 48,7% e 31% para *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente. De acordo com Perez-Garcia et al. (2011a) poucas espécies de microalgas são capazes de assimilar glicerol do meio de cultivo. O'Grady e Morgan (2011), avaliando os perfis de assimilação de glicose e glicerol por *Chlorella protothecoides* durante cultivo heterotrófico observaram que, em meio suplementado apenas com glicerol (30 g.L^{-1}), o substrato foi totalmente exaurido após 120 horas de cultivo; já quando se utilizou mistura glicose:glicerol = 1:1, apenas a glicose foi totalmente assimilada, com o glicerol permanecendo no meio mesmo após 120 horas. Por fim, os autores adotaram uma proporção glicose:glicerol = 9:1, considerando esta a máxima quantidade de glicerol que permite a exaustão completa de ambos os substratos do meio de cultivo. Em outro

trabalho, Liang et al. (2010) avaliaram diferentes concentrações de glicerol, puro ou oriundo da produção de biodiesel, na produção de lipídios pela microalga marinha *Schizochytrium limacinum*. Nas concentrações avaliadas (25; 35; 50 e 55 g.L⁻¹ de glicerol), os autores verificaram que só houve esgotamento completo do substrato após pelo menos 4 dias de cultivo, e apenas quando se utilizou as duas menores concentrações de glicerol. Também Chen e Walker (2011) avaliaram o potencial de utilização de glicerol puro e bruto como substrato para a produção de biomassa e de lipídios por *Chlorella protothecoides*. Os autores verificaram que, embora o consumo do substrato tenha sido baixo nos primeiros 2 dias de cultivo, após este período de aclimação o crescimento da microalga foi satisfatório, atingindo níveis máximos de biomassa e consumo total do substrato após 6 dias.

Segundo Perez-Garcia et al. (2011a) embora glicerol possa servir como substrato para o cultivo heterotrófico de microalgas o conhecimento sobre o metabolismo ocorrente é ainda limitado. Entretanto, considerando que as produtividades de biomassa e de lipídios têm se mostrado superiores quando comparadas ao cultivo autotrófico, a utilização de glicerol bruto, derivado dos processos de produção de biodiesel, torna-se atrativa pela abundância e baixo custo quando comparado com outros substratos, como glicose ou acetato (LIANG et al., 2009; CHEN e WALKER, 2001; PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

5.3 Cultivos em meio de cultura suplementado com acetato de potássio

5.3.1 Cultivo mixotrófico

As Figuras 17 e 18 apresentam os perfis das concentrações celulares das microalgas *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* cultivadas em meios BGN e WC, respectivamente, suplementados com diferentes concentrações de acetato de potássio.

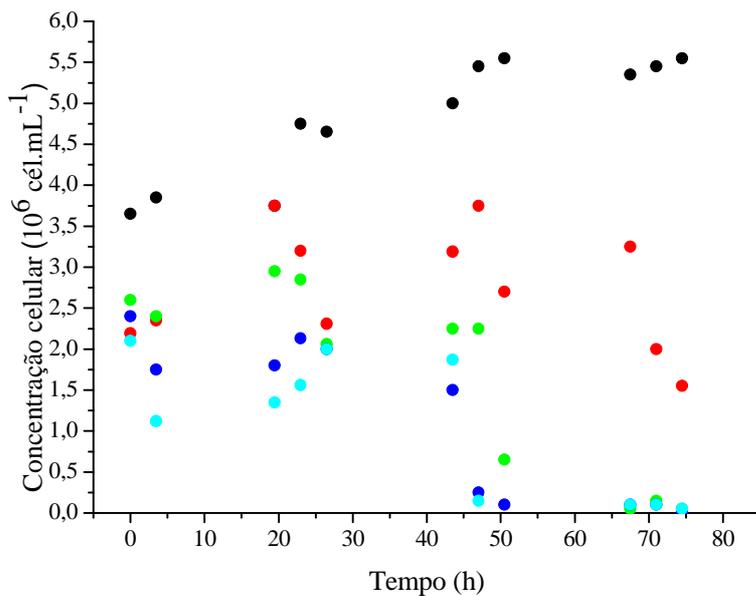


Figura 17. Perfis de biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli em cultivo mixotrófico em meio BGN suplementado com diferentes concentrações de acetato de potássio (●=0,5; ●=1,25; ●=2,5; ●=5 e ●=10 g.L^{-1})

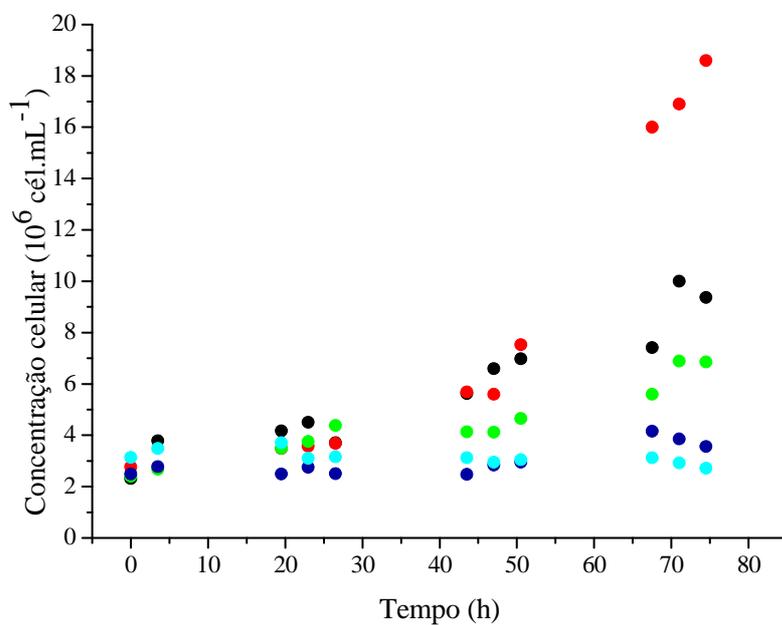


Figura 18. Perfis de biomassa de *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico em meio WC suplementado com diferentes concentrações de acetato de potássio (●=0,5; ●=1,25; ●=2,5; ●=5 e ●=10 g.L^{-1})

Para *Aphanothece microscopica Nägeli* a maior concentração celular foi obtida quando se utilizou a menor concentração de acetato de potássio ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), sendo que em todas as outras concentrações de substrato verificou-se decréscimo do número de células ao final do cultivo.

Para *Chlorella vulgaris* a maior concentração de células foi verificada quando o meio foi suplementado com $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de acetato de potássio, ficando os valores finais bem acima dos verificados para as demais concentrações do substrato. Na maior concentração avaliada (10 g.L^{-1}) observou-se decréscimo no número de células logo após 20 horas de cultivo. Para todas as concentrações de acetato foram verificadas pronunciadas fases de adaptação. O acetato, carregado pela coenzima A, é geralmente oxidado metabolicamente pelos ciclos do glioxalato e do ácido tricarbóxico, sendo que os principais intermediários de ambas as vias são os mesmos metabólitos. O metabolismo via ciclo do glioxalato exige a síntese de determinadas enzimas, como a isocitrato liase (EC 4.1.3.1.) e malato sintase (EC 2.3.3.9), o que pode explicar a fase de adaptação verificada para ambas as microalgas (PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

Da mesma forma que nos cultivos suplementados com glicerol o decréscimo no número de células foi considerado no cálculo das máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das microalgas. Assim, para *Aphanothece microscopica Nägeli* considerou-se um período de 43,5 horas de cultivo, limite em que o crescimento foi positivo para todas as concentrações de substrato avaliadas. Já para *Chlorella vulgaris* $\mu_{\text{máx}}$ foi calculado para todas as concentrações de acetato, exceto a maior, uma vez o breve período de 20 horas de cultivo tornou o número de pontos amostrais insuficientes para construção de uma curva linearizada. Nestas condições, as Tabelas 8 e 9 apresentam os valores das velocidades específicas de crescimento e tempos de geração para ambas as microalgas durante o cultivo em meio suplementado com acetato de potássio.

Em geral, *Chlorella vulgaris* apresentou valores de $\mu_{\text{máx}}$ superiores aos verificados para *Aphanothece microscopica Nägeli*, demonstrando maior adaptabilidade ao substrato. Para ambas as microalgas o comportamento das curvas de crescimento indica que o acetato de potássio exerceu efeito inibitório no crescimento, sendo que *Aphanothece microscopica Nägeli* mostrou-se mais sensível do que *Chlorella vulgaris*. De fato, quando o meio foi suplementado com concentrações maiores de acetato de

potássio, a cianobactéria não apresentou células viáveis ao fim de 80 horas de cultivo (Figura 19).

Tabela 8. Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de acetato de potássio

Concentração de acetato de potássio (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	R ²	t_g (h)
0,5	0,0072	0,97	96,3
1,25	0,0070	0,72	99,0
2,5	0,0069	0,72	100,5
5	0,0051	0,73	135,9
10	0,0129	0,96	53,7

Tabela 9. Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico sob diferentes concentrações de acetato de potássio

Concentração de acetato de potássio (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	R ²	t_g (h)
0,5	0,017	0,94	40,8
1,25	0,028	0,95	24,8
2,5	0,013	0,95	53,3
5	0,007	0,98	99,0
10	*	*	*

* Não calculados.

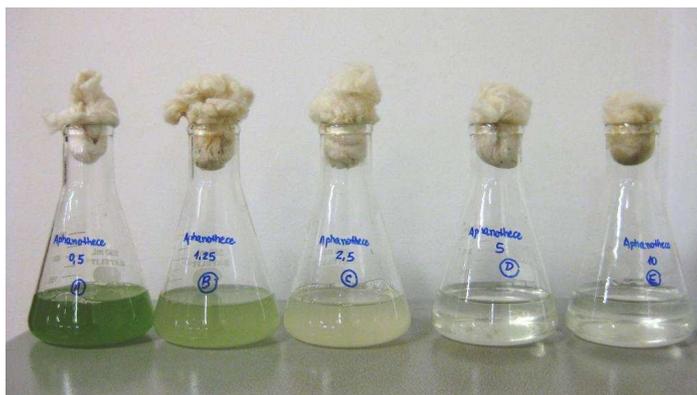


Figura 19. Aspecto de *Aphanothece microscopica Nægeli* cultivada durante 80 horas em condições mixotróficas com concentrações crescentes de acetato de potássio.

As Figuras 20 e 21 apresentam os ajustes das velocidades específicas de crescimento para *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Chlorella vulgaris* pelo modelo de Haldane. Para ambas microalgas, o ajuste não é tão adequado quanto nos ensaios com glicose e glicerol para a faixa de concentração de acetato avaliada.

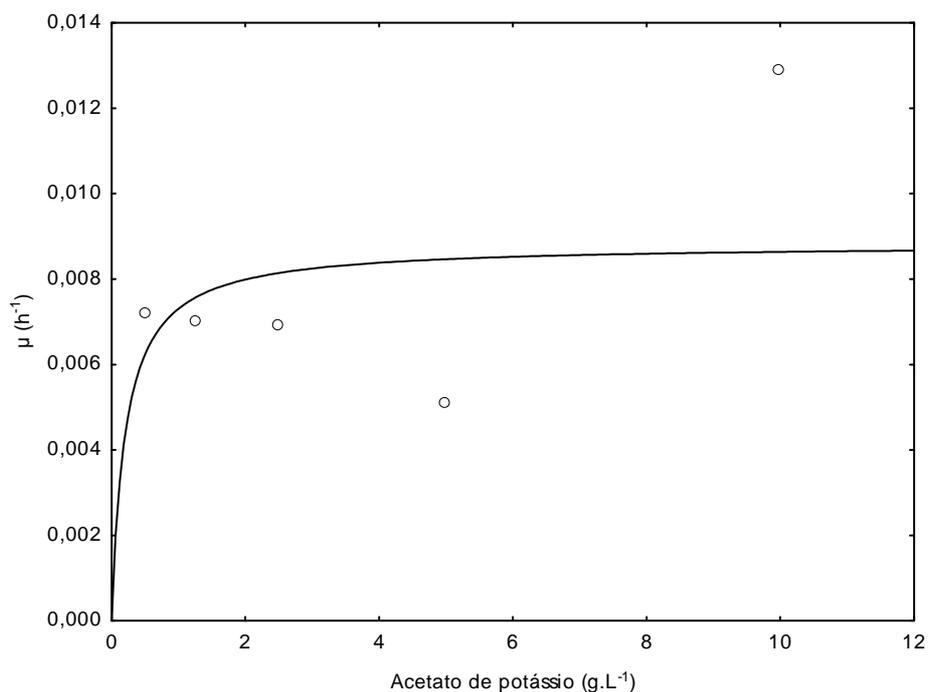


Figura 20. Ajuste da velocidade específica de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* pelo Modelo de Haldane.

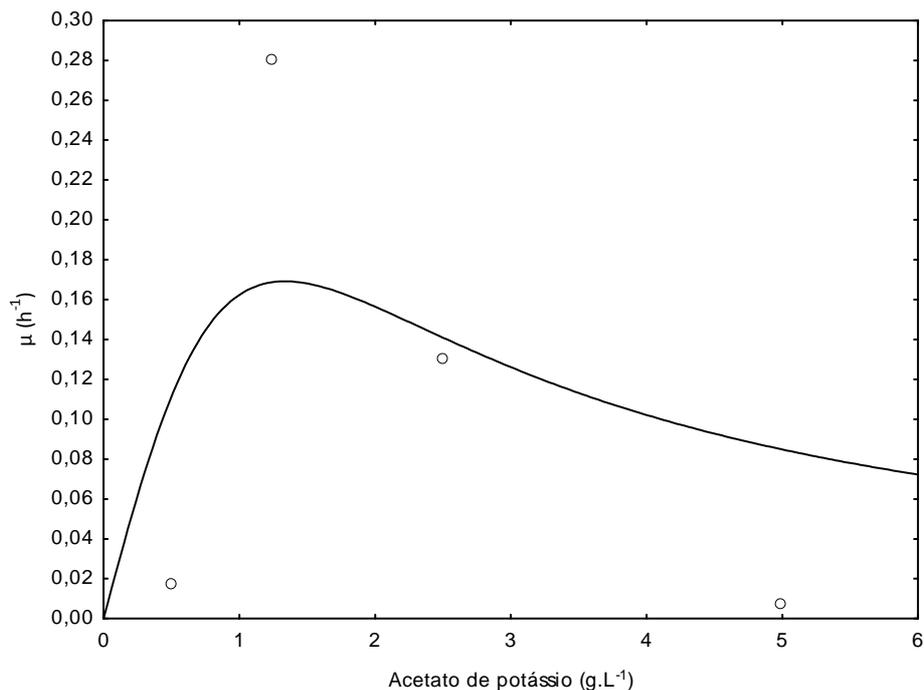


Figura 21. Ajuste da velocidade específica de crescimento microalga *Chlorella vulgaris* pelo Modelo de Haldane.

Pela Figura 20 obtém-se como concentração ótima de acetato de potássio 6,91 g.L⁻¹ para o cultivo da *Aphanothece microscopica Nægeli*. Entretanto, esta concentração não foi considerada como ideal para o cultivo da cianobactéria, uma vez que o ajuste do modelo de Haldane não foi obtido a partir dos dados do período total de cultivo, os quais indicam efeito inibitório do acetato. Já para *Chlorella vulgaris*, a Figura 21 aponta 1,34 g.L⁻¹ como concentração ótima de acetato de potássio, com efeito inibitório nas concentrações superiores, apresentando ajuste pelo modelo de Haldane mais adequado do que o obtido para *Aphanothece*.

A concentração ótima de acetato para o cultivo heterotrófico das microalgas foi definida considerando a concentração final de células durante o período total de cultivo, o comportamento das curvas de crescimento e as velocidades específicas de crescimento calculadas. Nestas condições, foram adotadas as concentrações de 0,5 e 1,25 g.L⁻¹ de acetato de potássio para o cultivo de *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, as quais refletiram em velocidades específicas de crescimento máximas de 0,0072 e 0,028 h⁻¹, com tempos de geração de 96,3 e 24,8 h, respectivamente.

Segundo Perez-Garcia et al. (2011a) acetato nem sempre promove o crescimento, podendo, em elevadas concentrações, ser tóxico para muitos microorganismos. Tal fato se deve ao aumento de pH que ocorre em meios suplementados com acetato, seja de sódio ou potássio, uma vez que os íons remanescentes (Na^+ ou K^+) reagem com íons hidroxila (OH^-) ou outros ânions presentes no meio formando bases (PEREZ-GARCIA et al, 2011a). Assim, manter as concentrações de acetato em baixos níveis é interessante para cultivos em batelada-alimentada, uma vez que, conforme o substrato é consumido, mais acetato é adicionado ao reator, evitando o aumento de pH (WOOD et al., 1999; PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

O efeito inibitório do acetato no crescimento de microalgas tem sido relatado por diversos autores. Azma et al. (2011), avaliando três concentrações de acetato de sódio no crescimento de *Tetraselmis suecica*, verificaram maior concentração de biomassa quando se utilizou a menor concentração de acetato, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, sendo praticamente o dobro da observada na maior concentração, 2 g.L^{-1} . Também Ortega et al. (2004), trabalhando com *Chlorella* sp., verificaram diminuição do crescimento celular com o aumento da concentração de acetato de $0,082$ para $0,41$ e $0,82 \text{ g.L}^{-1}$, atribuindo o efeito inibitório do acetato à inibição de algum processo fisiológico ou limitação de algum nutriente essencial pela interferência da concentração do substrato. Yan et al. (2011), avaliando diferentes concentrações de acetato ($0,5$ a 5 g.L^{-1}) e de glicose (0 a 10 g.L^{-1}) no cultivo mixotrófico da cianobactéria *Synechococcus* sp. PCC 7942, observaram maior crescimento celular nas concentrações intermediárias de ambos os substratos, 2 g.L^{-1} e 4 g.L^{-1} de acetato e glicose, respectivamente, refletindo em velocidades específicas de crescimento semelhantes ($\mu = 0,025$ e $0,022 \text{ h}^{-1}$ para acetato e glicose, respectivamente). Logo, os autores sugerem que a cianobactéria é capaz de crescer mixotroficamente na presença de substratos orgânicos desde que em baixas concentrações.

5.3.2 Cultivo heterotrófico

As figuras 22, 23, 24 e 25 apresentam os perfis das concentrações celulares e de acetato durante cultivo heterotrófico das microalgas *Aphanothece microscopica* Nägeli

e *Chlorella vulgaris* em meios BGN e WC suplementados com 0,5 e 1,25 g.L⁻¹ de acetato de potássio, respectivamente.

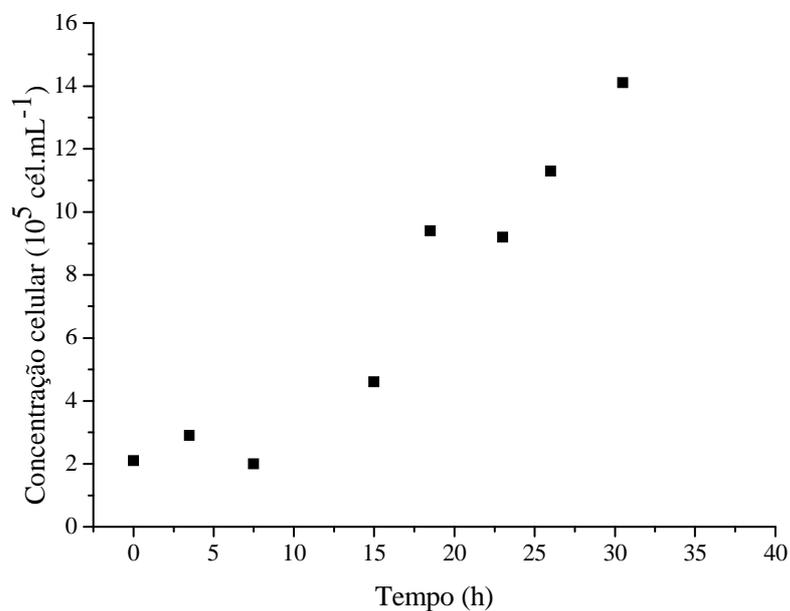


Figura 22. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nægeli* em meio BGN suplementado com 0,5 g.L⁻¹ de acetato de potássio.

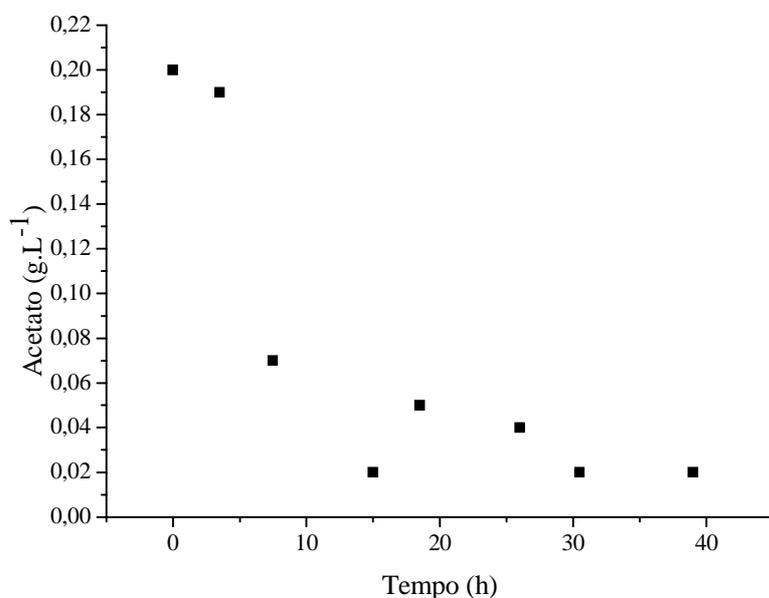


Figura 23. Perfil das concentrações de acetato durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nægeli* em meio BGN suplementado com 0,5 g.L⁻¹ de acetato de potássio.

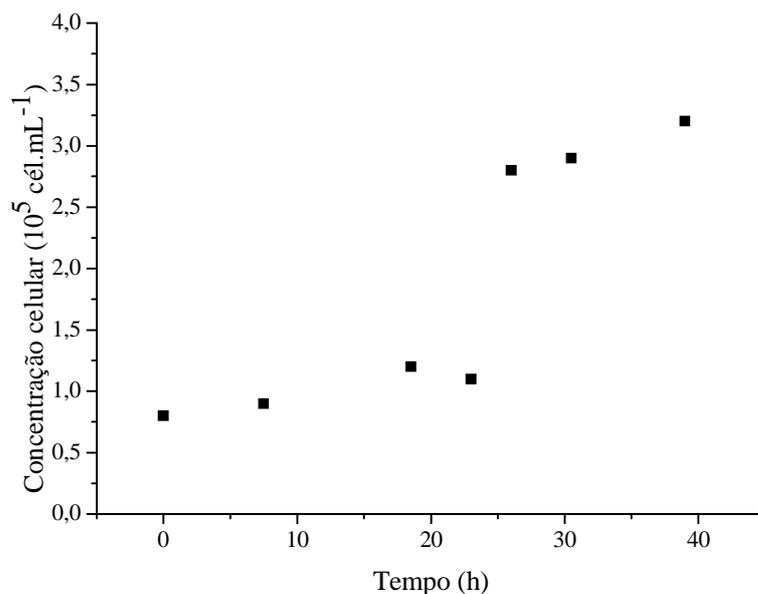


Figura 24. Perfil de biomassa durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio WC suplementado com 1,25 g.L $^{-1}$ de acetato de potássio.

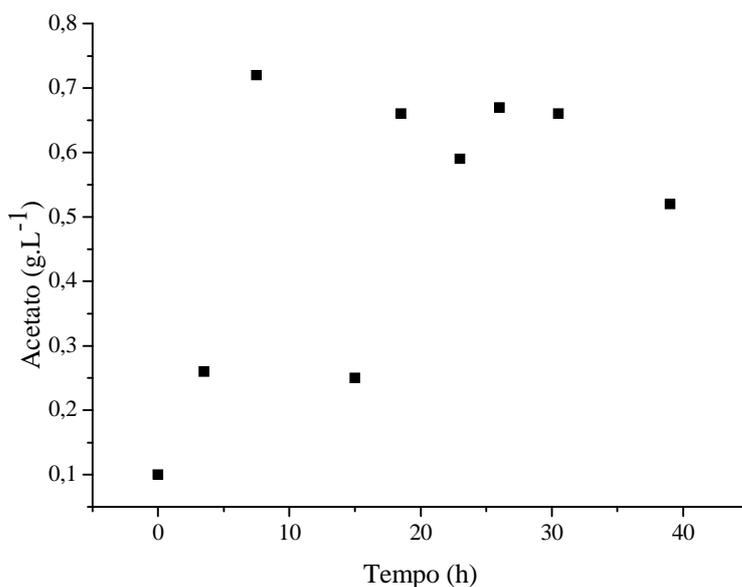


Figura 25. Perfil das concentrações de acetato durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio WC suplementado com 1,25 g.L $^{-1}$ de acetato de potássio.

Em condições heterotróficas, a velocidade específica de crescimento máxima observada para *Aphanothece microscopica Nægeli* foi de 0,08 h $^{-1}$ ($t_g = 8,7$ h), sendo superior à verificada durante o cultivo mixotrófico (0,0072 h $^{-1}$). Já para *Chlorella*

vulgaris a velocidade específica de crescimento máxima foi de $0,026 \text{ h}^{-1}$ ($t_g = 26,6\text{h}$), semelhante à observada durante o cultivo mixotrófico.

Comparando as velocidades específicas de crescimento máximas com aquelas obtidas nos ensaios anteriores, a cianobactéria *Aphanothece* apresentou comportamento semelhante ao do cultivo em meio suplementado com glicose, com crescimento mais satisfatório do que nos cultivos com glicerol. Já a microalga *Chlorella vulgaris* apresentou menores $\mu_{\text{máx}}$ nos cultivos com acetato, com valores inferiores aos verificados nos cultivos com glicose e glicerol.

Yan et al. (2011) realizaram uma análise do fluxo metabólico da cianobactéria *Synechococcus* sp. PCC 7942 quando cultivada em meios suplementados com glicose e acetato. Os autores concluíram que a rota glicolítica é estimulada nos cultivos em glicose e suprimida quando se utiliza acetato, ao passo que o fluxo através do ciclo do ácido tricarbóxico aumenta em ambos os casos. Por fim, os autores sugerem que a glicose é capaz de promover tanto energia química quanto precursores para formação celular, ao passo que o acetato desempenha um papel importante como suprimento precursor para a síntese de lipídios. Neste trabalho, utilizando as duas fontes de carbono em cultivo mixotrófico, os autores verificaram produção de biomassa superior quando o meio foi suplementado com acetato. Da mesma forma, Perez-Garcia et al. (2011b), comparando onze fontes de carbono no cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris*, verificaram que, entre glicose e acetato, o crescimento foi superior nos cultivos com acetato. Já Liang et al. (2009), também trabalhando com cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris*, observaram crescimento superior em meio suplementado com glicose. Com relação ao glicerol, embora existam estudos acerca da utilização para o cultivo de microalgas, poucos trabalhos compararam o crescimento em glicerol com outras fontes de carbono. Liang et al. (2010), trabalhando com *Schizochytrium limacinum*, uma espécie marinha, verificaram produtividade de biomassa superior quando se utilizou glicose. Já O`Grady e Morgan (2011), em cultivo heterotrófico de *C. protothecoides*, verificaram velocidades de crescimento iguais para ambos os substratos, bem como produtividades lipídicas semelhantes, mas com variações na sua composição.

Para ambas as microalgas, não houve esgotamento do substrato em 40 horas de cultivo. Entretanto, *Aphanothece microscopica Nægeli* apresentou remoção de 90% do total de acetato adicionado ao meio, com 65% de remoção nas primeiras 7,5 horas de cultivo, ainda durante a fase lag (Figura 23). Já a microalga *Chlorella vulgaris* não

apresentou uma tendência de consumo do acetato, uma vez que, embora tenha apresentado crescimento no escuro utilizando o substrato como única fonte de carbono (Figura 24), as concentrações oscilaram ao longo do período de cultivo (Figura 25).

Na literatura encontram-se poucos trabalhos acerca da assimilação de acetato por microalgas. Zhang et al. (1999) utilizaram $0,85 \text{ g.L}^{-1}$ de acetato e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de diferentes fontes de nitrogênio (nitrato, amônia e uréia) para o cultivo heterotrófico de *Chlamydomonas reinhardtii*. Nas três fontes de nitrogênio avaliadas, os autores observaram depleção total do acetato em 70 horas de cultivo, com velocidades específicas de crescimento médias de $0,06 \text{ h}^{-1}$. Já Jeon et al. (2006), trabalhando com $0,82 \text{ g.L}^{-1}$ de acetato no cultivo mixotrófico de *Haematococcus pluvialis*, verificaram depleção completa do substrato após três dias de cultivo. Os resultados obtidos para *Aphanothece microscopica Nägeli* sugerem rápido consumo da fonte de carbono, o que torna interessante a utilização do acetato para o cultivo heterotrófico de microalgas. Conforme afirmam Perez-Garcia et al. (2011a), desde que em baixas concentrações, microalgas podem utilizar acetato como única fonte de carbono, o que constitui uma alternativa interessante pelo fato de ser um substrato de baixo custo e prontamente disponível, uma vez que é derivado de diversas aplicações industriais.

5.4 Cultivos em vinhaça

A Tabela 10 apresenta a caracterização da vinhaça “in natura”, considerando os parâmetros que foram utilizados durante os experimentos.

Previamente aos cultivos das microalgas em vinhaça foram realizados diferentes ensaios de pré-tratamento desta água residuária, uma vez que trabalhos anteriores indicaram crescimento inexpressivo em vinhaça sem tratamento (BASTOS et al., 2009a). Considerando a quantidade de glicose disponibilizada pela vinhaça a partir do processo de hidrólise, adotou-se a proporção de ácido:vinhaça de 1:20, utilizando-se HCl concentrado ao invés de HCl 1N para os testes posteriores com diferentes tempos de aquecimento das amostras em banho a 60°C (Figura 26).

Tabela 10. Caracterização de alguns parâmetros da vinhaça “in natura” utilizada nos experimentos.

Parâmetro	Teor *	Unidade
DQO	29400	mg.L ⁻¹
Potássio	2632	ppm
Glicose	71	mg.L ⁻¹
Glicerol	2,8	g.L ⁻¹
Acetato	150	mg.L ⁻¹
Sólidos suspensos totais	40000	mg.L ⁻¹
Turbidez	8035	NTU
Condutividade	10,34	dS.m ⁻¹
pH	3,94	

* Resultados oriundos da média de duplicatas.

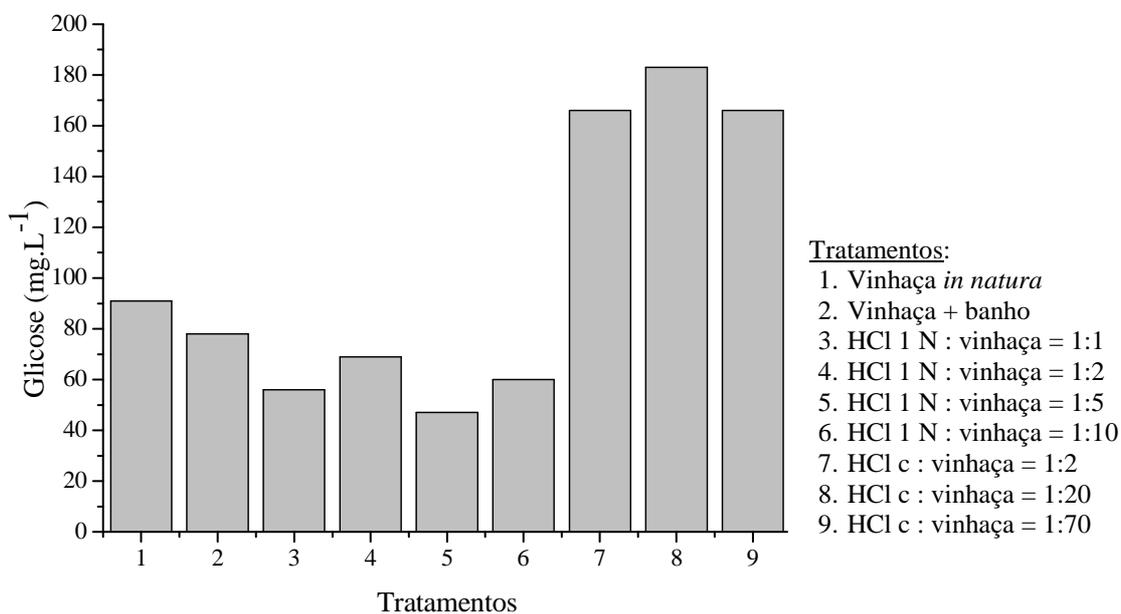


Figura 26. Teores de glicose em vinhaça hidrolisada com diferentes concentrações de HCl

Com a variação do tempo de aquecimento das amostras, verificou-se aumento significativo da disponibilidade de glicose até 35 minutos, atingindo 223 mg.L⁻¹, para então apresentar leve decréscimo (Figura 27).

Os principais componentes orgânicos da vinhaça são glicerol, etanol, ácido láctico e ácido acético. Além disso, podem estar presentes melanoidinas e compostos fenólicos, além de restos de leveduras, aldeídos, frutose, etc. (ORENDAIN, 2006; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Avaliando-se os teores de DQO das amostras de vinhaça hidrolisadas com HCl concentrado não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 28). Assim, verifica-se que houve transformação da matéria orgânica disponível na vinhaça, com disponibilização de glicose.

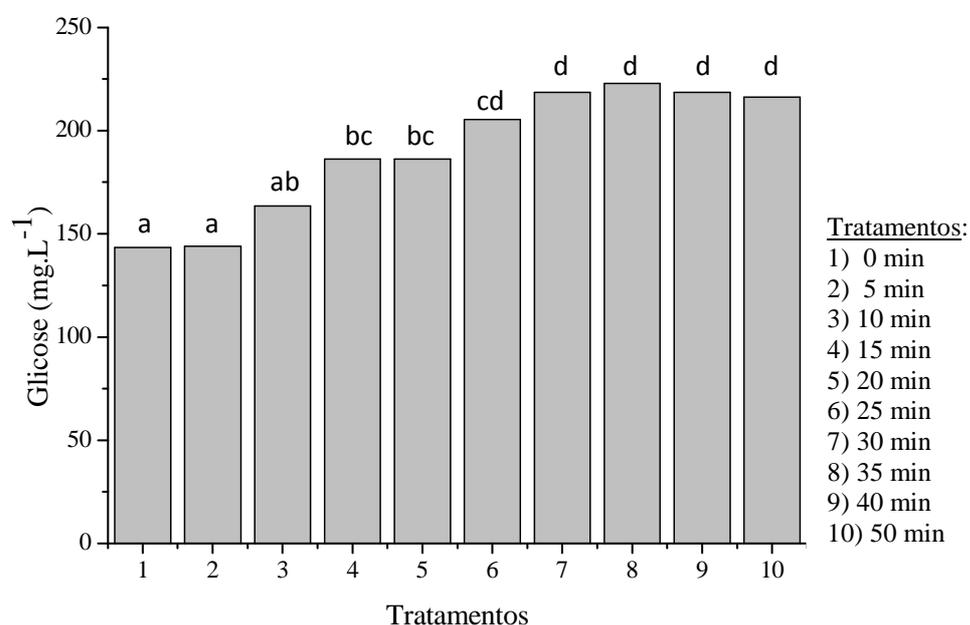


Figura 27. Variação dos teores de glicose com o tempo de aquecimento das amostras de vinhaça adicionadas de HCl concentrado. (Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%).

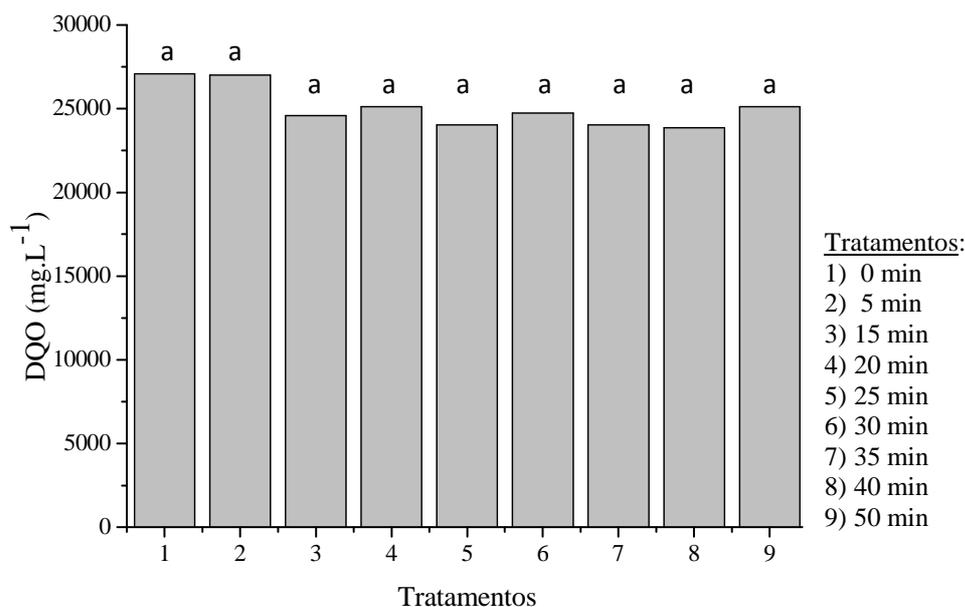


Figura 28. Variação dos teores de DQO com o tempo de aquecimento das amostras de vinhaça adicionadas de HCl concentrado. (Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%).

Considerando estes resultados e adotando a quantidade de glicose no meio como parâmetro mais importante, realizou-se o pré-tratamento da vinhaça com a proporção HCl concentrado : vinhaça de 1:20, 35 minutos em banho termostaticado a 60°C, correção de pH para 7,4 ou 6,5 para *Aphanothece microscopica* e *Chorella vulgaris*, respectivamente, e esterilização a 121 °C por 20 minutos em autoclave.

Nestas condições experimentais, são apresentados a seguir os perfis de biomassa, glicose, DQO e potássio durante o cultivo das microalgas *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em vinhaça.

Pela Figura 29 verifica-se que a cianobactéria foi capaz de desenvolver-se em vinhaça, atingindo uma concentração celular de 7200 mg.L⁻¹ ao término de 17 horas de cultivo (produtividade máxima de 388 mg/L.h). As concentrações médias de biomassa mantiveram-se elevadas até cerca de 23 horas de cultivo, para então sofrerem uma drástica redução, correspondendo à fase de declínio e morte da cianobactéria. Nestas condições, a velocidade específica de crescimento máxima para *Aphanothece* foi de 0,1496 h⁻¹ (R² = 0,92).

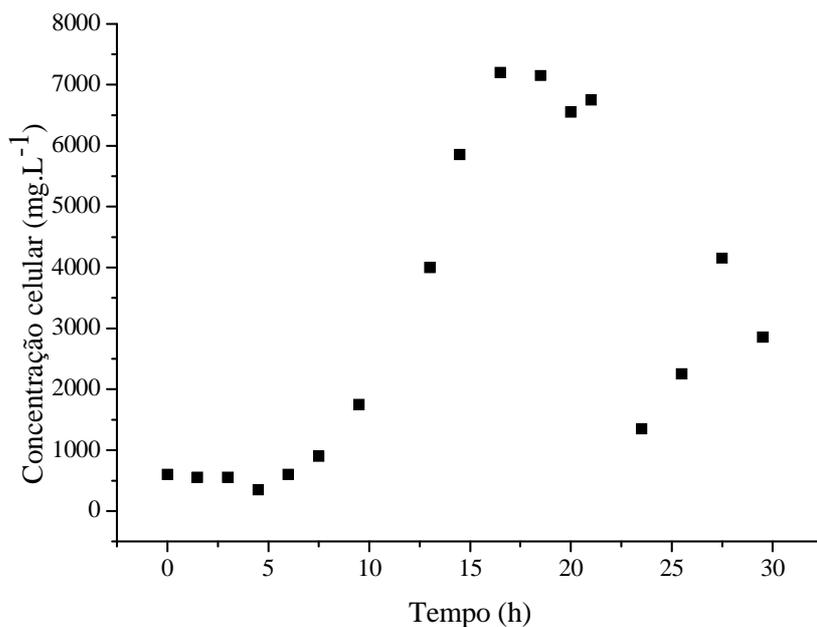


Figura 29. Perfil de biomassa de *Aphanothece microscopica Nægeli* durante o cultivo heterotrófico em vinhaça

A concentração de biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$) obtida durante o cultivo de *Aphanothece microscopica Nægeli* em vinhaça foi superior à relatada na literatura em cultivos de microalgas e cianobactérias em diferentes águas residuárias. Diversos autores, trabalhando com *Aphanothece microscopica Nægeli* em efluente da parboilização do arroz, obtiveram máximas concentrações de biomassa entre 520 e 650 mg.L⁻¹ (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008). Borghetti (2009), durante o cultivo da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura suplementado com 20% e 5% de resíduo de manipueira, obteve $X_{m\acute{a}x}$ de 1900 mg.L⁻¹ e 2790 mg.L⁻¹, respectivamente. Feng et al. (2011), trabalhando com *Chlorella vulgaris* em água residuária sintética, obtiveram $X_{m\acute{a}x}$ de 1800 mg.L⁻¹. Barrocal et al. (2010), trabalhando com vinhaça de beterraba como complemento do meio para cultivo de *Spirulina maxima*, obtiveram $X_{m\acute{a}x}$ de 4800 mg.L⁻¹. Pelos resultados observados, verifica-se potencial promissor da vinhaça como meio de cultivo para cianobactérias.

A curva de crescimento da *Aphanothece microscopica Nægeli* segue o comportamento de uma curva típica de crescimento microbiano, sendo possível identificar claramente as quatro fases principais: fase de adaptação (lag) de aproximadamente 5 horas, fase de crescimento exponencial (log), fase estacionária e fase de morte.

Segundo Shuler e Kargi (1992), a fase estacionária tem início ao fim da fase de desaceleração de crescimento, quando a velocidade de crescimento líquido é zero (ausência de divisão celular) ou quando se iguala a velocidade de mortalidade das células. Mesmo com crescimento líquido igual a zero as células ainda mantêm-se metabolicamente ativas nesta fase, e o motivo para a finalização do crescimento se deve ou à exaustão de algum nutriente essencial ou ao acúmulo de produtos tóxicos produzido pelo próprio micro-organismo. No caso da *Aphanothece microscopica Nägeli*, o pequeno período relativo à fase estacionária deve-se provavelmente à exaustão de algum nutriente específico, uma vez que o consumo de glicose do meio foi considerável (55,5% em 4,5 horas de cultivo), porém não houve esgotamento e os valores oscilaram até o final do experimento (Figura 30).

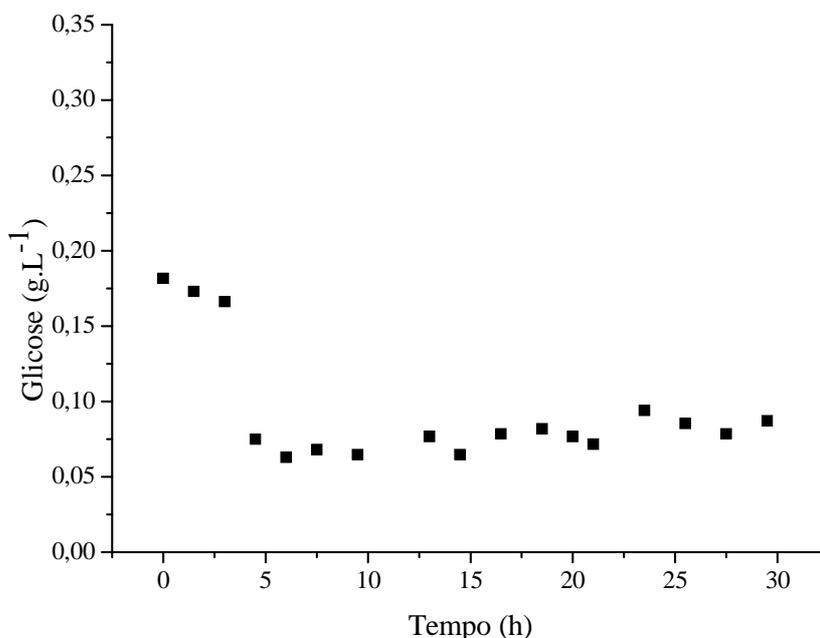


Figura 30. Perfil de glicose durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nägeli* em vinhaça

Com relação à DQO houve remoção gradual ao longo do tempo, chegando ao fim do experimento a redução de 60,76 % (Figura 31), seguindo praticamente uma cinética de consumo de ordem zero.

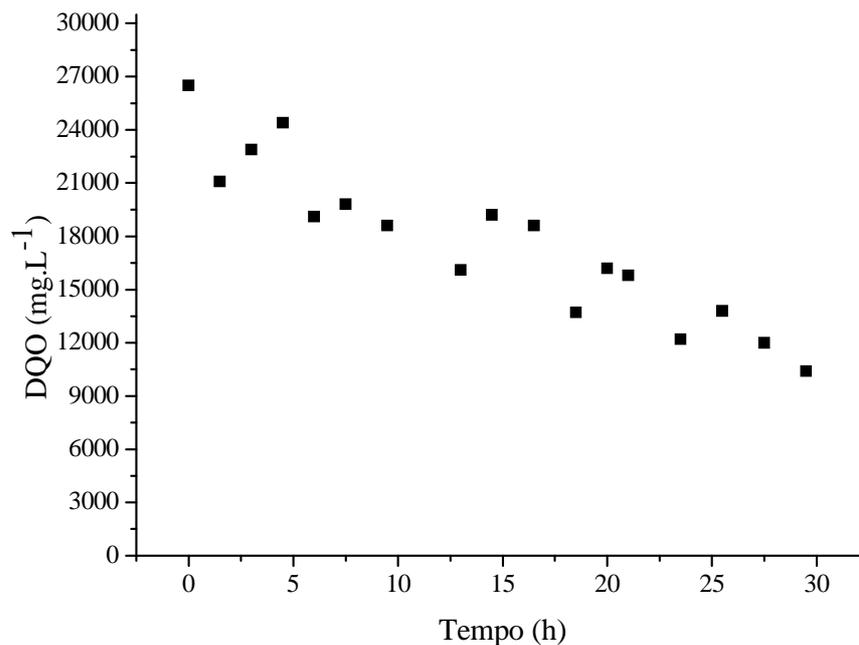


Figura 31. Perfil de DQO durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nægeli* em vinhaça

De acordo com o perfil de DQO verifica-se que houve consumo de diversos constituintes orgânicos da vinhaça e que, devido ao alto valor final (10400 mg.L⁻¹), este parâmetro não foi limitante para o crescimento da cianobactéria. Assim, a explicação para crescimento máximo em aproximadamente 20 horas e decréscimo após este período pode ser a limitação por algum outro nutriente, como nitrogênio, ou oxigênio. Considerando que a exigência de oxigênio em cultivos heterotróficos de microalgas é baixa (BASTOS et al., 2009b) e que a razão C/N da vinhaça é por volta de 15 (CERRI et al., 1988), é provável que o nitrogênio tenha sido o nutriente limitante para o crescimento.

De acordo com Schmetterer (1994), a provável função da respiração de cianobactérias em cultivos heterotróficos é gerar uma quantidade mínima de energia necessária para manutenção, com conseqüente consumo de substratos orgânicos e oxigênio. Algumas cianobactérias são capazes de assimilar substratos orgânicos imediatamente no momento em que são transferidas para o escuro (FAY, 1983; QUEIROZ, 2002; BASTOS et al., 2009b). Tal comportamento parece ter ocorrido com a *Aphanothece microscopica Nægeli* com respeito à assimilação de glicose, que se deu em poucas horas de cultivo, ainda na fase lag de crescimento. No caso da DQO,

entretanto, a assimilação pela cianobactéria ocorreu de forma mais lenta, o que sugere que o micro-organismo foi consumindo inicialmente as moléculas mais simples em detrimento dos substratos orgânicos mais complexos. O potencial de remoção de DQO observado para *Aphanothece microscopica Nägeli* foi semelhante ao verificado por Bastos et al. (2004), os quais utilizaram a mesma cianobactéria em cultivo heterotrófico em efluente da parboilização do arroz. Os autores verificaram remoções de 66,84% de DQO, 63,60% de nitrogênio total e 43% de ácidos voláteis totais em 72 horas de cultivo.

Em outro trabalho também utilizando *Aphanothece microscopica Nägeli* em efluente da parboilização do arroz, Queiroz et al. (2007) verificaram remoção de DQO da ordem de 83% em 15 horas de cultivo com ajuste da relação C/N da água residuária. Já Silva et al. (2005), utilizando *Aphanothece microscopica Nägeli* em cultivo heterotrófico, verificaram remoções de 42,1% de DQO e 58,5% de nitrogênio total em efluente de beneficiamento de milho, e de 53,7% de DQO e 73,2% de nitrogênio total em efluentes de beneficiamento de pêssego e figo, após 24 horas de cultivo da cianobactéria.

Considerando os perfis de biomassa e DQO do cultivo com *Aphanothece microscopica Nägeli*, os rendimentos $Y_{X/S}$ são apresentados na Figura 32 para as primeiras 20 horas de cultivo, onde o crescimento foi mais expressivo. Neste período, obteve-se rendimento máximo de 0,95mg/mg (biomassa/DQO) em 9,5 horas e rendimento global médio de 0,58 mg/mg. Estes resultados indicam viabilidade da utilização de vinhaça como meio de cultivo para esta cianobactéria, com alta conversão da matéria orgânica do efluente em biomassa microbiana.

Pela Figura 33, verifica-se que a microalga *Chlorella vulgaris* também foi capaz de desenvolver-se em vinhaça, atingindo a máxima concentração celular em 20,5 horas de cultivo (produtividade máxima de 43,9 mg/L.h). Assim como ocorreu com a cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*, após um pequeno período em fase estacionária, as concentrações de biomassa diminuíram. A velocidade específica de crescimento máxima para *Chlorella* foi $0,0024 \text{ h}^{-1}$, com $R^2 = 0,75$, uma vez que os pontos ficaram muito dispersos.

A capacidade de crescimento do gênero *Chlorella* sp. em vinhaça já havia sido testada por Oliveira e Cáceres (1986). Em trabalho utilizando 8 espécies de microalgas de água doce, os autores verificaram que *Chlorella* sp. e *Scenedesmus bijugatus* foram

capazes de crescer melhor em solução de vinhaça 0,1% do que em meio de cultivo padrão, sugerindo, ainda que com resultados preliminares, a possibilidade de uso alternativo desta água residuária para o cultivo destes micro-organismos.

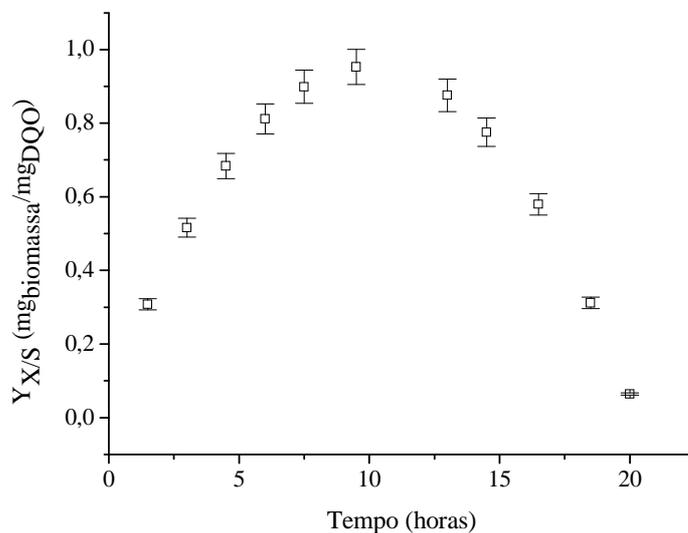


Figura 32. Perfis dos rendimentos $Y_{X/S}$ para as primeiras 20 horas do cultivo de *Aphanothece microscopica* Nægeli em vinhaça

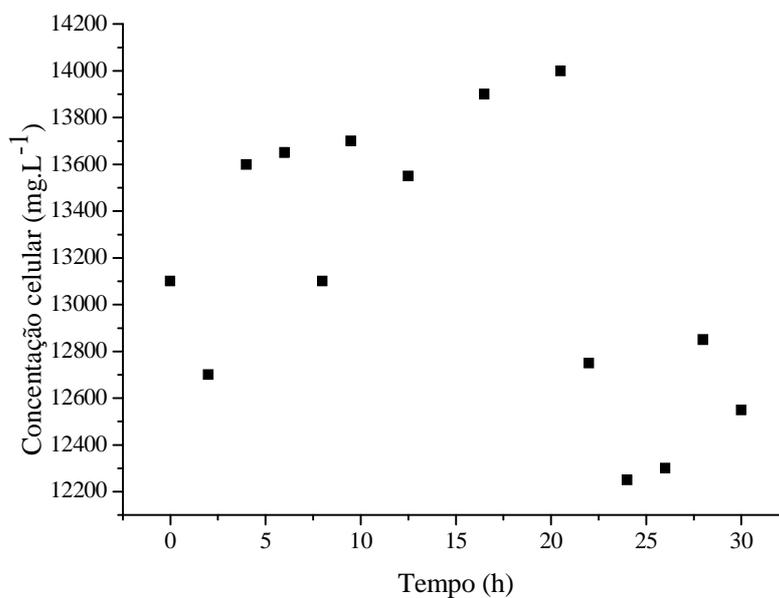


Figura 33. Perfil de biomassa de *Chlorella vulgaris* durante o cultivo heterotrófico em vinhaça

Assim como para *Aphanothece microscopica Nægeli*, a assimilação de glicose da vinhaça por *Chorella vulgaris* foi significativa e deu-se de forma gradual ao longo do tempo, chegando ao fim de 30 horas de cultivo a uma redução de 83,7% do valor inicial (Figura 34).

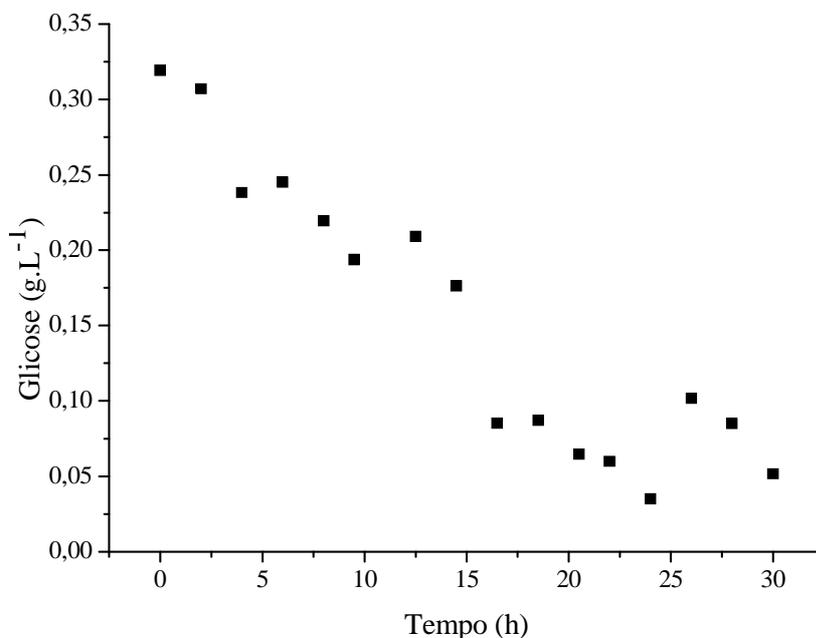


Figura 34. Perfil de glicose durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em vinhaça

Para DQO, a remoção de 25% do valor inicial não foi significativa, havendo oscilação dos valores a partir de 15 horas de cultivo (Figura 35). Estes resultados indicam capacidade menor de incorporação da matéria orgânica da vinhaça por *Chlorella vulgaris*, o que conseqüentemente levou a um crescimento menor.

Lim et al. (2010) e Feng et al. (2011), trabalhando com *Chlorella vulgaris* em águas residuárias distintas, obtiveram remoções de DQO maiores. Os primeiros, utilizando água residuária oriunda de uma indústria têxtil, observaram, além da remoção de cor, remoção de 62% de DQO, 45,13% de N-NH₄ e 33,25% de P-PO₄⁻³ em 10 dias de cultivo da microalga. Já Feng et al. (2011), avaliando a produção de lipídios pela microalga cultivada em água residuária artificial, verificaram remoções de 86% de DQO, 97% de N-NH₄⁺ e 96% de fosfato total do meio sintético. Embora a eficiência de remoção de DQO nestes dois trabalhos tenha sido superior à observada no experimento com *Chorella vulgaris*, é importante salientar que os autores trabalharam com efluentes

cuja DQO inicial era inferior à da vinhaça, por volta de 400 mg.L^{-1} para a água residuária da indústria têxtil e máximo de 990 mg.L^{-1} para a água residuária sintética. A mesma observação é válida para os resultados obtidos com *Aphanothece microscopica* Nägeli.

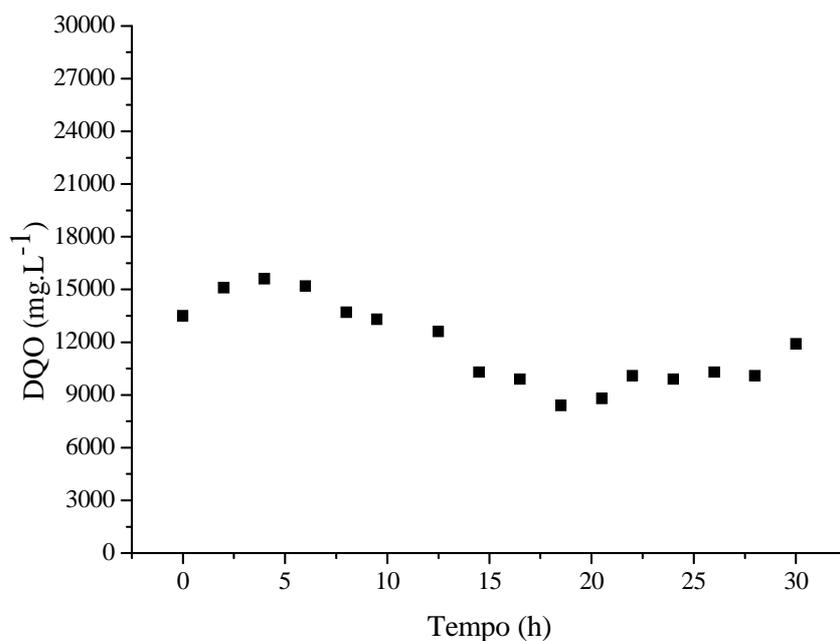


Figura 35. Perfil de DQO durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em vinhaça

Diferentemente do rendimento de DQO em biomassa da *Aphanothece microscopica*, o cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça apresenta menor conversão em biomassa, com máximos de $0,38 \text{ mg}_{\text{biomassa}}/\text{mg}_{\text{DQO}}$ e valores decrescentes durante o cultivo (Figura 36). Considerando estes resultados, a produção de biomassa a partir de vinhaça se mostra mais promissora quando se utiliza a cianobactéria.

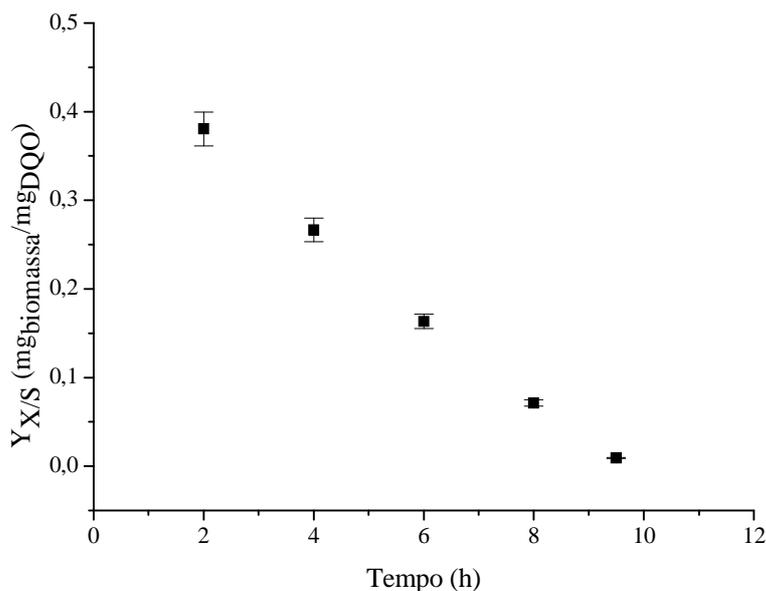


Figura 36. Perfis dos rendimentos $Y_{X/S}$ para as primeiras 10 horas do cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça

Em se tratando de vinhaça são poucos os trabalhos na literatura que avaliam o potencial de cultivo de microalgas e cianobactérias, sendo que a maioria dos estudos refere-se ao cultivo de outros micro-organismos, como leveduras. Navarro et al. (2000) utilizaram vinhaça concentrada como complemento do meio de cultivo para fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores observaram que, embora a utilização de 100% de vinhaça tenha resultado no acúmulo de compostos inibidores da fermentação alcoólica, proporções menores como 60% mostraram-se tecnicamente viáveis, melhorando o processo de produção do etanol sem efeitos inibitórios e contribuindo para redução de 46,2% da quantidade total de água exigida no processo. Já Cazetta e Celligoi (2005) utilizaram melão a 10% e vinhaça bruta de cana-de-açúcar para o cultivo de três espécies de leveduras e uma bactéria visando a produção de proteínas e lipídios pelos micro-organismos. Todos os micro-organismos foram capazes de desenvolver-se nestes substratos, sendo que o melhor crescimento em vinhaça bruta foi verificado pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, atingindo uma concentração de biomassa de 7050 mg.L⁻¹, com consumo de mais de 50% dos açúcares em 48 horas de cultivo. Em outro trabalho utilizando os mesmos micro-organismos, Cazetta e Celligoi (2009) testaram diferentes combinações de melão e vinhaça como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica pelos micro-organismos. A maior produção de biomassa ocorreu com a levedura *R. mucilaginosa* (7560 mg.L⁻¹), na proporção 25% de

melaço e 75% de vinhaça, refletindo numa produção de proteínas de 2,54%, consumo de 73,9% dos açúcares e acúmulo de lipídios de 10,3% em 48 horas de cultivo.

Com relação às microalgas e cianobactérias, os estudos geralmente utilizam vinhaça diluída complementando meios de cultivo. Nesse sentido, Oliveira (1988) avaliou o crescimento mixotrófico de *Chlorella vulgaris* em vinhaça diluída a 0,5% e 0,1% em meio de cultura WC com diferentes valores iniciais de pH. Adotou-se a concentração de 0,1% de vinhaça e pH 7 como a condição ideal para o cultivo da microalga, uma vez que proporcionou maior velocidade de crescimento quando comparado a concentração de 0,5% e pHs iniciais de 5,2 e 10. Posteriormente, comparando esta condição com um controle (meio WC com pH inicial = 7), o autor observou que, embora o rendimento final fosse maior no controle, a velocidade de crescimento da microalga foi maior quando se utilizou a vinhaça, demonstrando a capacidade da microalga de absorver carboidrato do meio. Vale ressaltar que os experimentos realizados pelo autor tiveram duração de 24 dias e a partir da análise dos dados é possível notar que, até 3 dias de cultivo, o crescimento da microalga foi superior em vinhaça 0,1%, sendo superado pelo tratamento controle apenas a partir do 6º dia. Em outro teste deste mesmo trabalho, o autor avalia a DQO e DBO₅ dos meios de cultivo, mas salienta que os dados obtidos são insuficientes para elaborar uma conclusão a respeito da depuração da vinhaça com o crescimento microalgal. No entanto, como o próprio autor observa, os valores finais de DQO e DBO₅ foram inferiores aos valores iniciais.

Valderrama et al. (2002), buscando desenvolver um processo de tratamento biológico para as águas residuárias oriundas do processamento de ácido cítrico e etanol, incluindo a vinhaça, utilizaram a microalga *Chlorella vulgaris* seguida da macrófita *Lemna minuscula*. Segundo os autores, a coloração escura do efluente, os elevados níveis de matéria orgânica e baixo pH impossibilitaram o desenvolvimento da microalga e da macrófita. Assim, os experimentos foram conduzidos com água residuária 10 vezes diluída, obtendo-se redução de 71,6% de amônia, 28% de fósforo e 61% de DQO.

Também Barrocal et al. (2010), trabalhando com a cianobactéria *Spirulina maxima*, utilizaram vinhaça de beterraba como complemento do meio de cultivo para o crescimento mixotrófico do micro-organismo, observando remoções de DQO da ordem de 20-50%.

Andrade et al. (2009), com o objetivo de observar o efeito tóxico da vinhaça em *Spirulina platensis*, também avaliaram diluições, nas proporções 6,25; 12,5; 25 e 50%, concluindo que o tratamento com 12,5% de vinhaça foi menos tóxico para a cianobactéria.

Os resultados destes autores sugerem a possibilidade de utilização da vinhaça como meio de cultivo tanto para cianobactérias quanto microalgas, aliado à possibilidade de remoção da carga orgânica deste efluente.

Fazendo uma relação entre a utilização de meio de cultivo suplementado com glicose e da aplicação de microalgas no tratamento de águas residuárias, os resultados obtidos com vinhaça e os obtidos nos outros trabalhos aqui citados indicam que ocorre consumo mais satisfatório da fonte de carbono por microalgas em meios mais complexos, como efluentes industriais, do que quando se utilizam meios de cultivo padrão. Isto se deve, possivelmente, à presença de outros nutrientes e da relação carbono-nitrogênio dos efluentes, que contribuem para crescimento satisfatório dos micro-organismos.

Para ambas as microalgas monitorou-se a variação do pH ao longo do tempo de cultivo em vinhaça (Figura 37). Como era esperado, houve redução do pH do meio com o decorrer do tempo, uma vez que, em cultivos heterotróficos, a energia é obtida pela oxidação de compostos orgânicos, com liberação de CO₂ e H₂O (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Estes perfis de pH confirmam que de fato houve cultivo puramente heterotrófico para ambas microalgas.

As Figuras 38 e 39 apresentam a incorporação de potássio da vinhaça pela *Aphanothece microscopica* e pela *Chlorella vulgaris*. No caso da cianobactéria, verificou-se remoção máxima de 13% em 21 horas de cultivo, com redução de aproximadamente 9% em 30 horas.

Assim como para *Aphanothece*, a assimilação do potássio por *Chlorella vulgaris* também não foi significativa, com os valores oscilando ao longo do tempo e chegando, ao término de 30 horas de cultivo, a uma redução de 13,8% da concentração inicial (Figura 39).

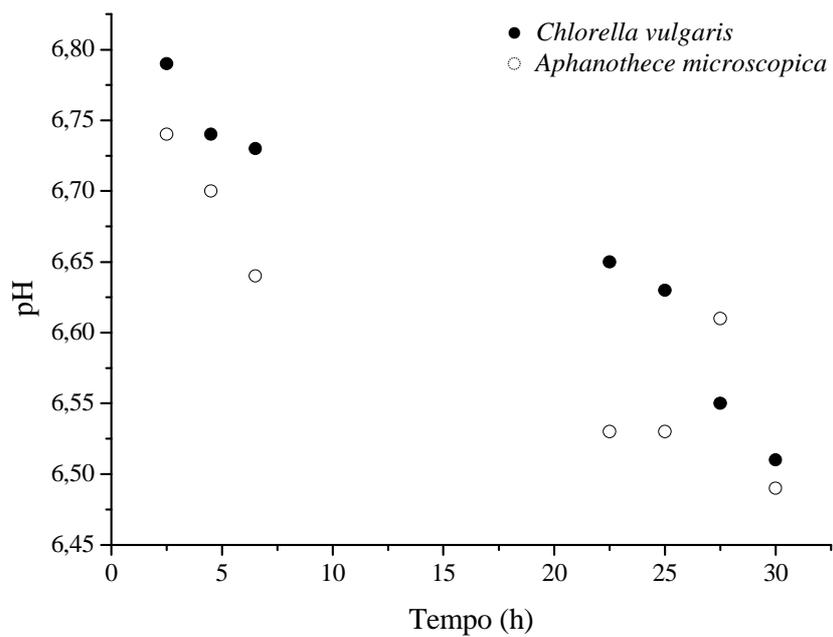


Figura 37. Variação do pH durante cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em vinhaça

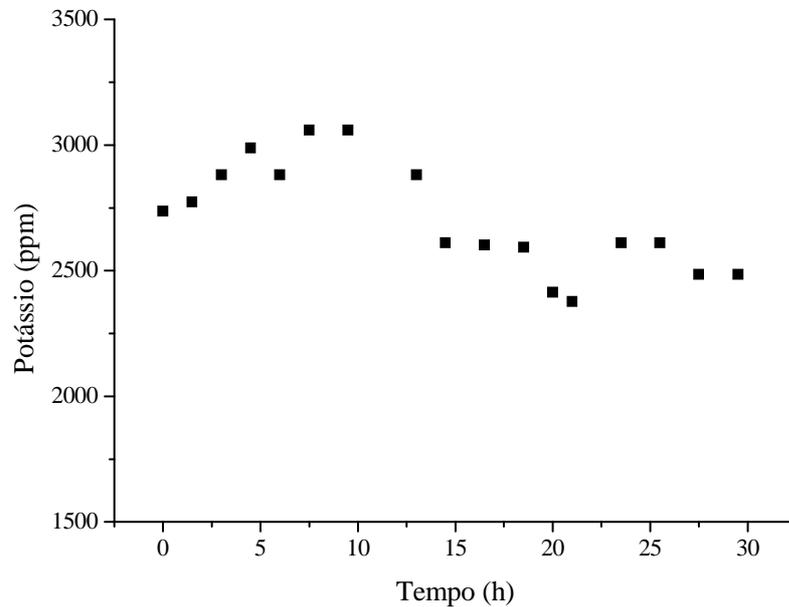


Figura 38. Perfil das concentrações de potássio durante o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli em vinhaça

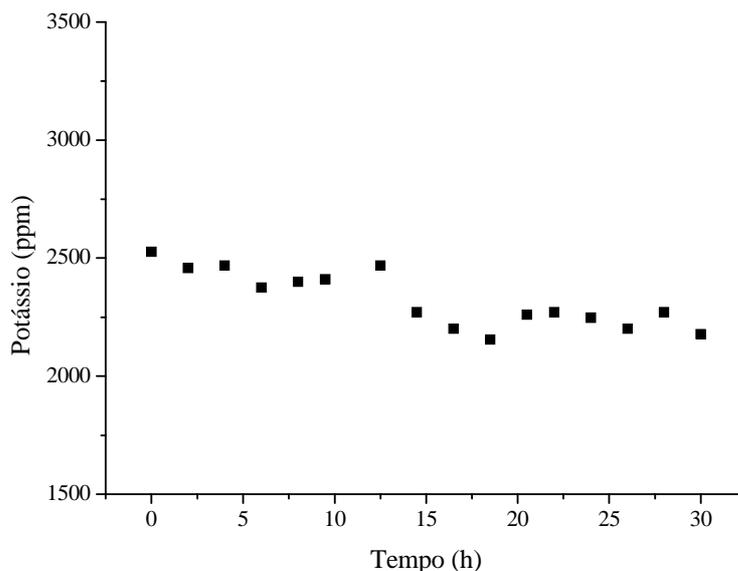


Figura 39. Perfil das concentrações de potássio durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em vinhaça

A opção pelo monitoramento do potássio deve-se ao fato deste íon ser o principal composto nutriente da vinhaça, estando sempre presente em quantidade significativa. Suelter (1970), Booth (1985), Sutherland et al. (1986), Giaever et al. (1988), Csonka et al., (1991) e Palleros et al., (1993), citados por Alahari et al. (2001), relatam que o potássio tem papel fundamental na manutenção do pH intra-celular, ativação enzimática, expressão gênica e regulação do stress em células microbianas.

O mecanismo de transporte de íons em cianobactérias está ainda pouco elucidado. Dewar e Barber (1973), estudando a regulação catiônica em *Anacystis nidulans*, concluíram que o micro-organismo possui um sistema de discriminação entre sódio e potássio, sendo o sódio eliminado do interior das células para o meio de cultivo e o potássio acumulado na biomassa.

Segundo Berry et al. (2003), os mecanismos de transporte de potássio ocorrem de forma diferente em cianobactérias halofílicas, como as do gênero *Aphanothece* sp., do que com micro-organismos não tolerantes a sais, como *Anabaena* e *Anacystis*, em ambientes que apresentam baixa disponibilidade de potássio e o transporte ativo é exigido.

Nos experimentos com vinhaça os teores de potássio oscilaram ao longo do tempo e, embora o comportamento de *Chlorella vulgaris* apresente uma tendência melhor de consumo do que da *Aphanothece microscopica Nægeli*, não houve remoção

significativa deste nutriente. Pelo fato de não ter havido monitoramento do íon sódio, não foi possível estabelecer relação entre o consumo de um íon e o acúmulo de outro. Entretanto, levando em conta os objetivos do trabalho em questão, este fato não afeta a viabilidade da utilização da vinhaça como meio de cultivo para as microalgas.

Segundo Freire e Cortez (2000), os elevados índices de DBO e DQO, resultado da riqueza da vinhaça em material orgânico coloidal, contribuem para o seu elevado poder poluente quando aplicada no solo. Assim, para se adequar aos padrões ambientais de qualidade, deve haver um tratamento prévio para remoção do material coloidal solúvel, o que tradicionalmente pode ser feito através de métodos físico-químicos. Tais métodos, entretanto, tendem a ter custo elevado, além de demandarem elevada quantidade de água, tornando-se pouco interessantes. Como alternativa, o tratamento de vinhaça via digestão anaeróbia apresenta menor consumo de energia, com conseqüente menor produção de biomassa, além da obtenção de metano útil às indústrias e produção de efluentes passíveis de serem utilizados como fertilizantes. Por outro lado, tal tratamento é limitado quanto à redução da carga poluidora, podendo gerar efluentes com valores de DBO ainda acima dos exigidos pela legislação ambiental (BASTOS et al., 2009a). Neste sentido, o cultivo de microalgas aponta como alternativa interessante tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico, uma vez que, ao mesmo tempo em que remove nutrientes e matéria orgânica, contribuindo para redução da carga poluidora, é possível obter biomassa passível de ser utilizada para diversas finalidades.

O cultivo das microalgas *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em vinhaça demonstra alta eficiência na remoção de glicose e DQO, além de elevado rendimento em biomassa pela *Aphanothece*. Em outros termos, foi possível obter elevada concentração de biomassa da cianobactéria a partir da conversão de compostos orgânicos presentes na vinhaça.

A demanda por proteínas para alimentação humana e animal aumenta cada vez mais, especialmente nos países em desenvolvimento. Nesse sentido, proteínas de origem microbiana são interessantes porque seu cultivo intensivo é menos dependente de condições climáticas e de solo (KUHAD et al., 1997). Denomina-se “single-cell protein” (SCP) as células secas de micro-organismos, tais como leveduras, bactérias, fungos ou microalgas, cultivadas em sistemas de larga escala para utilização como fonte protéica na alimentação animal ou humana (ZEPKA et al., 2010). *Aphanothece microscopica* Nägeli tem sido estudada para produção de SCP, sendo caracterizada em

termos sensoriais, perfil de ácidos graxos e efeito histológico na dieta de ratos Wistar, com resultados promissores como fonte de nutrientes (QUEIROZ et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; ZEPKA et al., 2008; 2010). Logo, a utilização de resíduos, como a vinhaça, como meio de cultivo para produção de microalgas e cianobactérias constitui uma fonte barata e abundante de nutrientes, com possibilidade de se obter biomassa com alto valor agregado.

5.4 Caracterização da biomassa microalgal

A Tabela 11 apresenta a composição em termos de proteínas e lipídios dos inóculos das microalgas *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* cultivadas em meios BGN e WC, respectivamente, 25°C e condições fotoautotróficas (fotoperíodo claro-escuro, 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$).

Tabela 11. Composição protéica e lipídica dos inóculos de *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* cultivados em meios BGN e WC.

Microalga	Proteínas ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	Lipídios ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)
<i>Aphanothece microscopica</i>	51,25 \pm 2,66	1,015 \pm 0,16
<i>Chlorella vulgaris</i>	57,8 \pm 0	5,44 \pm 0,48

* $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} = \text{g}$ proteínas ou lipídios / g biomassa seca

De acordo com Becker e Venkataraman (1984) *Chlorella vulgaris* apresenta composição média de 51-58% de proteínas e 14-22% de lipídios. Entretanto estes valores são muito variáveis. Morais e Costa (2008), avaliando o conteúdo lipídico e o perfil de ácidos graxos de quatro espécies de microalgas, dentre elas *C. vulgaris*, observaram valores entre 3 e 4,6%.

Cianobactérias, como *Aphanothece* sp., apresentam elevados teores protéicos, entre 40 e 60% do peso seco, além de vitaminas, ácidos graxos e carboidratos que justificam sua utilização na alimentação (GRIMA et al., 2003; JACOB-LOPES et al., 2006). O conteúdo de lipídios, entretanto, tende a ser inferior ao verificado em microalgas clorofíceas. Queiroz et al. (2011), durante cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli em efluente de pescado, observaram conteúdo de lipídios entre 7 e 15%.

A Tabela 12 apresenta a composição média das microalgas em termos de proteínas e lipídios após cultivo heterotrófico em meios de cultura suplementados com diferentes fontes de carbono e em vinhaça, considerando o tempo de concentração celular máxima.

Tabela 12. Composição protéica e lipídica de *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Chlorella vulgaris* após cultivo heterotrófico em meio suplementado com glicose, glicerol e acetato e em vinhaça.

<i>Aphanothece microscopica Nægeli</i>				
Tratamento	Proteínas		Lipídios	
	Média ± Dp (g.100g ⁻¹)	Produtividade (g.100g ⁻¹ .h ⁻¹)	Média ± Dp (g.100g ⁻¹)	Produtividade (g.100g ⁻¹ .h ⁻¹)
Glicose	20,5 ± 2,83	0,85	1,77 ± 0,06	0,074
Glicerol	25,8 ± 1,19	0,86	3,4 ± 0,14	0,11
Acetato	49,8 ± 5,94	1,66	1,8 ± 0,24	0,06
Vinhaça	15,48 ± 0,39	0,86	1,11 ± 0,18	0,06

<i>Chlorella vulgaris</i>				
Tratamento	Proteínas		Lipídios	
	Média ± Dp (g.100g ⁻¹)	Produtividade (g.100g ⁻¹ .h ⁻¹)	Média ± Dp (g.100g ⁻¹)	Produtividade (g.100g ⁻¹ .h ⁻¹)
Glicose	36,68 ± 3,46	1,53	1,61 ± 0,17	0,07
Glicerol	30,63 ± 0,007	0,90	5,18 ± 0,44	0,15
Acetato	49,6 ± 3,14	1,27	2,57 ± 0,45	0,06
Vinhaça	14,2 ± 1,46	0,71	0,99 ± 0,21	0,05

* g.100g⁻¹ = g proteínas ou lipídios /g biomassa seca

Comparando os valores médios obtidos durante os cultivos heterotróficos com o conteúdo protéico dos inóculos das microalgas, observaram-se valores sempre inferiores, o que pode ser atribuído ao fato de que os inóculos iniciais constituíam culturas melhor estabelecidas, cultivadas durante vários dias em meios de cultura padrão. Por este motivo, a composição da biomassa obtida durante os cultivos heterotróficos foi avaliada em termos de produtividade e não somente do conteúdo médio de proteínas e lipídios.

Com relação à fração protéica, para *Aphanothece microscopica Nägeli* a maior produtividade foi obtida quando a cianobactéria foi cultivada em meio suplementado com acetato de potássio ($1,66 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), enquanto nos demais cultivos a produtividade foi semelhante ($0,85 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Já para *Chlorella vulgaris* os maiores valores foram verificados durante os cultivos em meios suplementados com glicose e acetato ($1,53$ e $1,27 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente), sendo superiores aos observados durante os cultivos em glicerol e em vinhaça ($0,90$ e $0,71 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente). De acordo com Perez-Garcia et al. (2011a), a síntese de transportadores protéicos pelas microalgas é reduzida na presença de glicose, glicerol e acetato, o que explicaria o menor teor protéico da biomassa obtida nos cultivos heterotróficos. Já com relação a vinhaça, por constituir um subproduto da fermentação alcoólica, os valores de produtividade protéica são aceitáveis para ambas as microalgas.

Com relação à fração lipídica, para ambas as microalgas a produtividade foi superior nos cultivos em meio suplementado com glicerol, sendo praticamente o dobro das produtividades observadas nas demais condições. A presença de glicerol como fonte de carbono para o cultivo heterotrófico de microalgas tende a reduzir a atividade metabólica da via das pentose-fosfato (PEREZ-GARCIA et al., 2011a), o que pode sugerir crescimento mais lento e acúmulo de compostos de reserva. Entretanto, a literatura não reporta relação clara entre a assimilação de glicerol e a síntese de ácidos graxos. Narayan et al. (2005) utilizaram glicerol como complemento do meio para o cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis*. Os autores verificaram redução no conteúdo de clorofila-a e ficocianinas, mas não no conteúdo de lipídios, cujo teor foi comparável ao tratamento controle com meio de cultura convencional, porém com variações nos perfis de ácidos graxos e lipídios totais.

Liang et al. (2009), comparando diferentes fontes de carbono no crescimento e composição celular de *C. vulgaris*, verificaram maiores conteúdos de lipídios e proteínas quando o meio foi suplementado com glicerol ou acetato do que quando utilizou-se glicose. Também Yan et al. (2011), avaliando a composição celular da cianobactéria *Synechococcus* sp. em diferentes fontes de carbono, observaram maior conteúdo de lipídios em cultivos com acetato do que com glicose. Com base no fluxo metabólico da cianobactéria os autores destacam que, sob condições mixotróficas, a rota glicolítica é estimulada pela glicose e deprimida pelo acetato, enquanto a rota do ácido tricarbóxico aumenta com ambos os substratos. Logo, a glicose é capaz de fornecer

energia química e precursores para formação celular, enquanto o acetato desempenha um importante papel no suprimento de precursores para síntese de lipídios.

Para ambas as microalgas os cultivos em vinhaça refletiram em conteúdos de lipídios inferiores aos verificados quando se utilizou meio de cultura suplementado com as diferentes fontes de carbono. Da mesma forma, em estudos com outras águas residuárias foram observadas maiores produtividades lipídica e protéica do que as obtidas nos experimentos com vinhaça. Zepka et al. (2008), avaliando a composição de *Aphanothece microscopica Nägeli* cultivada em efluente da parboilização do arroz e submetida à diferentes condições de secagem, observaram produtividades lipídica e protéica de 0,29 e 1,67 g.100g⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Já Borghetti (2009), trabalhando com *C. minutíssima* em meio suplementado com diferentes concentrações de manipueira, verificou teores de lipídios de 8-11% e de 34-55% de proteínas. Segundo Ratledge (2004), para um micro-organismo acumular lipídios na biomassa é recomendado que seja cultivado em um meio com excesso de carbono e quantidade limitante de nitrogênio. Desta forma, conforme o micro-organismo se desenvolve, o suprimento de nitrogênio é rapidamente esgotado enquanto a assimilação da fonte de carbono continua, fazendo com que o substrato seja diretamente canalizado para a síntese de lipídios, com conseqüente acúmulo de triglicerídeos nas células. A vinhaça, entretanto, constitui um material rico em proteínas, com baixa relação C/N (C/N = 15; CERRI et al., 1988), o que justifica o menor acúmulo de lipídios pelas microalgas. Contudo, os valores de produtividade lipídica ainda são superiores aos encontrados na literatura para a maioria das microalgas (MATA et al., 2010). Assim, o processo pode ser considerado viável, haja vista o uso de uma água residuária e de inóculos com baixo teor de lipídios inicial.

Em geral, a produtividade de biomassa e o teor de lipídios são inversamente proporcionais, uma vez que a biossíntese de lipídios representa elevado custo metabólico para as microalgas (RATLEDGE, 2004; QUEIROZ et al., 2011). Assim, a limitação de nutrientes, como fósforo ou nitrogênio, tem sido frequentemente relatada como alternativa para reforçar o acúmulo de lipídios na biomassa (RODOLFI et al., 2008; XIN et al., 2010; SU et al., 2011).

A composição e a concentração dos compostos celulares das microalgas refletem a natureza do micro-organismo, a influência das condições de cultivo e do estado fisiológico da cultura (TOKUSOGLU; ÜNAL, 2003; ZEPKA et al., 2008). Assim, uma

vez que existem diferentes aplicações para a biomassa das microalgas, é necessário decidir qual a finalidade do cultivo para então selecionar a espécie e as condições ideais para otimização do processo.

5.5 Separação da biomassa

A cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* apresentou os melhores resultados nos cultivos em vinhaça, ou seja, maior remoção de DQO (60,7% em 30 horas) e alta conversão de matéria orgânica do efluente em biomassa (média de 0,58 mg/mg). Desta forma, foram conduzidos ensaios de coagulação em “jar-test” posteriores ao cultivo da cianobactéria em vinhaça para avaliação da separação da biomassa e matéria orgânica remanescente. Como controle, foi realizado o mesmo teste a partir de cultivo em meio padrão BGN. A Tabela 13 apresenta a eficiência de remoção de turbidez e número de células da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* cultivada em meio de cultura BGN após o processo de coagulação com FeCl_3 .

Tabela 13. Remoção de turbidez e número de células de *Aphanothece microscopica Nægeli* cultivada em meio BGN após processo de coagulação com cloreto férrico

Parâmetro	Eficiência de remoção (%)
Turbidez (NTU)	89
Concentração celular (cél.mL ⁻¹)	93,5

Pelos dados verifica-se remoção considerável destes parâmetros, demonstrando a aplicabilidade do processo de coagulação na remoção da biomassa desta cianobactéria (Figura 40). Os resultados dos testes com vinhaça estão apresentados na Tabela 14.

A coagulação com cloreto férrico levou principalmente à remoção de turbidez e do número de células da cianobactéria. Segundo Grima et al. (2003) e Harun et al. (2010), as células das microalgas carregam uma carga negativa que impede a sua agregação quando em suspensão, e esta carga pode ser neutralizada pela adição de flocculantes. No caso da vinhaça, apesar da remoção de 53% da turbidez, a aparência geral não foi alterada, mantendo-se escura, com baixa remoção de DQO (10,4%) (Figura 41).

Tabela 14. Remoção de DQO, turbidez e número de células de *Aphanothece microscopica Nægeli* cultivada em vinhaça após o processo de coagulação com cloreto férrico

Parâmetro	Eficiência de remoção (%)
DQO (mg.L^{-1})	10,4
Turbidez (NTU)	53
Concentração celular (cél.mL^{-1})	58,6

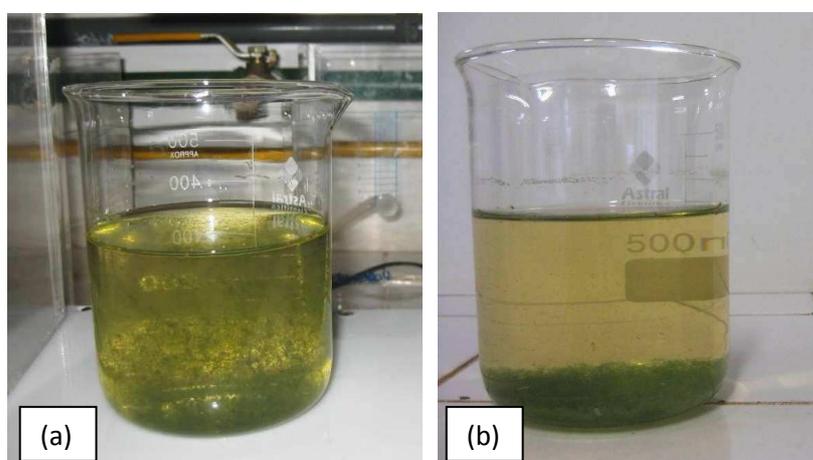


Figura 40. Meio de cultura BGN cultivado com *Aphanothece microscopica Nægeli* após processo de coagulação com FeCl_3 . (a) Imediatamente após a coagulação e (b) após 15 minutos de sedimentação

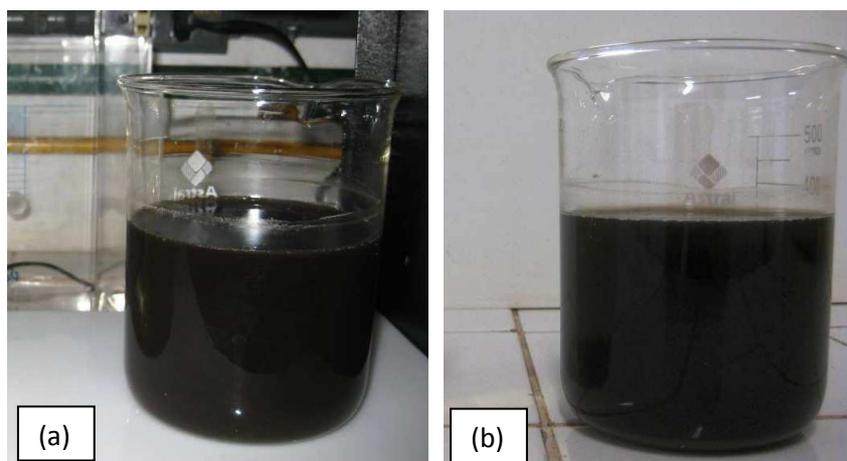


Figura 41. Vinhaça cultivada com *Aphanothece microscopica Nægeli* após processo de coagulação com FeCl_3 . (a) Imediatamente após a coagulação e (b) após 15 minutos de sedimentação

Amuda e Amoo (2007), utilizando a mesma concentração de 300 mg.L^{-1} de FeCl_3 na coagulação de água residuárias da indústria de bebidas, verificaram remoção de 73% de DQO. Já Zayas et al. (2007), trabalhando com vinhaça pré-tratada em reatores anaeróbios UASB, utilizaram 20 g.L^{-1} de FeCl_3 e obtiveram remoções de 84; 98,4 e 99,2% de DQO, cor e turbidez, sugerindo que uma elevada dose de coagulante é necessária para obter remoção significativa na vinhaça, devido à elevada quantidade de material orgânico ali presente. As menores remoções de DQO e turbidez observadas no estudo com 300 mg.L^{-1} de FeCl_3 podem ser explicadas pelo fato da vinhaça ter sido utilizada sem um tratamento prévio que reduza significativamente sua DQO e turbidez, quando se comparam os resultados com os obtidos para a vinhaça pré-tratada e a água residuária da indústria de bebidas.

Embora vários sais de metal possam ser utilizados como floculantes, sulfato de alumínio pode ser mais eficiente (LEE et al., 1998). Papazi et al. (2010) avaliaram o potencial de doze sais quanto à capacidade de coagular células em culturas de microalgas *Chlorella minutissima*. Os autores observaram que, embora os sais de cloreto, incluindo FeCl_3 , foram mais eficientes comparando-se com os sais de sulfatos, o íon alumínio foi mais eficiente do que o íon férrico. Segundo os autores, íons de alumínio são mais eficientes pois apresentam maior densidade de carga e menor peso molecular do que íons férricos, implicando em melhor neutralização das cargas de superfície das células de microalgas e em menor solubilidade. Entretanto, Manetti (2008), avaliando o efeito de dois coagulantes [FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$] em três concentrações (300 e 550 mg.L^{-1}) na separação da biomassa de *Aphanothece microscopica Nægeli* gerada no tratamento do efluente da indústria pesqueira, verificou que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou 300 mg.L^{-1} de FeCl_3 na coagulação, resultando em remoções de 85, 97 e 93% de DQO, turbidez e sólidos suspensos, respectivamente.

Visando futuras aplicações, a biomassa de *Aphanothece microscopica Nægeli* separada por FeCl_3 deve ser avaliada em termos de composição química (fração de proteína ou lipídios). Papazi et al. (2010) observaram que, na coagulação de *Chlorella minutissima* por sais férricos, a coloração da biomassa mudou de verde para castanho-amarelado, sugerindo influência dos coagulantes no pigmento da microalga, especialmente clorofilas. Entretanto, os autores não observaram efeitos adversos sobre o aparato fotossintético e viabilidade celular. Também Harun et al. (2010) relataram que

os produtos químicos catiônicos são capazes de coagular as células das algas sem afetar a composição e toxicidade do produto final obtido.

Os resultados sugerem a possibilidade de remoção de 10,4% de DQO pela utilização de FeCl_3 , além da parte removida biologicamente pela cianobactéria, em torno de 60% (Figura 31). Assim, a utilização da coagulação constitui alternativa interessante para separação desta biomassa pouco sedimentável, embora mereça estudos mais profundos.

6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste estudo pode-se concluir:

- Dos cultivos mixotróficos foram selecionadas as concentrações ótimas de 25 e 12,5 g.L⁻¹ de glicose; 0,5 e 1,25 g.L⁻¹ de acetato de potássio e 0,46 e 0,92 g.L⁻¹ de glicerol como ideais para o cultivo das microalgas *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente;

- Nos ensaios heterotróficos, as microalgas apresentaram velocidades específicas de crescimento máximas e concentrações celulares iguais ou superiores aos cultivos mixotróficos, com remoções entre 30 e 90% dos substratos avaliados;

- Nos ensaios com vinhaça verificaram-se remoções de 55,5% e 60,8% de glicose e DQO pela cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*, com crescimento expressivo e alto rendimento em biomassa;

- A biomassa de ambas microalgas obtida nos ensaios com as diferentes fontes de carbono apresentou maior teor de proteínas quando se utilizou glicose e acetato, enquanto os teores de lipídios foram maiores nos cultivos com glicerol;

- O processo de coagulação com cloreto férrico removeu parte da turbidez e do número de células da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*, podendo ser uma alternativa de separação da biomassa;

- Os resultados comprovaram o metabolismo heterotrófico de ambos os microorganismos e demonstram a possibilidade de utilização da vinhaça como meio de cultivo para microalgas, com destaque para a cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*, que apresentou maior conversão em biomassa, sugerindo a possibilidade de produzir biomassa com alto valor agregado a partir de um meio de baixo custo.

7 REFERÊNCIAS

- ALAHARI, A.; BALLAL, A.; APTE, S. K. Regulation of potassium-dependent Kdp-ATPase expression in the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena torulosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5778 – 5781, 2001.
- APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21 ed. Washington, D.C., 2005.
- AMUDA, O. S.; AMOO, I. A. Coagulation/flocculation process and sludge conditioning in beverage industrial wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, n. 3, p. 778-783, 2007.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. J. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, p. 130-134, 2007.
- ANDRADE, L. N. et al. Toxicidade da vinhaça para a cianobactéria *Spirulina platensis*. In: XIII PECNORDESTE - Seminário Nordeste de Pecuária, Fortaleza-CE, 2009.
- ARDELAN, I.; ZARNEA, G. Photosynthesis Respiration Interplay in Cyanobacteria: Fundamentals and Application. In: SUBRAMANIAN, G.; KAUSHIK, B. D.; VENKATARAMAN, G. S. **Cyanobacterial Biotechnology**. Science Publishers, Inc. USA, 1998, p. 103-107.
- ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 64-70, 2006.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**, 15 ed. Washington, D.C., 1990.
- AYAZ, S.; AKÇA, L. Treatment of wastewater by natural systems. **Environmental International**, v. 26, p. 189-195, 2001.
- AZMA, M. et al. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 187–195, 2011.
- BARROCAL, V. M. et al. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 851-856, 2010.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Bioengineering**. Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group, 2006. p.1-34.
- BASTOS, R. G. et al. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica Nægeli* na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 112-116, 2004.
- BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I. Consumo e transferência de oxigênio no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli*. In: XVII Congresso Brasileiro de

Engenharia Química, Recife, 2008.

BASTOS, R. G. et al. Cultivo mixotrófico e heterotrófico de cianobactéria em água residuária da indústria sucroenergética. In: XVII SINAFERM – Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, 2009a.

BASTOS, R. G. et al. Consumo de oxigênio por cianobactéria em vinhaça a diferentes temperaturas. In: IX SHEB - Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, 2009b.

BASTOS, R. G. et al. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli*. **Revista Ambiente e Água**, v. 5, n. 3, p. 258-264, 2010a.

BASTOS, R. G.; OGATA, B. H., LOPES, J. J. C.; PARAZZI, C. Glucose consumption by *Aphanothece microscopica Nægeli* immobilized on calcium alginate beads. In: 4th International Congress on Bioprocess in Food Industries (ICBF), Curitiba, 2010b.

BASTOS, R. G. et al. Growth of cyanobacteria *Aphanothece sp.* on exogenous sugars. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 156-161, 2011.

BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. **Biomass**, v. 4, p. 105-125, 1984.

BENEMANN, J. R. Microalgae products and production: An overview. **Journal of industrial microbiology**, v. 31, n. 5, p. 247-256, 1990.

BENEMANN, J. R. **Microalgae biofuels: A brief introduction**. Disponível em: <<http://advancedbiofuelsusa.info/wp-content/uploads/2009/03/microalgae-biofuels-an-introduction-july23-2009-benemann.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2011.

BERRY, S. et al. Potassium uptake in the cellular cyanobacteria *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 mainly depends on a Ktr-like system encoded by *slr 1509 (ntpJ)*. **FEBS Letters**, v. 548, p.53-58, 2003.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOAVENTURA, K; M. et al. State observers for a biological wastewater treatment nitrogen removal process in a sequential batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 1-14, 2001.

BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313–321, 1998.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Estudo de diferentes combinações de melão/vinhaça como substrato para produção de proteínas e lipídios por microrganismos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 27, n. 1, p. 03-10, 2006.

CERRI, C.C. et al. Resíduos orgânicos das agroindústria canavieira: 1. Características físicas e químicas. **STAB**, v. 6, n. 93, p. 34-37, 1988.

CERÓN-GARCÍA, M.C. et al. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 689–694, 2006.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **P4.231**. Vinhaça: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo: CETESB, 2006. 12 p.

CHAPMAN, A. R. O. Chlorophyta. In: LASKIN, A. I.; LECHEVALIER, H. A. **Handbook of Microbiology: Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses**, v. 2. Cleveland: CRC Press, Inc, 1977. p. 381-399.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 421-426, 1996.

CHEN, G-Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 607–616, 2006.

CHEN, Y-H.; WALKER, T.H. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1973–1983, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294–306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v.26, n.3, p. 126-131, 2008.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Desenvolvimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011**. Disponível em: <www.conab.com.br>. Acesso em: 04 mar. 2012.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista brasileira de energia**, v.2, n.2, p. 1-17, 1992.

DE-BASHAN, L. E. 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**, v. 36, p. 2941–2948, 2002.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1611-1627, 2010.

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

DEWAR, M.A.; BARBER, J. Cation regulation in *Anacystis nidulans*. **Planta**, v. 113, n. 2, p. 143-155, 1973.

DUMAS, A. et al. Biotreatment of fish farm effluents using cyanobacterium *Phormidium bohneri*. **Aquacultural Engineering**, v. 17, n. 1, p. 57-68, 1998.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1525–1536, 2008.

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1-16, 2011.

FAY, P. **The blue-greens (Cyanophyta-cyanobacteria)**. Edward Arnold Publishers: London, 1983.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 56, n. 2, p. 340-373, 1992.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 101–105, 2011.

FOGG, G. E. Blue-green algae. In: LASKIN, A. I.; LECHEVALIER, H. A. **Handbook of Microbiology: Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses**, v. 2. Cleveland: CRC Press, Inc, 1977. p. 347-363.

FRANCISCO, E.C. et al. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 395-403, 2010.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Série Engenharia Agrícola, v. 1. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 203p.

GALACTION, A. I. et al. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactor for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 84-94, 2004.

GANTZER, C. J.; MAIER, W. J. **Biological degradation of cyanide by nitrogen-fixing cyanobacteria**. Hazardous Waste Engineering Research Laboratory – Department of Civil and Mineral Engineering, University of Minnesota, USA, 1988.

55p.

GONZALES, L. E.; CANIZARES, R. O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 60, p. 259-262, 1997.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow Green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

GRIMA, E. M. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037–1047, 2010.

HATA, J. et al. Characterization of energy conversion based on metabolic flux analysis in mixotrophic liverwort cells, *Marchantia polymorpha*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 65–74, 2000.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 162, p. 1978-1995, 2010.

HEREDIA-ARROYO, T. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245-2253, 2011.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38–46, 2010.

KHAN, S. A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 2361–2372, 2009.

KUHAD, R. C. et al. Microorganisms as an alternative source of protein. **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 3, p. 65-75, 1997.

JACOB-LOPES, E. et al. Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 482-488, 2006.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; FRANCO, T. T. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, n. 8, p. 1365-1373, 2008.

JEON, Y-C.; CHO, C-W; YUN, Y-S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 490–495, 2006.

- KIM, J. et al. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, v. 15, n. 4, p. 391-396, 2010.
- KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculums source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6012–6018, 2010.
- LEE, S. J. et al. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 14–18, 1998.
- LEE, Y. K. Algal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004. p. 116-124.
- LIM, S-L.; CHU, W-L.; PHANG, S-M. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7314–7322, 2010.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043–1049, 2009.
- LIANG, Y. et al. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6745–6750, 2010.
- LODI, A. et al. Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 656–660, 2003.
- MACEDO, A. C. **Produção de ácido hialurônico por cultivo em estado sólido de *Streptococcus zooepidemicus* em bagaço de caju**. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brok**. 10 ed. São Paulo; Prentice Hall Inc., 2004. 608p.
- MANETTI, A. G. S. **Avaliação do reúso da água residuária oriunda de uma indústria processadora de pescado utilizando *Aphanothece microscopica* Nägeli**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2008.
- MARQUEZ, F. J. et al. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 62, p. 159-164, 1995.
- MARTINEZ, M. E. et al. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263-272, 2000.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO N. S. Microalgae for biodiesel production and others applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy**

Reviews, v. 14, p. 217-232, 2010.

MATOS, V. C.; BASTOS, R. G. Glucose profile on cultivation of *Aphanothece microscopica* Nägeli immobilized in calcium alginate beads. **Holos Environment**, v. 11, n. 1, suplemento 1, p. 96, 2011.

MONTES, F. J.; CATALÁN, J.; GALÁN, M.A. Prediction of kLa in yeast broths. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 549-555, 1999.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, 2008.

MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3949–3964, 2008.

NAVARRO, A. R.; SEPÚLVEDA, M. del C.; RUBIO, M. C. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Waste Management**, v. 20, p. 581-585, 2000.

NARAYAN, M.S. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 7, p. 521-528, 2005.

O`GRADY, J.; MORGAN, J.A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 121–125, 2011.

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

OLIVEIRA, H. T.; CÁCERES, O. Resultados preliminares sobre o uso de vinhoto como meio de cultura para 8 espécies de microalgas de água doce. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.1, p. 601-610, 1986.

OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* CCAP-211/11b**. 1988. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.

ORENDAIN, H. Process for the treatment of stillage generated by distillation on the tequila industry. European Patent Application EP 1690926.

ORTEGA, J.; MORONTA, R.; MORALES, E. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. **Ciencia**, v. 12, n. 1, p. 25 - 31, 2004.

ORTIZ, C. P.; STEYER, J. P.; BORIES, A. Carbon and nitrogen removal from wastewater by *Candida utilis*: kinetic aspects and mathematical modeling. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 179-189, 1997.

PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using

cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 349-355, 2010.

PAULINO, A. F. et al. Produções agrícola e industrial de cana-de-açúcar submetida a doses de vinhaça. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n.2, p. 145-150, 2002.

PELROY, R. A.; BASSHAM, J. A. Kinetics of glucose incorporation by *Aphanocapsa* 6714. **Journal of Bacteriology**, v.115. p. 943-948, 1973.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011a.

PEREZ-GARCIA, O.; de-BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 190-199, 2011b.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635–648, 2004.

QUEIROZ, M. I. et al. The *Nagele microscocal Aphanothece* potential in the production of the single-cell protein from the remaining water. In: CHAMES, S. W. et al. (Eds.) **Proceedings of the eighth International Congress on Engineering and Food (ICEF 8)**, Pennsylvania, USA, 2001. p. 2027-2031.

QUEIROZ, M. I. et al. Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece microscopica Nægeli* en las aguas residuales de la parbolización del arroz. **Revista Información Tecnológica**, Chile, v.13, n. 1, p. 61-65, 2002.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q; BASTOS, R. G. Evaluation of single cell-protein production by *Aphanothece microscopica Nægeli* in batch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 215-220, 2004.

QUEIROZ, M. I. et al. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2163-2169, 2007.

QUEIROZ, M. I. et al. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nægeli* cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438-3443, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1992. 728p.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, p. 807–815, 2004.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004. 566p.

RIPKA, R. et al. Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures

of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RODOLFI, L.; et al. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, 2008.

SANSAWA, H.; ENDO, H. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 6, p. 437-444, 2004.

SCHMETTERER, G. Cyanobacterial Respiration. In: BRYANT, D. A. **The Molecular Biology of Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994, p. 409-435.

SHI, X-M. et al. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations. **Process biochemistry**, v. 34, p. 341-347, 1999.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Englewood Cliffs: Prentice Hall International Inc., 1992.

SILVA, E. B. et al. Remoção de nutrientes em águas residuárias da indústria de conservas utilizando *Aphanothece microscopica* Nägeli, **Vetor**, v. 15, n. 1, p. 19-23, 2005.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

SU, C-H. et al. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. **Journal of Applied Phycology**, v. 3, n. 5, p. 903-908, 2011.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of ammonia concentration on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 45-50, 1996.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 145-151, 2000.

TAM, N. F. Y.; WONG, J. P. K.; WONG, Y. S. Repetead use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and *WWI* for cyclic nickel biosorption. **Environmental Pollution**, v. 114, p. 85-92, 2001.

TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M.K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1144-1148, 2003.

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004. p. 3-19.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 07 set. 2011.

VALDERRAMA, L. T. et al. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscule*. **Water Research**, v. 36, p. 4185-4192, 2002.

VOLTOLINA, D. et al. Growth of *Scenedesmus sp.* in artificial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 265-268, 1999.

WANG, B.; et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 707–718, 2008.

WEN, Z.; JOHNSON, M. B. **Microalgae as a feedstock for biofuel production**. College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, 2009. 7p.

WOOD, B.J.B. et al. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 175–183, 1999.

WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 13-18, 2007.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494–5500, 2010.

YAN, R. et al. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus sp.* PCC7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 9, p. 2011.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 87–102, 2000.

ZAK, E. et al. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occurs in plasma membranes. **Plant Biology**, v. 98, n. 23, p. 13443-13448, 2001.

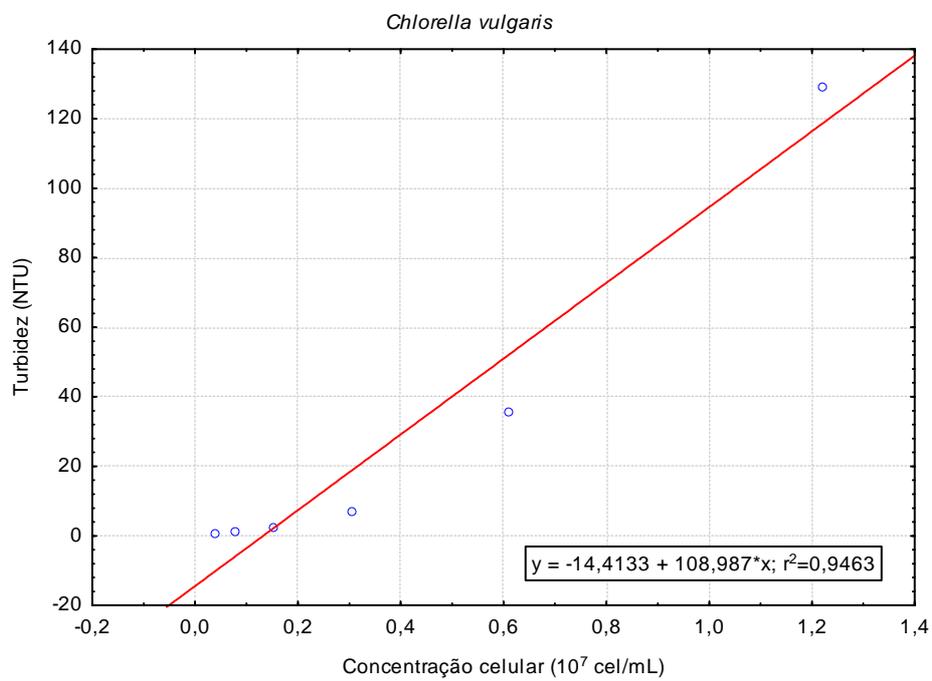
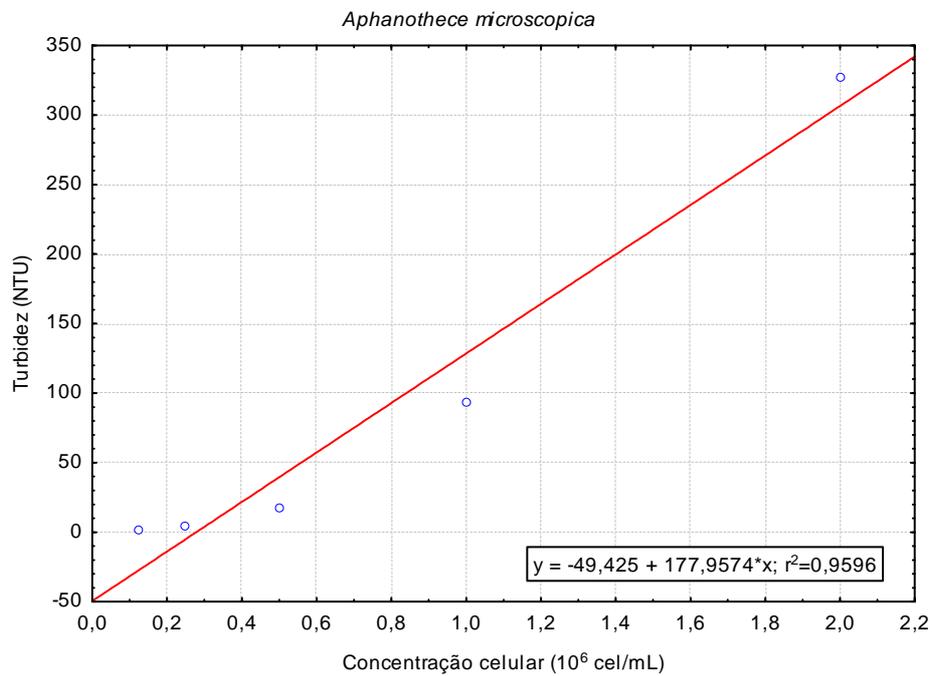
ZAYAS, T. et al. Applicability of coagulation/flocculation and electrochemical processes to the purification of biologically treated vinasse effluent. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p. 270–276, 2007.

ZEPKA, L. Q. et al. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1305–1310, 2008.

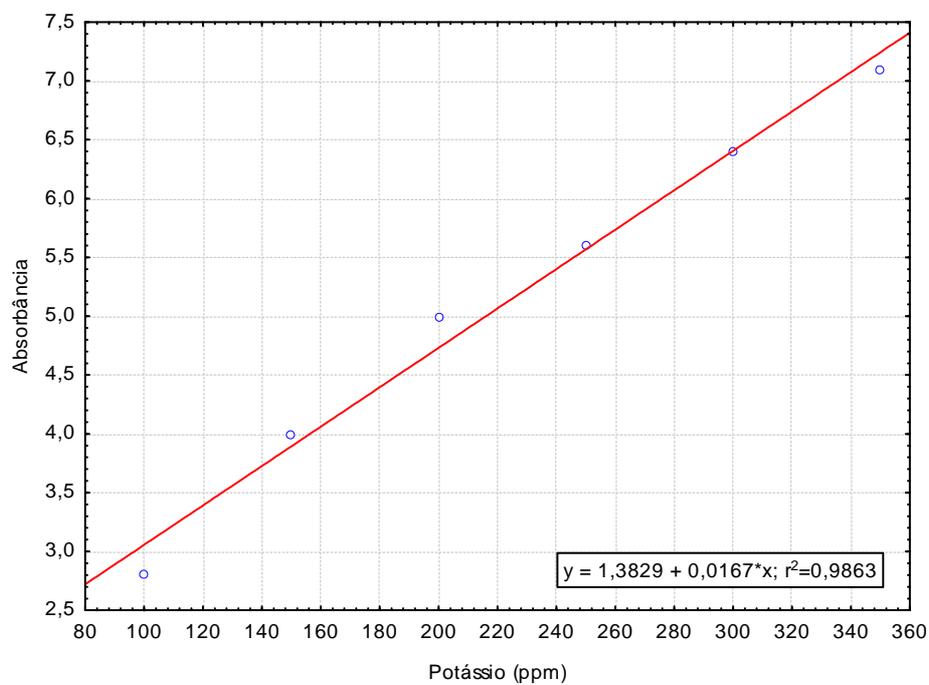
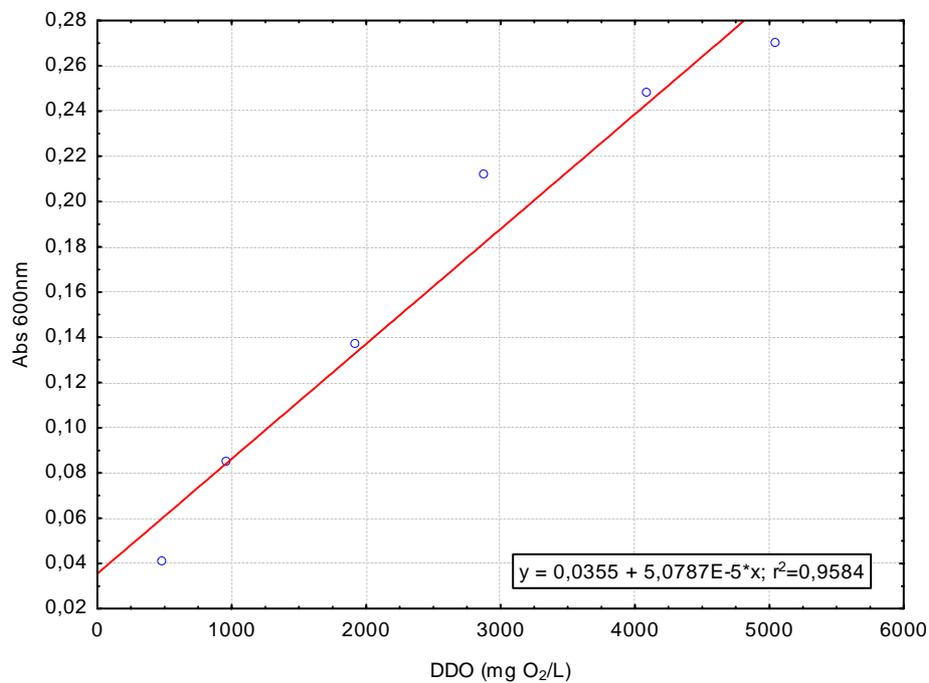
ZEPKA, L. Q. et al. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7107–7111, 2010.

ZHANG, X-W.; CHEN, F.; JOHNS, M.R. Kinetic models for heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in batch and fed-batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 385–389, 1999.

APÊNDICE A - Relação entre turbidez e concentração celular dos inóculos das microalgas.



APÊNDICE B - Curvas-padrão para análises de DDO em espectrofotômetro UV/VIS e de potássio em fotômetro de chama.



APÊNDICE C - Curvas-padrão para análises de glicose pelo método enzimático em espectrofotômetro UV/VIS.

