

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

Efeito da razão carbono:nitrogênio no cultivo heterotrófico de cianobactérias unicelulares e filamentosas em vinhaça de cana-de-açúcar

JÉSSICA CRISTINA FONTE

ARARAS
Março de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

Efeito da razão carbono:nitrogênio no cultivo heterotrófico de cianobactérias unicelulares e filamentosas em vinhaça de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Agricultura e Ambiente.

ARARAS
Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F682e Fonte, Jéssica Cristina
Efeito da razão carbono:nitrogênio no cultivo heterotrófico de cianobactérias unicelulares e filamentosas em vinhaça de cana-de-açúcar / Jéssica Cristina Fonte. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
75 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Cianobactéria. 2. Aphanocapsa. 3. Geitlerinema. 4. Vinhaça. 5. Razão Carbono/Nitrogenio. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Cristina Fonte, realizada em 31/03/2016:

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
UFSCar

Prof. Dr. Maurício Rigo
UNICENTRO

Profa. Dra. Elma Neide Vasconcelos Martins
UFSCar

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Dilaram por iluminar meus caminhos e confortar meu coração em todas as situações.

À minhas irmãs, Juliane e Julia, cujo carinho e alegria inspiram cada conquista.

À meus pais, Roselaine e Edson, pelo apoio nesta etapa que agora se encerra. E à toda minha família, cujo afeto lança as bases de meu crescimento.

Às amigas e amigos, tanto os que estão distantes quanto aos que batalharam junto a mim nestes dois anos: Hiléia, Natália, Talita, Ana Lúgia, Daniela, Ana Carolina, Donovan, Renan, Luís, Isabely, Renato, Fernanda, Letícia, Renata...

Ao meu orientador, Reinaldo, cuja persistência e paciência inesgotáveis o levaram a ouvir e participar de cada nova descoberta, frustração e recomeço.

Aos colegas de laboratório, por todo aprendizado que proporcionaram.

Aos meus queridos professores e professoras, por compartilhar um pouco de si mesmos enquanto ensinavam.

À toda equipe do Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente, especialmente aos nossos coordenadores, Claudinei e Kayna, por toda dedicação. Também à Sirlene, Kaity e Cris, sempre presentes e dispostas.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Centro de Ciências Agrárias, pela oportunidade.

Aos pesquisadores e pesquisadoras que, com seus esforços, enriquecem o mundo com novas possibilidades.

E a todas as pessoas que, direta e indiretamente, permitiram o advento de minha formação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Cianobactérias	4
2.1.1 Cianobactérias unicelulares.....	5
2.1.2 Cianobactérias filamentosas.....	8
2.2 Aplicação biotecnológica de cianobactérias	9
2.3 Cianobactérias no tratamento de águas residuárias	12
2.4 Vinhaça de cana-de-açúcar	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivos Gerais	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Preparo e manutenção dos inóculos	17
4.2 Preparo da vinhaça.....	19
4.3 Ensaio em frascos sob agitação	21
4.4 Parâmetros cinéticos de avaliação dos ensaios.....	22
4.5 Ensaio em biorreator de bancada	25
5 RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Seleção da razão C/N da vinhaça no cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em sistema de frascos agitados.....	28
5.2 Cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em biorreator de bancada com vinhaça ajustada na razão C/N selecionada.....	37
5.3 Seleção da razão C/N da vinhaça no cultivo de <i>Geitlerinema sp</i> em sistema de frascos agitados.....	43
5.4 Cultivo de <i>Geitlerinema sp</i> em biorreator de bancada com vinhaça ajustada na razão C/N selecionada.....	53
6 CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

2.1 <i>Aphanocapsa holsatica</i>	7
2.2 <i>Aphanocapsa holsatica</i> submetida à coloração com Azul de Metileno, observada em microscópio MOTIC BA 210TL	7
2.3 <i>Geitlerinema sp</i> , obsevada em microscópio MOTIC BA 210TL	9
2.4 Metabolismo de Carbono em cianobactérias para períodos de escuroe claro	11
4.1 Inóculos de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em meio BGN.....	18
4.2 Inóculos de <i>Geitlerinema sp</i> em meio BGN, sob aeração em estante de cultivo.....	19
4.3 Diagrama esquemático da determinação de lipídios totais na biomassa através do método Bligh e Dyer	22
4.4 Esquema do procedimento experimental para o cultivo das cianobctérias em frascos sob agitação.....	25
4.5 Esquema do biorreator de bancada utilizado nos experimentos	26
5.1 Produtividade em biomassa para cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> a partir de vinhaça com diferentes razões C/N	29
5.2 Curvas de crescimento de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em vinhaça nas razões C/N 5, 20 e 40	32
5.3 Perfis de relação C/N da vinhaça durante o crescimento de <i>A. holsatica</i> para os valores 5, 20 e 40	33
5.4 Perfis do consumo de carbono orgânico total (TOC) a partir do valor inicial (TOC ₀) no cultivo da cianobactéria <i>Aphanocapsa holsatica</i> em vinhaça com razões C/N 5, 20 e 40	35
5.5 Perfis do consumo de nitrogênio (N) a partir do valor inicial (N ₀) no cultivo da cianobactéria <i>Aphanocapsa holsatica</i> em vinhaça com razões C/N 5, 20 e 40	36
5.6 Monitoramento de oxigênio e gás carbônico no cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5	38
5.7 Curva de consumo de oxigênio no cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5 (as setas indicam o corte e posterior realimentação da aeração).....	39
5.8 Monitoramento do pH do meio no cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5	40

5.9 Curva de crescimento de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5	41
5.10 Perfis de carbono orgânico total, TOC (a) e nitrogênio total, TN (b) no meio durante o cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5.....	42
5.11 Produtividade em biomassa para cultivo de <i>Geitlerinema sp</i> a partir de vinhaça com diferentes razões C/N	44
5.12 Curva de crescimento de <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 20.....	46
5.13 Perfil do consumo de carbono orgânico total a partir do valor inicial no cultivo da cianobactéria <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 20.....	46
5.14 Perfil do consumo de nitrogênio (N) a partir do valor inicial (N ₀) no cultivo da cianobactéria <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 20.....	47
5.15 Curva de crescimento de <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 5	48
5.16 Perfil do consumo de carbono orgânico total a partir do valor inicial no cultivo da cianobactéria <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 5.....	48
5.17 Perfil do consumo de nitrogênio a partir do valor inicial no cultivo da cianobactéria <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 5	49
5.18 Curva de crescimento de <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 40	50
5.19 Perfil do consumo de carbono orgânico total a partir do valor inicial no cultivo da cianobactéria <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 40.....	50
5.20 Perfil do consumo de nitrogênio (N) a partir do valor inicial (N ₀) no cultivo da cianobactéria <i>Geitlerinema sp.</i> em vinhaça com razão C/N 40.....	51
5.21 Monitoramento de oxigênio no cultivo de <i>Geitlerinema sp</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5.....	54
5.22 Curva de consumo de oxigênio no cultivo de <i>Geitlerinema sp.</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5.....	54
5.23 Monitoramento do pH do meio no cultivo de <i>Geitlerinema sp</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5.....	55

5.24 Curva de crescimento de <i>Geitlerinema sp</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5.....	55
5.25 Perfis de carbono orgânico total e nitrogênio total no meio durante o cultivo de <i>Geitlerinema sp</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5	56

LISTA DE TABELAS

2.1 Composição química da vinhaça	15
4.1 Composição do meio BG11	17
4.2 Características das amostras de vinhaça empregadas	20
5.1 Variação de carbono e nitrogênio no meio para cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em diferentes razões C/N por 24 horas	30
5.2 Velocidades específicas de crescimento, tempos de geração e produtividades para cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em frascos agitados com vinhaça nas razões C/N 5, 20 e 40	32
5.3 Parâmetros cinéticos de crescimento e remoção de substratos no cultivo de <i>Aphanocapsa holsatica</i> em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5.....	43
5.4 Variação de biomassa e teores de Carbono e nitrogênio totais no meio para <i>Geitlerinema sp</i> , em cultivos de 24 horas.....	45

RESUMO

Diversas pesquisas indicam metabolismo heterotrófico em algumas linhagens de cianobactérias, possibilitando sua aplicação na incorporação e consumo de moléculas orgânicas e nutrientes em águas residuárias. A vinhaça constitui a principal água residuária do setor sucroenergético, tanto em termos de composição quanto de geração, sendo que esta apresenta uma considerável variação em termos de composição química, afetando diretamente a sua relação carbono:nitrogênio. *Aphanocapsa holsatica* é uma cianobactéria unicelular com comprovado crescimento fotoheterotrófico. *Geitlerinema sp* é uma cianobactéria filamentosa que apresenta a capacidade de formar agregados, sedimentando naturalmente em meios de cultivo. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o cultivo das cianobactérias em vinhaça de cana-de-açúcar ajustada com diferentes razões C/N iniciais. Os experimentos foram conduzidos primeiramente em sistema de frascos agitados para seleção da razão C/N que possibilitava a maior produção de biomassa e/ou consumo de carbono e nitrogênio do meio. Na razão C/N selecionada, foram conduzidos ensaios em biorreator de bancada, com ajuste de aeração e agitação, além do monitoramento em linha de pH e gases. Os resultados indicaram crescimento de ambos micro-organismos para a faixa de razão C/N testada, com elevadas produtividades na razão C/N 5 e 40 e maiores remoções de carbono e nitrogênio para *Geitlerinema*. O ensaio em biorreator de bancada com *Aphanocapsa* indicou baixa demanda de oxigênio, remoções de carbono e nitrogênio em biorreator da ordem de 25 e 18%, respectivamente, além de uma velocidade específica de crescimento máximo cerca de cinco vezes superior ($0,5 \text{ h}^{-1}$) ao obtido em frascos agitados. Para *Geitlerinema sp.* na razão C/N 5, cinética de consumo de carbono de primeira ordem possibilitou elevadas remoções em torno 85% em biorreator de bancada. Os dados experimentais indicam a viabilidade do cultivo de ambas cianobactérias em vinhaça na faixa de razão C/N de 5 a 40, com elevada conversão em biomassa para a cianobactéria unicelular e elevada remoção de carbono para a cianobactéria filamentosa.

Palavras-chave: cianobactéria, *Aphanocapsa*, *Geitlerinema*, vinhaça, razão C/N

ABSTRACT

Several researches suggests heterotrophic metabolism in some strains of cyanobacteria, allowing its application in the development and consumption of organic molecules and nutrients in wastewater. Vinasse is the main wastewater from sugarcane processing, both in terms of composition and volume, and this presents a considerable variation in chemical composition, directly affecting their relationship carbon:nitrogen (C/N). *Aphanocapsa holsatica* is a unicellular cyanobacterium with proven foto-heterotrophic growth. *Geitlerinema sp* it is a filamentous cyanobacterium that has the ability to form aggregates, sedimenting in culture medium. In this context, the study aimed to evaluate the cultivation of cyanobacteria in sugarcane vinasse adjusted with different initial C/N ratio. The experiments were firstly set up in shake flasks for screening of the C/N ratio that allowed the largest biomass production and/or carbon and nitrogen uptakes. In the C/N ratio selected, experiments were set up in a bench bioreactor, with aeration and mixing, in addition to online monitoring of pH and gases. Results showed growth of both microorganisms to the C/N ratio range tested, with high productivities in 5 and 40 and larger carbon and nitrogen removal by *Geitlerinema*. In the bench bioreactor, *Aphanocapsa* presents low oxygen demand, carbon and nitrogen removal about 25 and 18%, respectively, and a maximum specific growth rate about five times higher (0.5 h^{-1}) obtained in the shake flasks. For *Geitlerinema sp*, in C/N ratio 5 presents carbon consumer first-order kinetics, enabled high removals around 85%. Experimental data indicate the feasibility of growing in both cyanobacteria vinasse in the C N ratio range from 5 to 40, with high conversion of biomass to unicellular cyanobacterium and high carbon removal for filamentous cyanobacterium.

Keywords: cyanobacteria, *Aphanocapsa*, *Geitlerinema*, vinasse, C/N ratio

1. INTRODUÇÃO

Como extenso produtor de etanol, o Brasil gera também um considerável volume de vinhaça de cana-de-açúcar. A vinhaça gerada na destilação alcoólica constitui a principal água residuária do setor sucroenergético, tanto em termos de composição quanto de geração, sendo que esta apresenta uma considerável variação em termos de composição química (SILVA et al., 2013).

Nos processos convencionais, a obtenção de um litro de álcool está atrelada à cerca de 10 litros desta água residuária (SILVA et al., 2013). Em termos de composição química, a vinhaça apresenta alterações relacionadas à variedade de cana-de-açúcar, época de cultivo, fermento adicionado, proporção da mistura mosto/caldo e variações físicas durante a fermentação (SILVA et al., 2007).

Sua composição geral, no entanto, se caracteriza por elevados teores de matéria orgânica e sais alcalinos, caracterizada por altos índices de DQO (Demanda Química de Oxigênio). Em conjunto com a alta corrosividade e baixo pH, essa água residuária é um potencial poluidor ambiental (SILVA et al., 2007). Entretanto, tais características também fazem da vinhaça um excelente material de reaproveitamento, seja de forma direta com a fertirrigação, ou como meio contendo substratos para processos de biodigestão e produção de biomassa microbiana (DE MATTOS E BASTOS, 2015).

A utilização da biomassa de microalgas e cianobactérias tem atraído setores de nutrição animal e humana, de produção de combustíveis, farmacêutico e de cosmética (SPOLAORE et al., 2006). Elicker et al. (2015) obtiveram quantidades consideráveis de ácidos graxos através do

processamento de biomassa microalgal, incluindo o cultivo misto de *Aphanocapsa sp.* e *Synechococcus sp.*

Além da obtenção de bioprodutos, a aplicação destes micro-organismos em tratamento de águas residuárias vem sendo reportada em diversos trabalhos. Bonini (2012) atestou a eficácia de populações da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* e da microalga *Chlorella vulgaris* na despoluição de vinhaça, com elevado acúmulo de lipídios e proteínas.

O acúmulo de lipídios na biomassa microbial é fundamental para a produção de biodiesel e diversas empresas têm investido nessa tecnologia. A identificação e isolamento de espécies é um dos recursos empregados, pois algumas linhagens têm se adaptado à utilização da vinhaça como substrato nas próprias lagoas de armazenamento (MATTOS, 2014).

Do ponto de vista ambiental, estudos do gênero são valiosos: permitem suplantando impactos nos compartimentos naturais, inclusive ao fornecer produtos que provocariam a exaustão de outros recursos.

Neste contexto, faz-se necessária uma avaliação do impacto da razão C/N no crescimento e composição da biomassa gerada na vinhaça, considerando principalmente a ampla variação de composição química destas águas residuárias (BONINI, 2012).

A velocidade específica de crescimento microbiano está diretamente relacionada à absorção de substratos do meio, enquanto a assimilação está condicionada a proporções adequadas de carbono, nitrogênio e fósforo (XIN et al., 2010; BONINI, 2012). Determinar razões ou faixa adequada de carbono e nitrogênio para uma determinada espécie microbiana pode, portanto, potencializar seu crescimento e atividade metabólica.

Ademais, um dos principais limitantes tecnológicos para a produção de biomassa por microalgas e cianobactérias é a sua separação do meio de cultivo, quer seja pela estrutura celular ou pela baixa concentração máxima obtida, bem inferior quando se compara a fungos e bactérias.

Neste caso, apesar de apresentarem geralmente um crescimento mais intenso, as cianobactérias apresentam uma separação bastante dificultada no meio, sendo praticamente inviável esta operação apenas por centrifugação. Por outro lado, cianobactérias filamentosas tendem a formar agregados, o que facilita a sua separação.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da razão carbono:nitrogênio (C/N) no cultivo heterotrófico de cianobactérias unicelulares e filamentosas em vinhaça de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cianobactérias

Inserido no domínio *Bacteria*, o reino das cianobactérias compreende exemplares diversificados e constantemente lembrados pela importância evolutiva. Acredita-se que elas possuem uma vaga relação com bactérias gram-positivas, e são apontadas como responsáveis pela conversão da atmosfera terrestre nos primórdios de sua formação (MADIGAN et al., 2004).

A característica que as destaca - e diferencia - de outros grupos filogenéticos é a capacidade de realizarem fotossíntese. Por definição, são procariotos que contêm clorofila *a* e ficobilinas, viabilizando a produção de oxigênio (MADIGAN et al., 2004).

Morfologicamente, apresentam uma variabilidade incrível, englobando os seguintes grupos: unicelulares, coloniais, filamentosas, filamentosas com heterocistos, e filamentosas com ramificação. Estes grupos encontram-se extensamente distribuídos no ambiente natural, incluindo locais com condições extremas (MADIGAN et al., 2004).

Ademais, a nutrição baseia-se na assimilação de nitrato e amônio (para obtenção de nitrogênio), sem necessidade de vitaminas. Embora grande parte das espécies seja obrigatoriamente fototrófica, há aquelas que assimilam orgânicos simples através de foto-assimilação. Em alguns representantes, o metabolismo heterotrófico é utilizado (MADIGAN et al., 2004).

No setor tecnológico, essa capacidade de absorver e metabolizar compostos presentes no meio justifica o emprego das cianobactérias em biotratamentos.

2.1.1 Cianobactérias unicelulares

As cianobactérias unicelulares englobam diversos gêneros comumente estudados, preferencialmente na despoluição de resíduos, justificada pelo metabolismo adaptável, alta velocidade de crescimento e resistência a determinados componentes tóxicos.

Nesse contexto, Dellamatrice (2005) aplicou *Synechococcus sp* na biodegradação de resíduo têxtil, com evidente redução de toxicidade. A espécie *Synechococcus nidulans*, conhecida pela produção de biocompostos, foi utilizada por Gonçalves et al. (2014) na obtenção de poli-hidroxicarbonos, biopolímeros atóxicos e biodegradáveis – mas com propriedades semelhantes aos polímeros petroquímicos.

Moore e colaboradores (2002) apontaram o crescimento de cianobactérias do gênero em meios com disponibilidade de amônia, uréia, aminoácidos, nitratos e óxidos de nitrogênio; todos os compostos foram assimilados e degradados por *Synechococcus*.

Gêneros como *Aphanocapsa sp.* e *Aphanothece sp.* também têm sido empregados como agentes de despoluição em diversas pesquisas; a capacidade de gerar altas doses de proteínas, lipídeos, enzimas e outros bioprodutos de interesse comercial a partir de determinados substratos reforça os benefícios da utilização de cianobactérias. Hornes et al. (2010) citam o acúmulo de nitrogênio na biomassa durante a fase logarítmica (crescimento), posteriormente utilizado na síntese de proteínas.

O cultivo em água de parboilização permite a bioconversão da matéria orgânica e nitrogênio em frações lipídicas e protéicas. A biomassa poderia,

posteriormente, ser empregada como complemento nutricional (GOLDBECK et al., 2006; JACOB-LOPES et al., 2006).

Através do cultivo em meio heterotrófico, Bastos et al. (2010) obtiveram 83% de remoção de nitrogênio de água de parboilização, sugerindo eficácia de cianobactérias para acúmulo de bioprodutos e despoluição simultânea de resíduos.

Em vinhaça de cana-de-açúcar, Bonini (2012) observou altas taxas de conversão, com crescimento considerável de biomassa e acúmulo de proteínas e lipídeos por espécies de microalgas. Dentre os benefícios da utilização de espécies unicelulares destaca-se o potencial de absorção de compostos, uma vez que as células permanecem dispersas no meio de cultivo.

A espécie unicelular presentemente utilizada foi citada em diversos trabalhos, em parte por sua ocorrência natural em águas residuárias e ambientes externos no qual há contato com resíduos de potencial nutritivo.

O *Atlas de Cianobactérias e Microalgas de Águas Continentais Brasileiras* (SANTANA, 2012) descreve a espécie como formadora de colônias arredondadas no início do crescimento, que posteriormente adquirem formato alongado e irregular.

As células formam agregados densos com mucilagem hialina, sendo elas próprias esféricas e com cerca de 1 a 1,5 μm de diâmetro (Figuras 2.1 e 2.2). *Aphanocapsa holsatica* pertence à Família *Merismopediaceae*, Ordem *Chroococcales*.

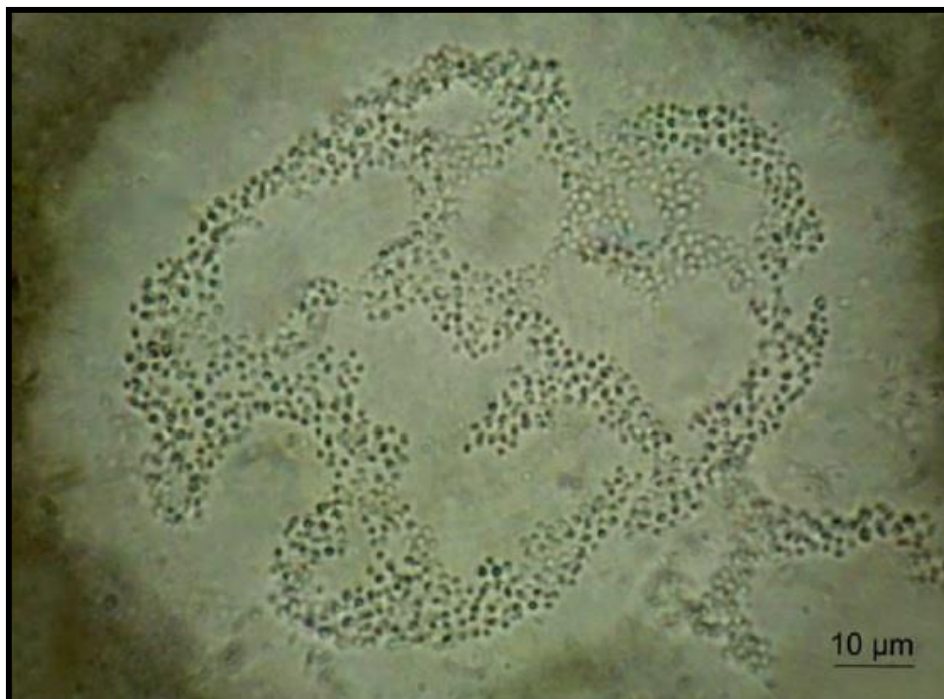


Figura 2.1: *Aphanocapsa holsatica*, em colônia envolta por mucilagem.
Fonte: Atlas de Cianobactérias e Microalgas de Águas Continentais Brasileiras (2012)

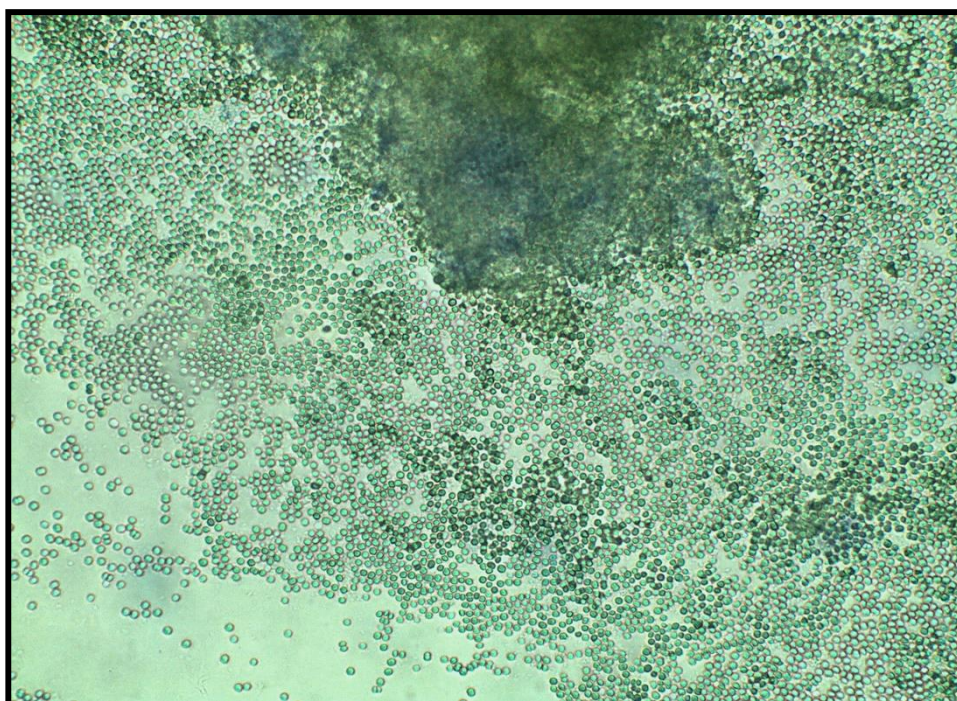


Figura 2.2: *Aphanocapsa holsatica* submetida à coloração com Azul de Metileno, observada em microscópio MOTIC BA 210TL.

Fonte: Acervo da autora. Fotografada em 05 de Agosto de 2015 (LABMAC/CCA).

2.1.2 Cianobactérias filamentosas

Cianobactérias filamentosas são tão variadas em gênero e metabolismo quanto as unicelulares. Entretanto, apresentam a tendência de estabelecerem-se sobre substratos fixos (bentônicas) (CRISPINO e SANT'ANNA, 2006).

Os trabalhos de Crispino e Sant'Anna (2006) identificaram inúmeras espécies deste grupo no litoral brasileiro, incluindo *Blennothrix glutinosa*, *Blennothrix lyngbyacea*, *Lyngbya aestuarii*, *Lyngbya confervoides*, *Lyngbya semiplena*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Phormidium cf. corium*, *Spirulina labyrinthiformis*, *Trichocoleus tenerrimus*, *Microchaete aeruginea*, *Scytonema siculum*, *Calothrix crustácea* entre outras.

Bernal et al. (2008) investigaram a presença de cianobactérias filamentosas em áreas de despejo de águas da indústria láctea, tal qual as do gênero *Geitlerinema* (Figura 2.3). O crescimento desses organismos no resíduo sugerem seu uso na estabilização e remoção de poluentes.

As espécies desse gênero, inclusive, são amplamente estudadas pela adaptação a diferentes ambientes, o que a predispõe ao tratamento de xenobióticos. São comumente encontradas em locais alcalinos, como fontes termais, campos de arroz, solo úmido, água doce sulfurosa, águas salobras e salinas (ANAGNOSTIDIS, 1989).

Atualmente, algumas espécies têm sido estudadas no tratamento de águas residuárias, embora a produção de toxinas por diversas linhagens limitem-nas a indicadores de qualidade em águas.



Figura 2.3: *Geitlerinema sp.*, observada em microscópio MOTIC BA 210TL.

Fonte: Acervo da autora. Fotografada em 19 de Outubro de 2015 (LABMAC/CCA).

2.2 Aplicação biotecnológica de cianobactérias

Em casos de aplicação tecnológica, as cianobactérias podem ser designadas como *microalgas*, termo que não possui efeito taxonômico e abrange tanto algas clorofíceas (eucarióticas) quanto cianobactérias (procarióticas) (QUEIROZ et al., 2007)

Sua aplicação é ampla, contando com a vantagem de utilizarem águas residuárias como substrato de crescimento, convertendo componentes orgânicos e inorgânicos em metabólitos e incorporando-os à biomassa. Essa pode ser posteriormente destinada à adubação de solos, extração protéica ou síntese de biocombustíveis (BASTOS et al. 2004; QUEIROZ et al., 2007; QUEIROZ et al., 2011).

Além disso, estes micro-organismos também despertam a atenção devido ao seu potencial de tratamento de águas residuárias, uma vez que possuem habilidade de remover matéria orgânica e nutrientes dos efluentes, incorporando-os à biomassa, permitindo a valoração dos resíduos e obtenção de uma biomassa passível de ser utilizada (TAM e WONG, 2000; VASCONCELOS e PEREIRA, 2001; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007).

Apesar de apresentarem a fotossíntese como modelo metabólico preferencial, muitas linhagens usufruem do metabolismo heterotrófico no escuro, consumindo moléculas orgânicas solúveis tais como açúcares, ácidos orgânicos e acetato, conforme esquematizado na Figura 2.4 (FAY, 1992; DUMAS et al., 1998; QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006).

Estas propriedades sugerem possíveis aplicações destes micro-organismos na remoção de matéria orgânica e nitrogênio de águas residuárias agroindustriais, (QUEIROZ et al., 2007; MANETTI, 2008; DE MATTOS e BASTOS, 2015).

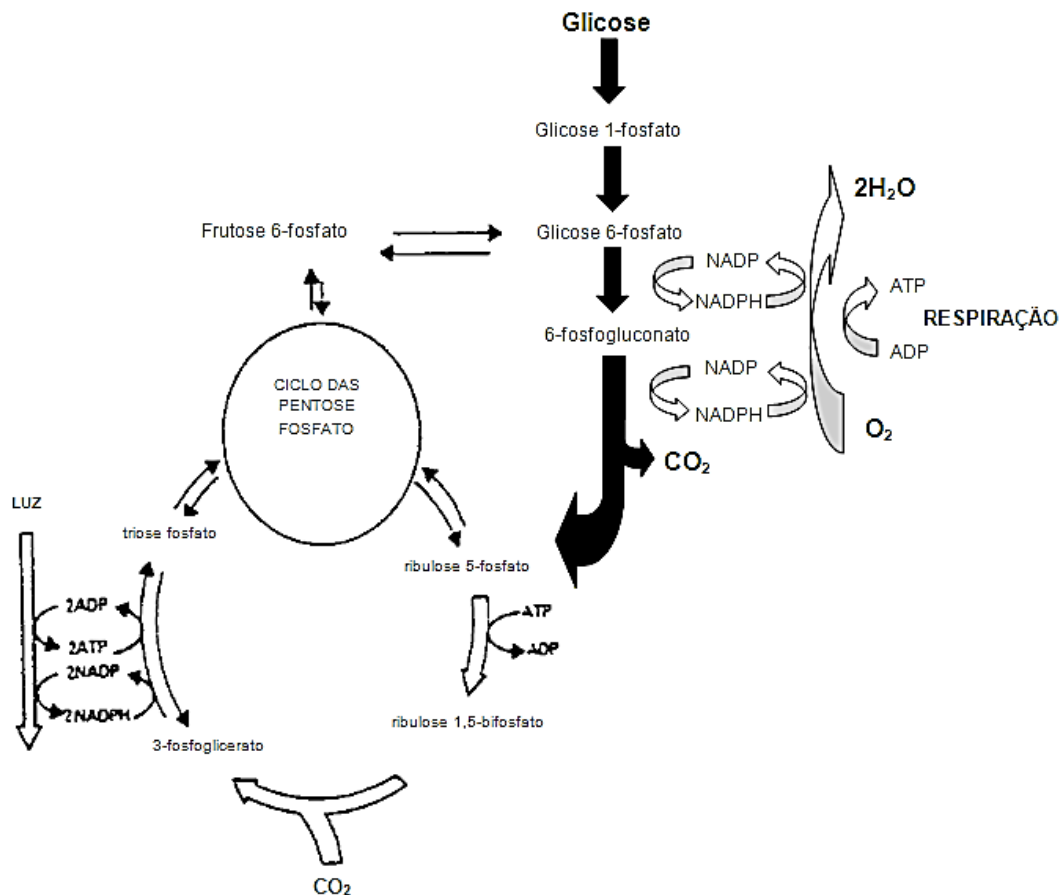


Figura 2.4: Metabolismo de carbono em cianobactérias para períodos de escuro (reações indicadas pelas setas escuras) e claro

Fonte: Adaptado de Fay, 1983.

Apesar deste potencial no tratamento de águas residuárias, são raros os trabalhos na literatura que avaliam a oxidação de moléculas orgânicas solúveis e consumo de oxigênio por estes micro-organismos em efluentes (OREN e SHILO, 1979; BASTOS e QUEIROZ, 2008; BASTOS et al., 2010; BASTOS et al., 2011).

A transferência de oxigênio para as células é um dos fenômenos mais importantes para manutenção do metabolismo aeróbio e o coeficiente global de transferência de massa gás-líquido (K_La) é a variável mais importante a ser

considerada nestes processos (MONTES et al., 1999; GALACTION et al., 2004).

Mesmo sendo uma ferramenta fundamental no estudo do escalonamento de processos aeróbios, a estimativa do K_La em cultivos com microalgas é objeto de raros estudos (GANTZER et al., 1988; BASTOS et al., 2011).

A literatura indica baixas taxas de consumo de oxigênio para microalgas em cultivo heterotrófico e este fenômeno pode estar ligado à via oxidativa usada por estes micro-organismos (BASTOS et al., 2008; BASTOS et al., 2010).

Com relação aos nutrientes, a maioria das microalgas utiliza várias formas de nitrogênio para o seu crescimento e, entre estas, a amônia é mais prontamente incorporadas pelas células (FLORES et al., 1994).

A posição central do metabolismo do nitrogênio via assimilação de amônia é dado pelo ciclo da glutamina sintetase e glutamato sintetase. O glutamato é produzido nesta via não apenas pelos doadores maiores de nitrogênio para a biossíntese de compostos nitrogenados, mas por precursores de alguns aminoácidos, levando à porfirina, ficobilinas e à síntese de clorofila (FAY, 1983).

2.3 Cianobactérias no tratamento de águas residuárias

O setor agroindustrial destaca-se pelo impacto nos compartimentos ambientais, atribuídos ao volume de resíduos e a variabilidade de composição físico-química dos mesmos. As chamadas águas residuárias, tal qual a

vinhaça, são empregadas como meio de cultivo na tentativa de reduzir esses impactos (SAFONOVA et al., 2004).

Os processos biológicos de degradação têm demonstrado eficácia e viabilidade financeira, apesar das dificuldades iniciais no escalonamento dos mesmos. Devido à resistência à toxicidade, é comum o uso de cianobactérias na biodegradação e biorremediação de xenobióticos (SAFONOVA et al., 2004).

O metabolismo heterotrófico de cianobactérias não é limitado pela turbidez característica da maioria das águas residuárias. Esse princípio permitiu o cultivo de *Aphanothece microcopica Nägelli* em esgoto doméstico por BASTOS et al. (2014), com remoção de DQO em até 53%, além da assimilação de 67% de nitrogênio e 92% do fósforo.

Estudos como o de Abdel-Raouf e Ibraheem (2001) atestaram a tolerância de *Aphanocapsa elachista* a proporções variadas de cobre e níquel; a cepa utilizada foi isolada de águas insalubres, contendo esgoto doméstico e resíduos agrícolas.

As cianobactérias também atuam como indicadores de qualidade da água em mananciais e afins, visto que grande parte das espécies comumente encontradas em ambientes degradados produzem toxinas nocivas ao ser humano. Aquino et al. (2010) registraram a presença de espécies do gênero *Planktothrix* em lagoas de estabilização no Nordeste do Brasil, algumas com potencial tóxico.

2.4 Vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça, também denominada vinhoto, consiste no resíduo da destilação do vinho, visando a obtenção de álcool combustível. Com alta DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e níveis acentuados de potássio, é composta também de variados elementos absorvidos durante o crescimento da cana-de-açúcar (MATTOS et al., 2015). O vinho é o produto da fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar, do melaço ou da mistura de caldo e melaço. Nos atuais métodos utilizados para produção de álcool, para cada litro de etanol produzido são gerados aproximadamente 10 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido, constituindo-se de fato a água residuária mais expressiva do ponto de vista tanto quantitativo como qualitativo do setor sucroenergético. Seu poder poluente, cerca de cem vezes maior que esgoto doméstico, é decorrente da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, corrosividade, elevadas DBO e DQO, além de cor escura e odor característico (FREIRE et al., 2000; BONINI, 2012). Nesse sentido, a composição química do resíduo levou a estudos de sua aplicação como fertilizante na própria cultura canieira, tanto por redução de custos quanto pela dificuldade de tratamento e destinação.

Trabalhos recentes, no entanto, recomendam cautela nesse procedimento, devido aos fenômenos de transporte típicos dos solos, possibilidade de salinização e lixiviação de compostos (MUTTON et al., 2010).

Ademais, as quantidades geradas e o lançamento do Decreto nº303 de 28 de fevereiro de 1967, que proibiu o despejo direto em mananciais, forçaram a busca por alternativas de reaproveitamento (MUTTON et al., 2010).

Embora a vinhaça apresente uma composição química média conhecida, os teores de cada componente podem ser determinados apenas com análises individuais em cada amostra de produto (MATTOS et al., 2015).

Fatores como a variedade de cana, solo, safra, moagem, variações do processo fermentativo, emprego do mosto de melaço ou misto, entre outros, influem nas características físicas e químicas do resíduo. A Tabela 2.1 apresenta a composição média da vinhaça obtida pela fermentação de diferentes tipos de meios.

Tabela 2.1: Composição química da vinhaça

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

Fonte: adaptada de Aragão (2012).

Ademais, esses fatores - potencial poluente, quantidade gerada e interesses econômicos - têm estimulado o emprego da vinhaça em processos de biodigestão anaeróbia, cultivo de fungos, bactérias e mesmo algas e cianobactérias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da razão Carbono/Nitrogênio (C/N) no cultivo heterotrófico de cianobactérias unicelulares e filamentosas em vinhaça de cana-de-açúcar.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de razões C/N ajustadas acima e abaixo do valor original da vinhaça no crescimento de cianobactérias unicelulares e filamentosas;
- Estudar a cinética de crescimento e consumo de substratos a partir de ensaios em sistemas de agitação nas diferentes razões C/N;
- Avaliar o cultivo das cianobactérias na razão C/N selecionada em biorreator de bancada;
- Determinar a remoção de carbono e nitrogênio da vinhaça pelas cianobactérias nas diferentes condições experimentais;
- Avaliar a composição de biomassa nas diferentes condições experimentais em termos de lipídios e proteínas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo e manutenção dos inóculos

As cepas de cianobactérias unicelular (*Aphanocapsa holsatica*) e filamentosa (*Geitlerinema sp*) foram gentilmente cedidas pelo Instituto Botânico de São Paulo, sendo mantidas e propagadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC) do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar em meio BG11 (RIPKA et al., 1979). As soluções empregadas e suas respectivas concentrações estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição do meio BG11

Componente	Solução estoque	Quantidade para 1 L
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	2,0 g.100mL ⁻¹	1 mL
NaNO ₃	15 g.100mL ⁻¹	10 mL
NaCl	7,2 g.100mL ⁻¹	1 mL
<u>Elementos Traço</u>		1 mL
H ₃ BO ₃	286,0 mg.100mL ⁻¹	
MnCl ₂ . 4H ₂ O	181,0 mg.100mL ⁻¹	
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	22,0 mg.100mL ⁻¹	
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	39,0 mg.100mL ⁻¹	
CuSO ₄ . 5H ₂ O	7,9 mg.100mL ⁻¹	
CoCl ₂ . 6H ₂ O	4,0 mg.100mL ⁻¹	

Fonte: RIPKA et al. 1979

Conforme pode ser observado nas Figuras 4.1 e 4.2, os inóculos foram mantidos sobre aeração constante em estantes de cultivo a temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de aproximadamente $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O volume dos cultivos foi sendo sucessivamente expandido através da adição de meio nutriente, permitindo o crescimento de biomassa celular.

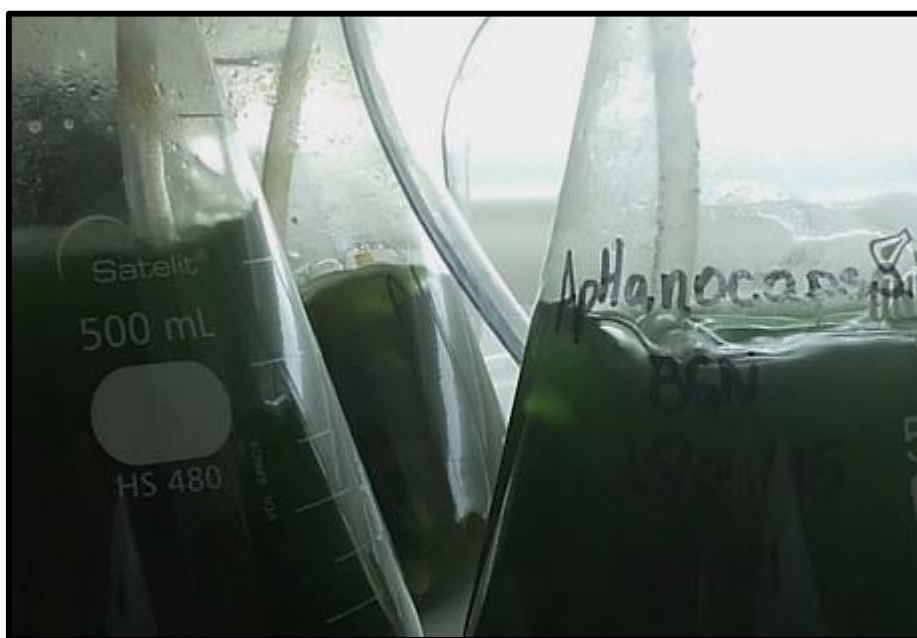


Figura 4.1: Inóculos de *Aphanocapsa holsatica* em meio BG11
Fonte: acervo da autora. Fotografado em julho de 2015; Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle – CCA/UFSCar.



Figura 4.2: Inóculos de *Geitlerinema sp.* em meio BG11, sob aeração em estante de cultivo

Fonte: acervo da autora. Fotografado em Setembro de 2015; Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle – CCA/UFSCar.

Para emprego nos cultivos em vinhaça, os inóculos foram concentrados através de centrifugação a 3500 rpm/15°C durante 20 minutos.

A massa celular seca foi determinada por gravimetria, com filtragem e posterior secagem em estufa de membranas de 0,22 μm de diâmetro de poro (APHA, 2005), de forma a iniciar os ensaios com concentração celular na ordem de 300 mg L⁻¹.

4.2 Preparo da vinhaça

As amostras de vinhaça foram obtidas diretamente da saída do sistema de destilação alcoólica de uma Usina de Açúcar e Álcool da região de Araras/SP, sendo que os frascos foram, posteriormente, acondicionados em congelador no LABMAC/CCA/UFSCar.

Com relação à caracterização físico-química das amostras, a quantidade de carbono e nitrogênio total na vinhaça bruta foram determinados em Analisador de Carbono e Nitrogênio SHIMADZU® TOC-LCPN. As concentrações estão descritas na Tabela 4.2.

O pH foi determinado por potenciometria e os sólidos totais por métodos gravimétricos, filtrando-se um volume conhecido em filtro 0,45 µm (APHA,2005).

Tabela 4.2: Características das amostras de vinhaça empregadas

Parâmetro	Varição
pH	3,7 – 4,3
TOC	7399 mg.L ⁻¹
TN	429,7 mg.L ⁻¹

Como a razão carbono:nitrogênio (C/N) da vinhaça bruta coletada ficou em torno de 20, estabeleceu-se para os ensaios dois níveis de razões C/N acima e abaixo do valor original.

Assim, foram ajustadas para 5 e 10 com a adição de nitrato de sódio e 30 e 40 com a adição de glicose.

Para cada experimento, uma porção do mesmo lote de vinhaça foi descongelada em refrigerador, tendo o pH corrigido para 7,5 e sua razão C/N ajustada. Em seguida, o volume necessário foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.3 Ensaios em frascos sob agitação

Inicialmente foi realizada uma seleção da melhor razão C/N para o crescimento em vinhaça para ambas cianobactérias.

Assim, cultivos heterotróficos foram conduzidos em frascos de 125 mL com 25 mL de vinhaça, a 25°C e inóculo de 300 mg L⁻¹ em agitador orbital TE-420TECNAL[®] a 100 rpm, considerando os valores iniciais e após 24 horas.

Definida a razão C/N ideal, ensaios foram conduzidos com amostragem periódica para determinação dos perfis de crescimento e consumo de substratos, o que ocorreu também para a condição controle (vinhaça bruta sem ajuste da razão C/N) e para a condição de pior crescimento.

As amostras obtidas em todos os intervalos foram avaliadas com relação a contagem celular em microscópio MOTIC[®] BA 210TL com auxílio de uma Câmara de Neubauer, massa celular seca por filtração de um volume conhecido em filtro 0,22 µm (APHA, 2005), carbono e nitrogênio total no meio em analisador TOC - LCPN SHIMADZU[®]. No caso da cianobactéria filamentosa, a contagem celular foi impossibilitada devido à sua morfologia.

Os cultivos com quantidades significativas de lipídeos passaram por extração através do método de Bligh e Dyer (1959), conforme esquematizado na Figura 4.3.

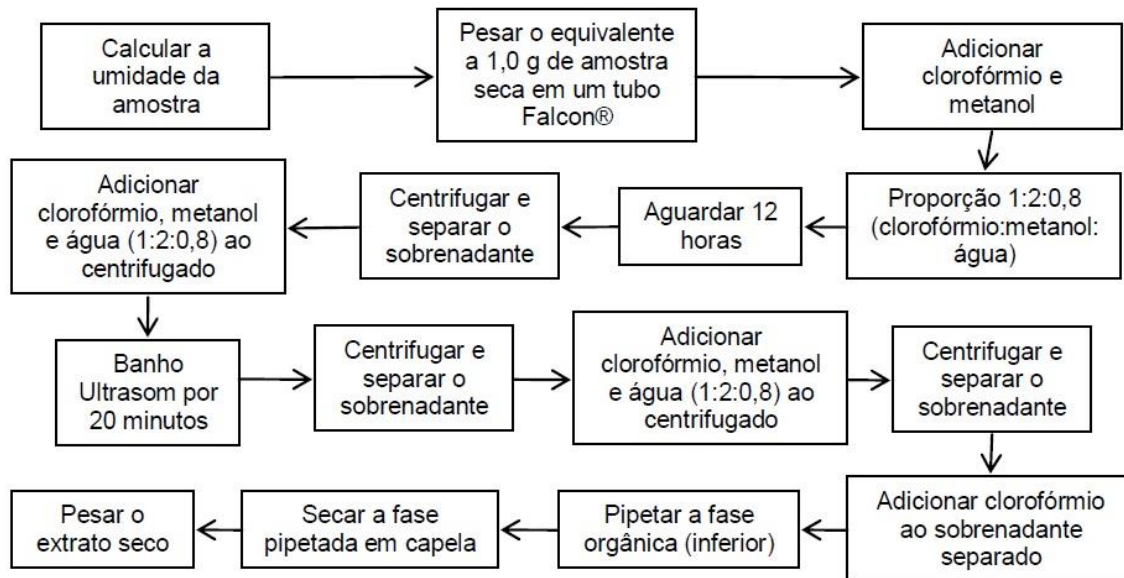


Figura 4.3: Diagrama esquemático da determinação de lipídios totais na biomassa através do método Bligh e Dyer (1959)

Fonte: MATTOS, 2014.

4.4 Parâmetros cinéticos de avaliação dos ensaios

Com relação aos parâmetros cinético, as velocidades específicas de crescimento foram determinadas através da derivação da Equação 4.1, sendo que o valor máximo ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtido pela inclinação da reta formada na fase exponencial das curvas semi-logarítmicas (DORAN, 1995).

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde:

μ : velocidade específica de crescimento

X: concentração de biomassa

t: tempo de cultivo

Calculada $\mu_{m\acute{a}x}$, o tempo de geração (t_g) pode ser obtido por:

$$t_g = \frac{0,693}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Equação 4.2})$$

Para o cálculo de rendimento de substrato em micro-organismos ($Y_{x/s}$) foi utilizada a relação entre crescimento celular e consumo de TOC e TN como substratos, de acordo com Equação 4.3.

$$Y_{X/S} = - \frac{dX}{dS} \quad (\text{Equação 4.3})$$

Onde:

$Y_{x/s}$: rendimento de substrato em biomassa

S: concentração de substrato (TOC ou TN)

A produtividade de biomassa (P_X) foi calculada utilizando a variação do crescimento celular no tempo, de acordo com Equação 4.4:

$$P_X = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{t} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde:

P_X : produtividade em biomassa

$X_{m\acute{a}x}$: concentração de biomassa máxima

X_0 : concentração de biomassa inicial

t: tempo

Na avaliação da demanda de oxigênio em biorreator de bancada, a taxa de consumo de oxigênio (Q_o) foi avaliado pela Equação 4.5 (DORAN, 1995), enquanto o coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (k_{La}) foi obtido pelo método dinâmico, considerando reoxigenação do meio e concentração de oxigênio no regime permanente (C_{AL}), conforme Equação 4.6. Cabe ressaltar que a solubilidade de oxigênio no meio líquido foi ajustada considerando a composição da vinhaça em termos de sais e matéria orgânica.

$$Q_o = \frac{dC_{AL}}{dt} \quad (\text{Equação 4.5})$$

$$k_{La} = \frac{\ln \frac{(C_{AL} - C_{A1})}{(C_{AL} - C_{A2})}}{(t_2 - t_1)} \quad (\text{Equação 4.6})$$

Onde:

Q_o : taxa de consumo de oxigênio

C_{AL} : concentração de oxigênio no meio líquido

k_{La} : coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido

C_{A1} : concentração de oxigênio no tempo t_1

C_{A2} : concentração de oxigênio no tempo t_2

O experimento descrito nesta seção foi esquematizado na Figura 4.4:

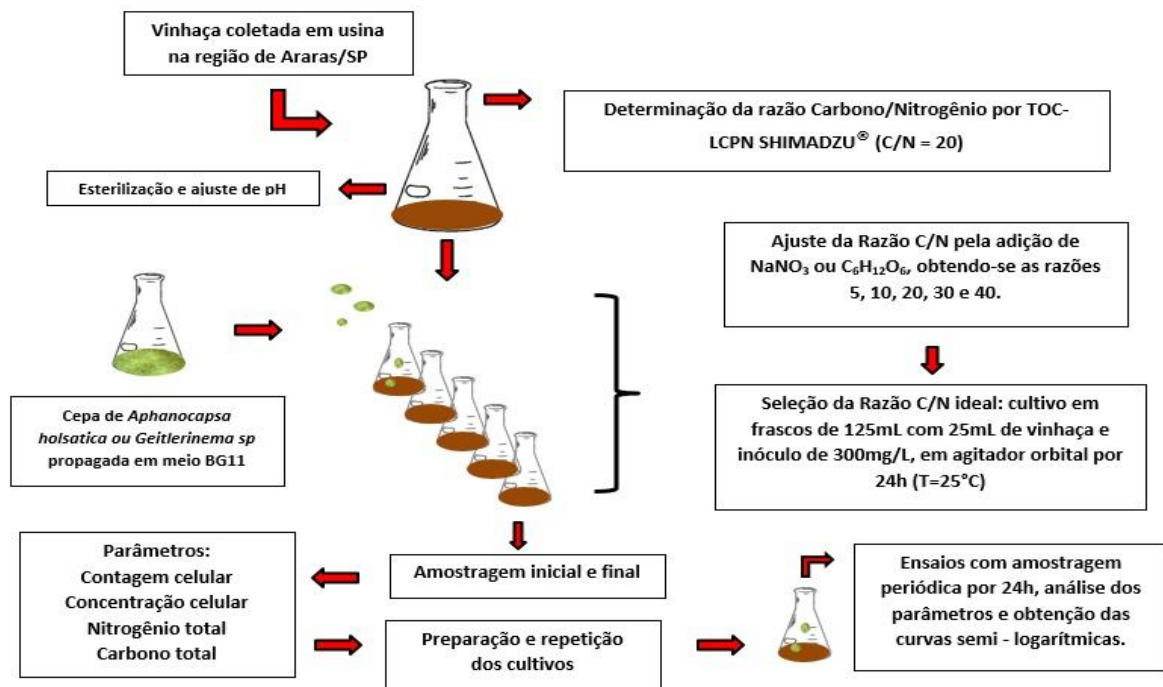


Figura 4.4: Esquema do procedimento experimental para o cultivo das cianobactérias em frascos sob agitação

Fonte: acervo da autora.

4.5 Ensaio em Biorreator de bancada

Após os ensaios em frascos sob agitação, foi realizado cultivo em biorreator de bancada para a melhor condição em termos de razão C/N.

Assim, um volume de 2 litros da vinhaça com pH e razão C/N ajustados foi adicionado ao vaso de vidro borossilicato do Reator de Bancada A&Z® (Figura 4.4), havendo monitoramento em linha dos níveis de oxigênio (O_2), dióxido de carbono (CO_2) e pH.

A razão C/N selecionada foi 5 por ter apresentado a maior produtividade em termos de biomassa. As condições de cultivo foram inóculo de 300 mg L^{-1} .

holsatica, a 25°C, aeração de 1 VVM (volume de ar por volume de líquido por minuto) e agitação de 200 rpm.

A amostragem foi realizada a cada 3 horas, por um período de 24 horas; com avaliação da contagem celular, carbono orgânico total, nitrogênio total e a massa celular seca, conforme especificado no item 4.3.

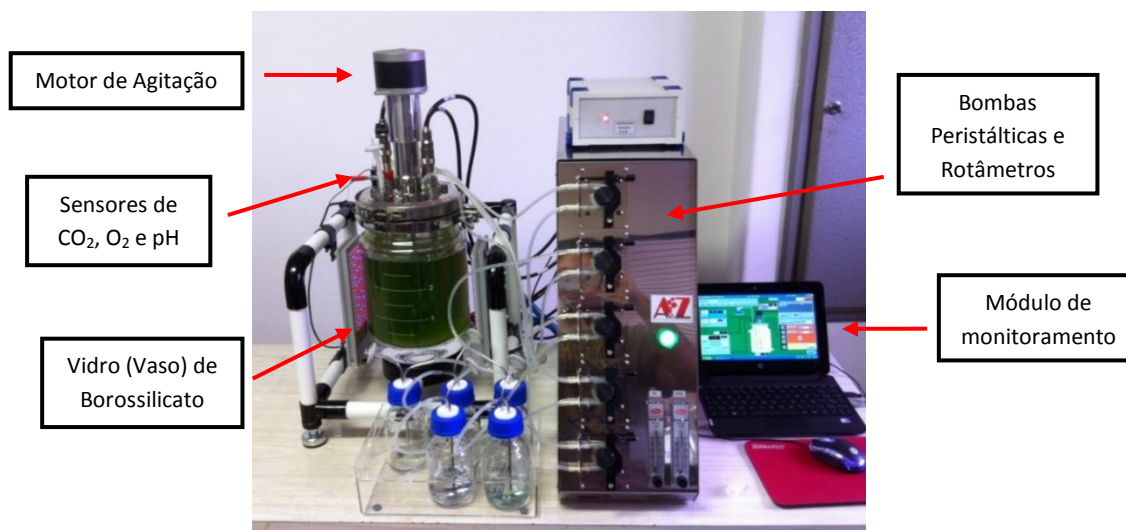


Figura 4.5: Esquema do biorreator de bancada utilizado nos experimentos

Fonte: Acervo do grupo de pesquisa. Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle – CCA/UFSCar

O mesmo ensaio foi conduzido posteriormente com a cianobactéria filamentosa *Geitlerinema sp.* O volume de 2 litros de vinhaça foi esterilizado e, após ajuste da razão C/N, adicionado ao vidro de borossilicato junto ao inóculo em concentração de 300 mg L⁻¹, a 25°C, aeração de 1 VVM e agitação de 250 rpm.

Houve monitoramento da porcentagem de oxigênio, temperatura e pH do meio. Foram mensurados a massa seca total, carbono orgânico e nitrogênio totais, através dos métodos anteriormente citados, em amostras coletadas a cada 1 hora e 30 minutos, durante 24 horas. A contagem celular foi excluída

devido à morfologia da cianobactéria em questão – da mesma forma, a tendência à aderência nas paredes do frasco exigiu um aumento da agitação do meio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção da razão C/N da vinhaça no cultivo de *Aphanocapsa holsatica* em sistema de frascos agitados

A Figura 5.1 apresenta os resultados de produtividade em termos de biomassa nas 24 horas de cultivo de *Aphanocapsa sp.* em diferentes razões carbono:nitrogênio da vinhaça. O maior crescimento e, conseqüentemente, maior produtividade no período ocorrem para condição de maior disponibilidade de nitrogênio, ou seja, menor razão C/N (5), sugerindo que este seria o substrato limitante para o cultivo desta cianobactéria em vinhaça.

De fato, de acordo com Freire et al. (2000), a vinhaça é rica em matéria orgânica, seguido de potássio e posteriormente de nitrogênio. Dada a importância deste nutriente no cultivo de cianobactérias, na razão C/N 5 a variação de biomassa ficou em torno de 1600 mg L⁻¹, enquanto que foi praticamente a metade (837 mg L⁻¹) na razão C/N 20, condição original da água residuária.

Por outro lado, em razões C/N superiores a este valor, houve um discreto aumento da produtividade, o que também indica a influência da disponibilidade de carbono, fundamental no cultivo heterotrófico de cianobactérias.

Sabe-se que em condições de C/N reduzidas há uma tendência ao acúmulo de proteínas devido à maior disponibilidade de nitrogênio, enquanto em C/N elevadas ocorre geralmente um desvio no sentido do acúmulo de

carboidratos e lipídios. Entretanto, esta situação de elevada disponibilidade de carbono também aumenta o risco de contaminação por bactérias. Nesse sentido, a seleção da razão C/N mais adequada nos cultivos heterotróficos de microalgas e cianobactérias depende tanto do crescimento como da composição adequada da biomassa de interesse gerada no processo.

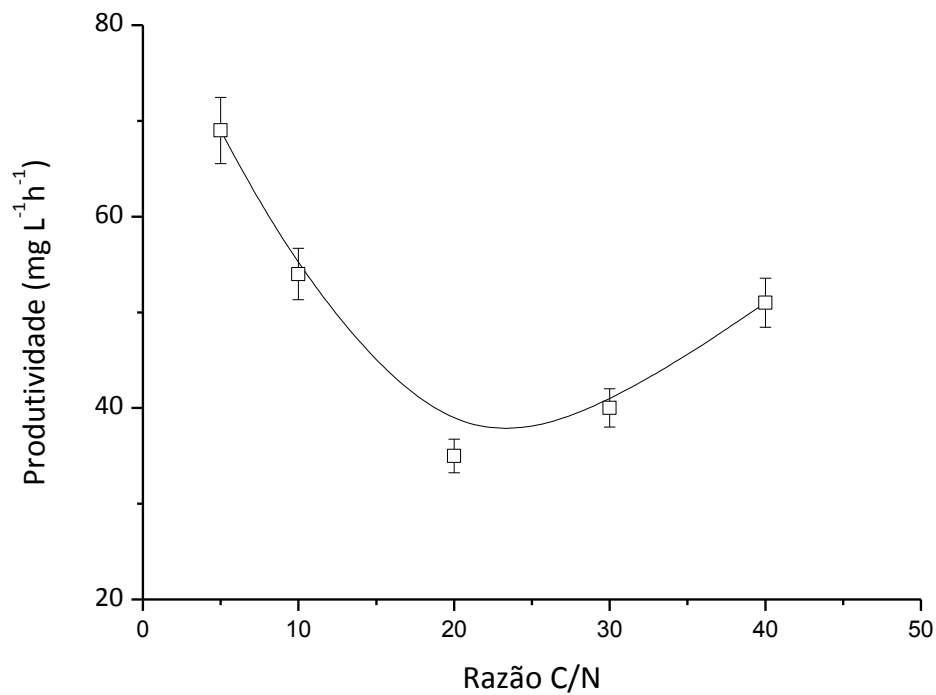


Figura 5.1: Produtividades em biomassa para cultivo de *Aphanocapsa holSATICA* a partir de vinhaça com diferentes razões C/N

Entretanto, o consumo de carbono e nitrogênio não segue esta mesma lógica de crescimento celular, conforme pode ser observado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Variação de carbono e nitrogênio no meio para cultivo (vinhaça) de *Aphanocapsa holsatica* em diferentes razões C/N por 24 horas

Razão C/N	Variação de TOC em 24 horas (mgL⁻¹)	Variação de TN em 24 horas (mgL⁻¹)
5	Acúmulo de 16,2	Acúmulo de 9,3
10	Remoção de 6,8	Acúmulo de 0,5
20	Acúmulo de 8,4	Remoção de 2,2
30	Remoção de 19	Acúmulo de 2,22
40	Acúmulo de 107,4	Remoção de 0,04

Nas diferentes razões houve tanto remoção quanto consumo, considerando as 24 horas de cultivo. Na condição de maior produtividade (C/N 5), houve acúmulo tanto de carbono como de nitrogênio no meio.

Como o método quantifica as moléculas totais, pode-se sugerir que parte desta quantidade de carbono e nitrogênio deve-se a metabólitos celulares liberados no meio de cultivo. Outrossim, como nestes iniciais não tem-se o monitoramento durante o tempo, não é possível verificar se houve uma remoção considerável em algum momento.

Sendo assim, de forma a avaliar os cultivos durante o período de 24 horas, foram conduzidos ensaios na condição de maior produtividade (C/N 5), menor produtividade e na condição controle original da vinhaça. Conforme podemos observar na Figura 5.2, na razão C/N 5 pode-se verificar o desenvolvimento contínuo da cianobactéria após uma discreta fase de adaptação de apenas 3 horas.

A produção de biomassa ocorreu a uma velocidade específica de crescimento máxima de $0,09 \text{ h}^{-1}$, correspondendo a um tempo de geração de 7,7 horas (Tabela 5.2). Cabe ressaltar que estes valores são similares aos obtidos por outras microalgas e cianobactérias em cultivos heterotróficos a partir de águas residuárias (QUEIROZ et al., 2007; LIM et al., 2010; BASTOS et al., 2014).

Comparativamente, enquanto que na razão C/N original da vinhaça (20) houve um crescimento bem inferior ($\mu_{\text{máx}} 0,05 \text{ h}^{-1}$), na condição de maior disponibilidade de carbono (C/N 40), há uma elevada produção de biomassa, embora o crescimento não tenha sido contínuo nas 24 horas.

Avaliando a curva na Figura 5.1, verifica-se que ocorrem duas fases de crescimento expressivas, primeiramente entre 9 e 15 horas e outra após 21 horas. Este fenômeno é conhecido por diauxia, sendo comum a partir de águas residuárias por se tratar de crescimento microbiano na presença de mais de uma fonte de carbono.

Neste caso específico, a glicose adicionada ao meio para ajustar a razão C/N é consumida preferencialmente, enquanto que a matéria orgânica da vinhaça começa a ser utilizada apenas após este período.

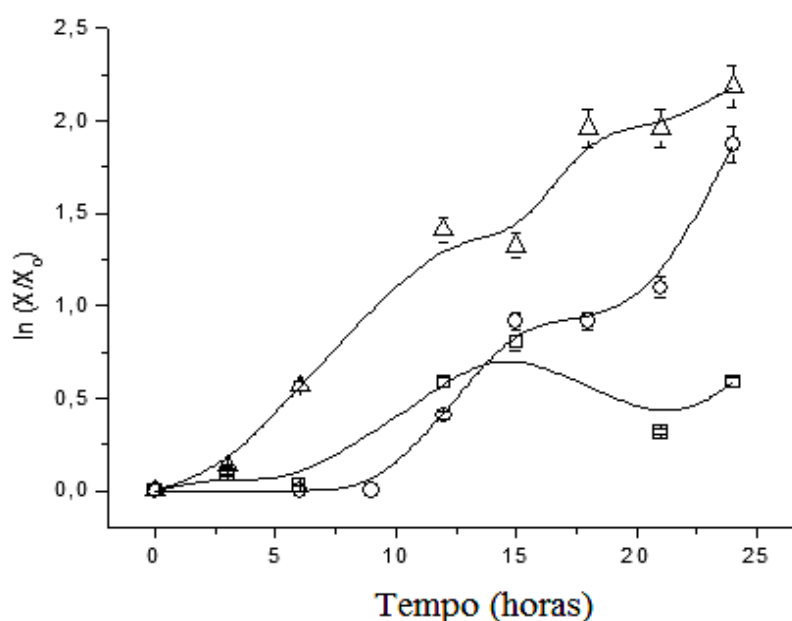


Figura 5.2: Curvas de crescimento para *Aphanocapsa holsatica* em vinhaça nas razões C/N 5 (Δ), 20 (\square) e 40 (\circ)

Tabela 5.2: Velocidades específicas de crescimento, tempos de geração e produtividades para cultivo de *Aphanocapsa holsatica* em frascos sob agitação com vinhaça nas razões C/N 5, 20 e 40

Razão C/N	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	t_g (h)	Produtividade lipídica ($\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Produtividade protéica ($\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$)
5	0,09	7,7	25,75	743,85
20	0,05	13,86	7,22	247,74
40	0,08	8,66	114,62	1209,56

O perfil das razões C/N foi monitorado durante o tempo para essas condições de cultivo conforme descrito na Figura 5.3. De acordo com o comportamento das curvas ficou demonstrado que na condição de razão inicial C/N 40 a relação entre carbono e nitrogênio manteve-se praticamente

constante no período, embora o crescimento microbiano tenha sido semelhante ao da C/N 5.

A tendência de aumento da relação C/N nas demais condições intui a necessidade de maiores concentrações de carbono para o crescimento heterotrófico desta cianobactéria. Além disso, conforme previamente observado por alguns autores, o nitrogênio foi limitante no crescimento para as razões C/N 5 e 20, levando a um aumento durante o experimento.

Por outro lado, o crescimento equilibrado que levou a manutenção da razão C/N por volta de 40 pode ser atribuído ao consumo lento de mais de uma fonte de carbono.

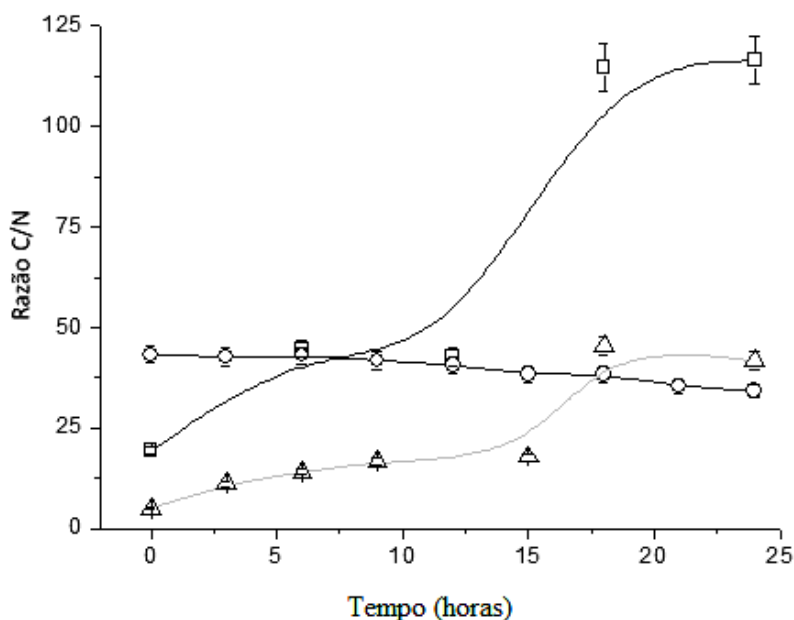


Figura 5.3: Perfis de relação C/N da vinhaça durante o crescimento de *A. holsatica* para os valores 5 (Δ), 20 - inicial (\square) e 40 (o)

De acordo com Morales-Sánchez et al. (2013), cultivos descontínuos com razão C/N equilibrada (constante), permitem o acúmulo de proteínas. De fato, a maior produtividade protéica para *Aphanocapsa* em vinhaça foi obtida na razão C/N 40 que se manteve constante durante o período experimental (Figura 5.3).

Ainda de acordo com esses autores, a relação de carbono e nitrogênio do meio influenciam na composição celular em termos de proteínas, lipídios e carboidratos. Devido ao equilíbrio C/N, as células não crescem em condições de *stress* ou limitadas, não havendo a necessidade do acúmulo de metabólitos de reserva.

Em contrapartida, elevadas razões C/N tendem a direcionar o acúmulo de lipídios para diversas microalgas em cultivos heterotróficos. Mainul et al. (1996) obtiveram uma elevação de 18 a 46% no teor de lipídios de *Cryptococcus curvatus* após o ajuste da razão C/N de 25 para 70.

Esses autores reportam que em razões C/N maiores ocorre uma redução na síntese de compostos nitrogenados tais como proteínas e ácidos nucléicos, as células entram em uma fase de crescimento estacionária e começam a acumular lipídeos de reserva. Isto pode explicar a elevada produtividade lipídica obtida para *Aphanocapsa* em vinhaça com razão C/N 40 (Tabela 5.2).

Entretanto, a produtividade protéica também foi superior nesta condição, o que não concorda com uma esperada síntese reduzida de compostos nitrogenados, mas que pode indicar uma influência maior do crescimento equilibrado, previamente apresentado na Figura 5.3.

De qualquer forma, os valores de produtividade lipídica e protéica são compatíveis e até superiores aos valores reportados na literatura, ficando, na média, em torno de $2,5 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para a maioria das microalgas investigadas (MATA et al., 2010).

As Figuras 5.4e 5.5 apresentam, respectivamente, os perfis de consumo de carbono e nitrogênio do meio pela cianobactéria *Aphanocapsa holsatica* em vinhaça nas diferentes razões C/N.

Tais comportamentos concordam com os resultados apresentados na Figura 5.3, ou seja, um maior consumo de nitrogênio para as razões C/N 5 e 20 elevaram a quantidade de carbono disponível em relação ao nitrogênio, limitando ainda mais este nutriente no meio.

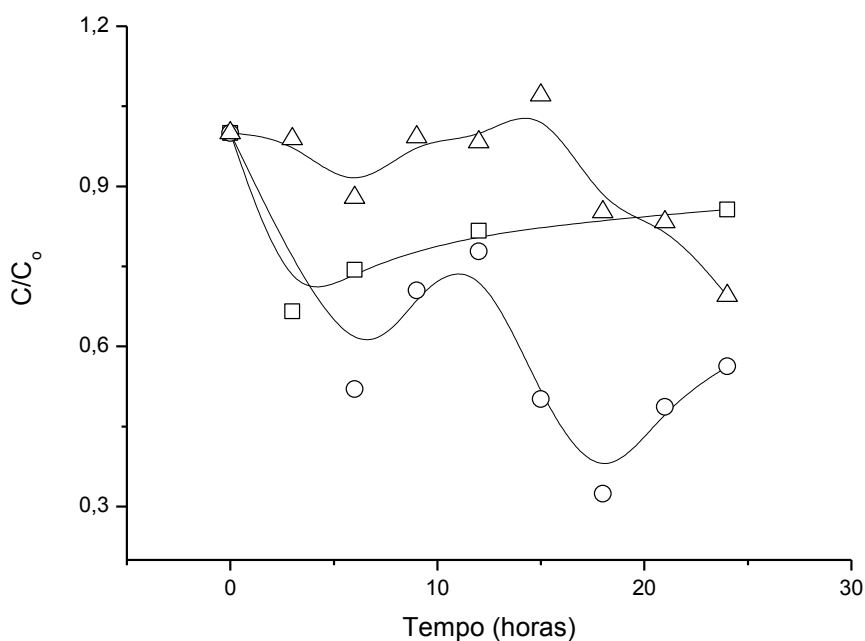


Figura 5.4: Perfis do consumo de carbono orgânico total (TOC) a partir do valor inicial (TOC_0) no cultivo da cianobactéria *Aphanocapsa holsatica* em vinhaça com razões C/N 5 (\square), 20 (\circ) e 40 (Δ)

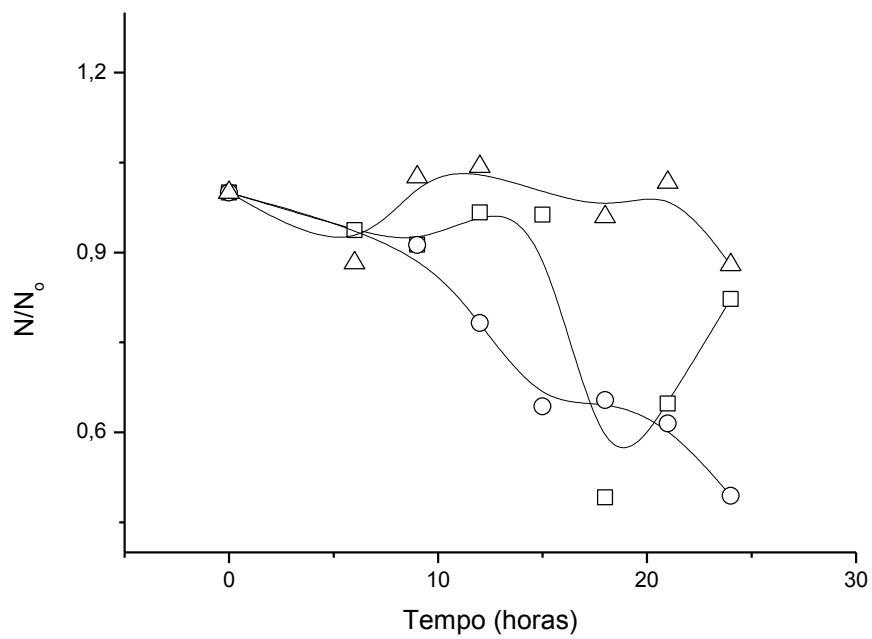


Figura 5.5: Perfis do consumo de nitrogênio (N) a partir do valor inicial (N_0) no cultivo da cianobactéria *Aphanocapsa holsatica* em vinhaça com razões C/N 5 (\square), 20 (o) e 40 (Δ)

5.2 Cultivo de *Aphanocapsa holsatica* em biorreator de bancada com vinhaça ajustada na razão C/N selecionada

Considerando que na razão C/N 5 foi obtida uma velocidade específica de crescimento e produtividade em biomassa maior, com um crescimento contínuo e estável durante as 24 horas amostradas nos frascos agitados, foi conduzido ensaio em biorreator de bancada para melhor controle de aeração e agitação, além do monitoramento e linha de parâmetros de processo.

Nesse sentido, a Figura 5.6 apresenta os perfis de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2) dissolvidos no meio líquido. Verifica-se um consumo intenso de O_2 a partir de aproximadamente 8 horas, embora sem alterar consideravelmente a quantidade de CO_2 no meio, o qual se manteve praticamente constante.

Isto deve-se ao metabolismo heterotrófico das cianobactérias, onde não ocorre a glicólise completa seguida de Ciclo de Krebs e cadeia respiratória como nos organismos eucarióticos. Desta forma, apesar do elevado consumo de oxigênio, este ainda se mantém acima de 20%, não limitando o crescimento.

Além disso, a quantidade de CO_2 produzida é desprezível. Assim, a aplicação de cianobactérias em sistemas de tratamento de águas residuárias envolveria uma demanda de oxigênio menor do que os sistemas convencionais (lodos ativados), com mínima produção de gás carbônico, havendo um balanço equilibrado devido ao consumo de carbono orgânico.

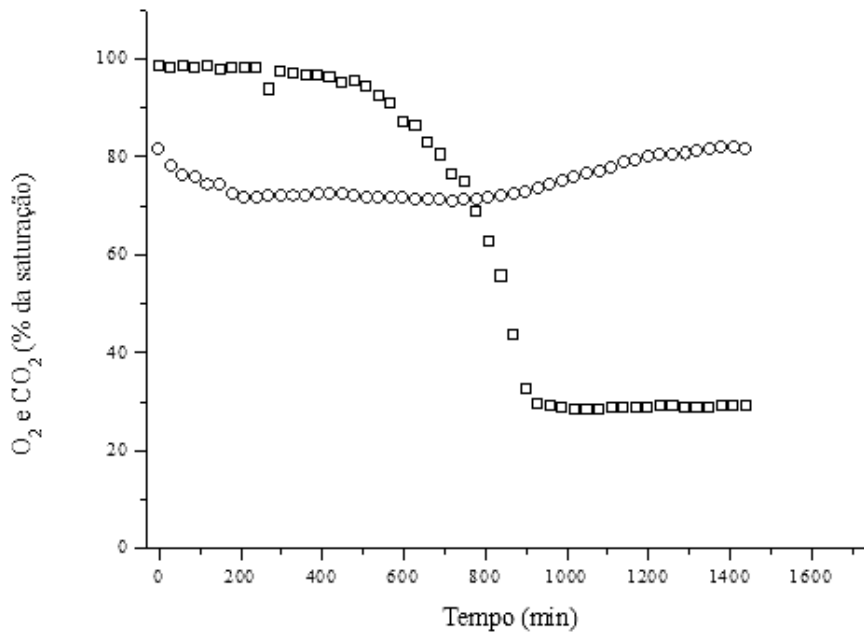


Figura 5.6: Monitoramento de oxigênio (□) e gás carbônico (○) no cultivo de *Aphanocapsa holsatica* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5

Esta demanda de oxigênio pode ser melhor analisada quando verificamos na Figura 5.7 o consumo de oxigênio em condições sem aeração forçada. Na primeira parte da curva, sem aeração forçada, percebe-se o consumo de oxigênio, o qual segue uma reação de ordem zero (sem limitação) a uma taxa de $0,11 \text{ mgL}^{-1}\text{min}^{-1}$, calculada de acordo com a Equação 4.5.

Por outro lado, na segunda parte da curva, após a realimentação, verifica-se que o biorreator apresenta um sistema adequado de aeração, uma vez que o nível de oxigênio dissolvido retorna a patamares originais em poucos mais que 2 minutos.

Com este resultado pode-se estimar o coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (k_{La}) pela Equação 4.6, sendo que o valor fica em torno de $0,0126 \text{ s}^{-1}$. Conclui-se que o biorreator fornece cerca de sessenta vezes mais oxigênio do que a demanda dos micro-organismos, indicando um ótimo sistema de aeração e baixo consumo pelas cianobactérias, mesmo em cultivo heterotrófico com meio rico em matéria orgânica como a vinhaça.

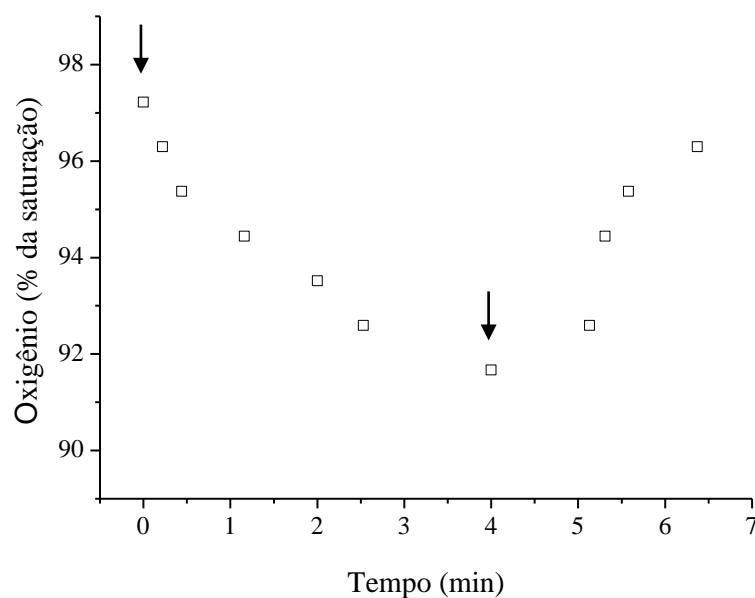


Figura 5.7: Curva de consumo de oxigênio no cultivo de *Aphanocapsa holsttica* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5 (as setas indicam o corte e posterior realimentação da aeração)

De acordo com a Figura 5.8, o pH sofreu uma discreta variação durante o período, principalmente após 15 horas, quando o consumo de oxigênio já não era tão intenso.

Esta alteração no pH do meio pode ser atribuída a liberação de nitrogênio amoniacal, devido à morte celular de parte das cianobactérias a

partir deste período. Isto pode ser comprovado quando se analisa a curva de crescimento apresentada na Figura 5.9, onde percebe-se claramente um intenso crescimento inicial, seguido de um período com discreta variação de biomassa.

Desta forma, conforme destacado na Tabela 5.3, este cultivo apresenta duas velocidades específicas de crescimento máximas, sendo $0,50 \text{ h}^{-1}$ até 3 horas, seguindo de um crescimento mais lento a $0,098 \text{ h}^{-1}$ entre 6 e 22 horas.

Cabe ressaltar que este crescimento tipo diauxia já havia sido encontrado para o cultivo em frascos agitados na condição de maior fornecimento de carbono, ou seja, C/N 40. Desta forma, este comportamento sugere-se que, em biorreator onde as condições de cultivo e o fornecimento de oxigênio é mais adequado, também ocorre diauxia mesmo sem grande disponibilidade de carbono, havendo de fato consumo da matéria orgânica original da vinhaça.

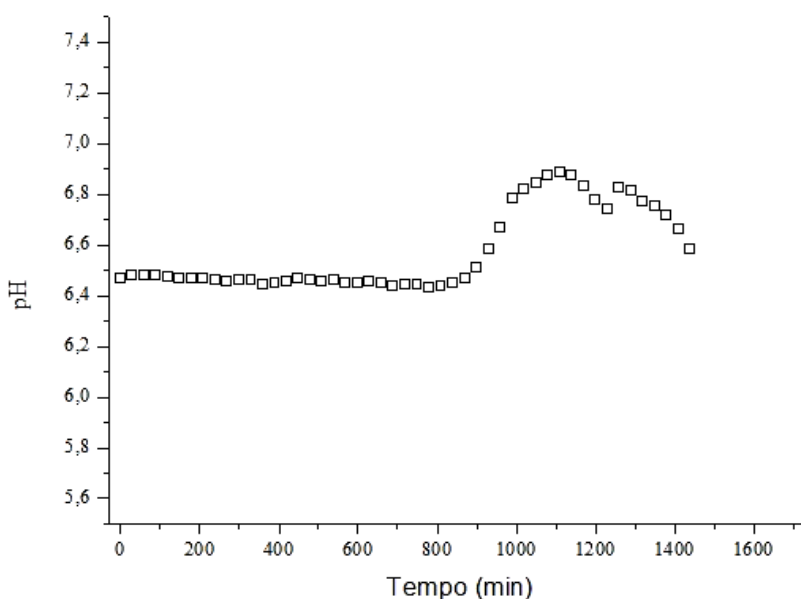


Figura 5.8: Monitoramento do pH do meio no cultivo de *Aphanocapsa holsatica* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5

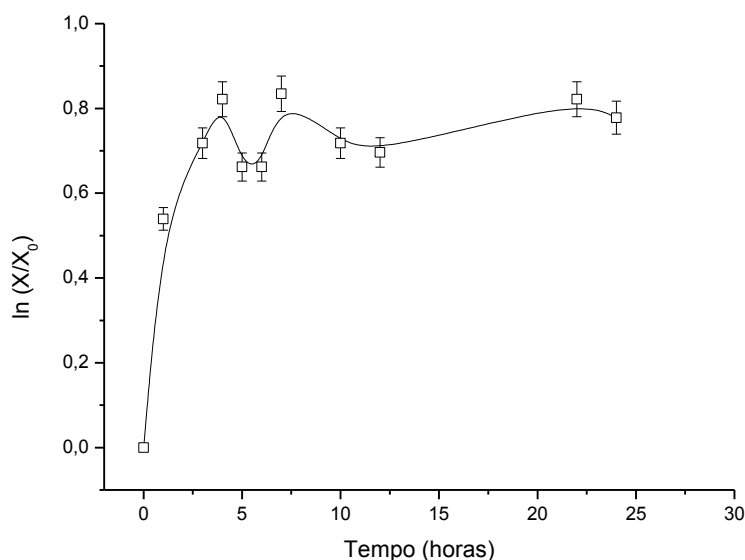


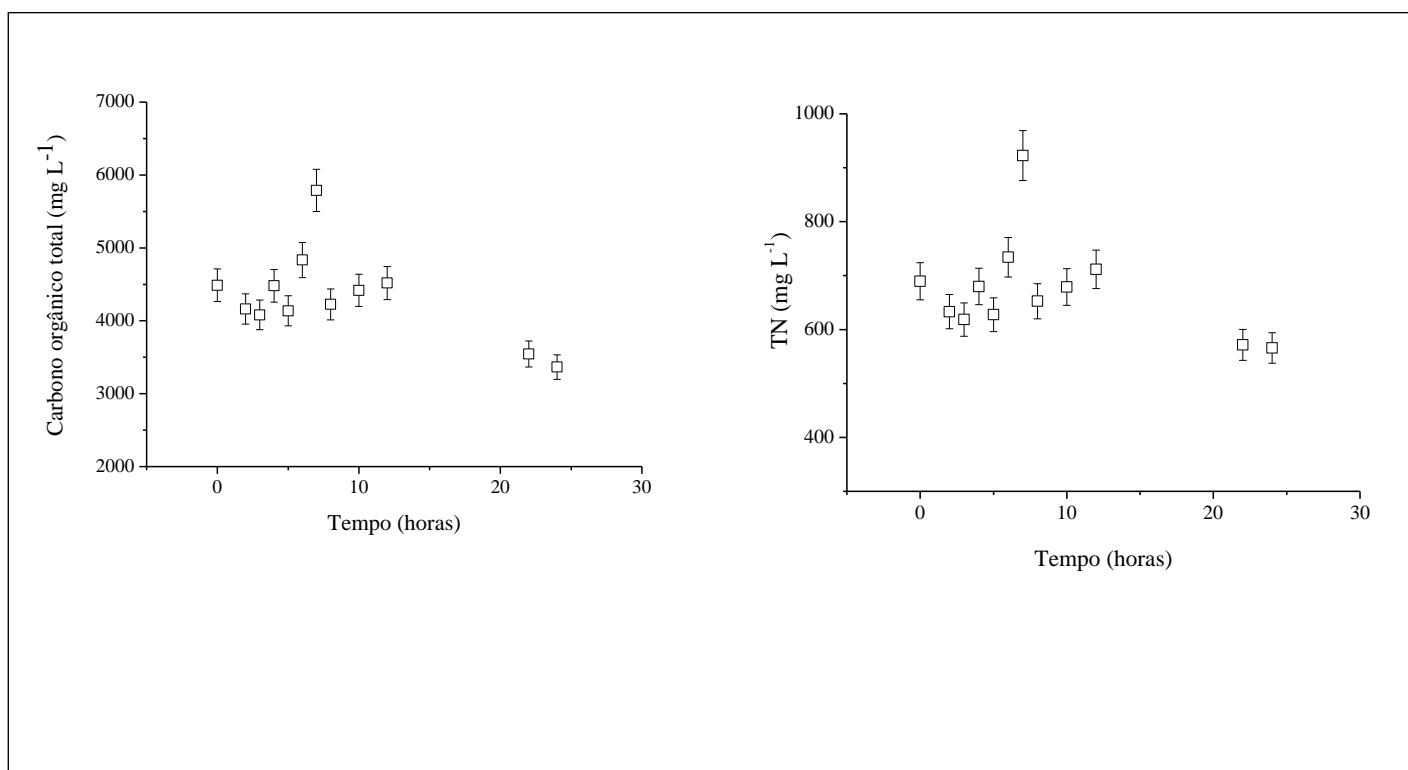
Figura 5.9: Curva de crescimento de *Aphanocapsa holsatica* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5

Com relação ao consumo de carbono, verifica-se uma tendência maior de remoção do carbono orgânico total no final das 24 horas (Figura 5.10a), com máximo de 25% (Tabela 5.3).

Considerando que para o ajuste desta razão C/N não foi adicionada glicose, percebe-se o consumo de carbono original da vinhaça, com rendimento em torno de 2,8 gramas de biomassa por grama de TOC.

Como a maioria dos trabalhos estima matéria orgânica pela demanda química de oxigênio (DQO), a qual é por volta de 2,5 vezes superior ao TOC da vinhaça, temos que a remoção máxima de DQO poderia ser de 62,5%, valor razoável até mesmo para sistemas de tratamento de efluentes convencionais aeróbios e energeticamente exigentes.

Interessante salientar ainda as remoções de carbono e nitrogênio muito superiores para *Aphanocapsa* em biorreator de bancada quando comparado ao sistema de frascos agitados (Tabela 5.1), o que certamente está associado ao fornecimento adequado de oxigênio, fundamental para estes cultivos heterotróficos.



(a)

(b)

Figura 5.10: Perfis de carbono orgânico total, TOC (a) e nitrogênio total, TN (b) no meio durante o cultivo de *Aphanocapsa holsatica* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5

Tabela 5.3 Parâmetros cinéticos de crescimento, remoção de substratos no cultivo de *Aphanocapsa holsatica* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5

Parâmetro	Valor
$\mu_{\text{máx1}}$ (Fase Log 0 – 3 horas)	0,50 h ⁻¹
$\mu_{\text{máx2}}$ (Fase Log 6 – 22 horas)	0,0098 h ⁻¹
Remoção máxima de TOC	25%
Remoção máxima de TN	18%
Rendimento de TOC em biomassa ($Y_{X/S}$)	2,8 g g ⁻¹

No caso de nitrogênio total, a remoção máxima foi ligeiramente inferior, em torno de 18% (Figura 5.10b), indicando que o cultivo heterotrófico desta cianobactéria não favorece a remoção de nutrientes das águas.

5.3 Seleção da razão C/N da vinhaça no cultivo de *Geitlerinema sp* em sistema de frascos agitados

Considerando que a separação da biomassa é uma das etapas mais críticas nos processos utilizando microalgas em escala industrial, foi proposta a condução de ensaios em diferentes razões carbono:nitrogênio da vinhaça com a cianobactéria filamentosa *Geitlerinema sp*.

Como trata-se de um micro-organismo com morfologia completamente distinta, há uma tendência de sedimentação natural no meio, o que facilita as

etapas de separação e purificação de bioprodutos, conhecidos como *downstream*. Nesse sentido, a Figura 5.11 apresenta a produtividade em biomassa para as razões C/N 5, 10, 20 (valor original da vinhaça), 30 e 40.

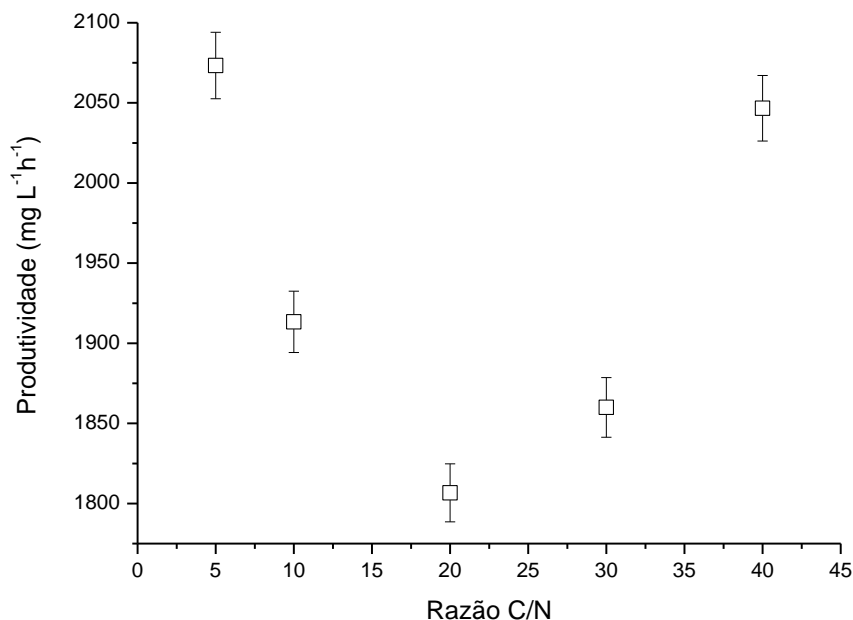


Figura 5.11: Produtividade em biomassa para cultivo de *Geitlerinema sp* a partir de vinhaça com diferentes razões C/N

Observa-se que, tanto os valores acima como abaixo da condição original favoreceram o crescimento, sendo mais intenso nas condições de disponibilidade de carbono e nitrogênio. Também cabe salientar que, diferentemente da cianobactéria unicelular, houve remoção de carbono e nitrogênio para praticamente todas as condições (Tabela 5.4).

A curva de crescimento apresentada na Figura 5.12 indica um crescimento mais vigoroso até aproximadamente 18 horas, sugerindo que, remoções de carbono e nitrogênio máximas podem ter ocorrido em diferentes

tempos, o que também é destacado nas Figuras 5.13 e 5.14, as quais apresentam, respectivamente, perfis de consumo de C e N.

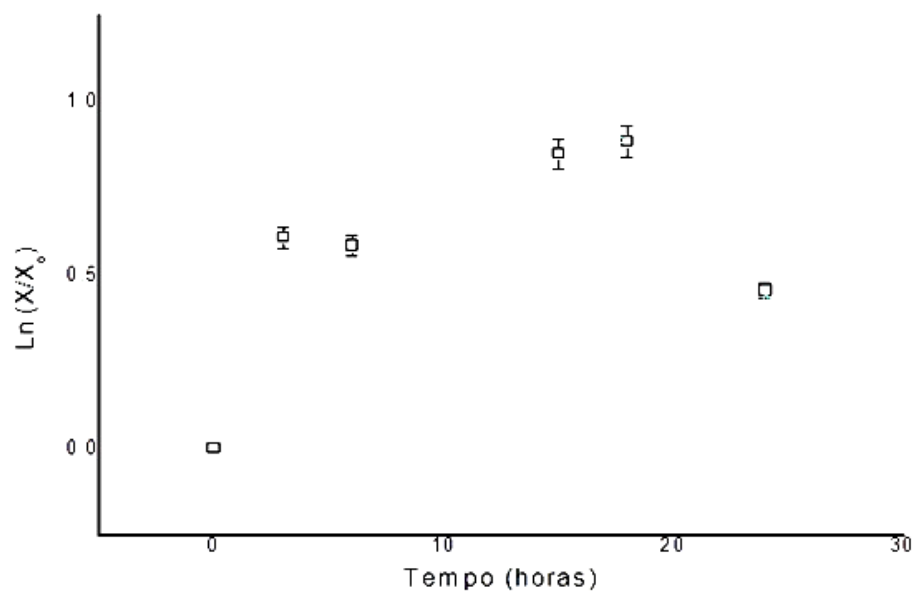
Tabela 5.4: Variação de biomassa e teores de Carbono e nitrogênio totais no meio para *Geitlerinema sp.* em cultivos de 24 horas

Razão C/N	Variação de TOC em 24 horas (mgL⁻¹)	Variação de TN em 24 horas (mgL⁻¹)
5	Remoção de 21,9	Remoção de 5,17
10	Remoção de 22,07	Remoção de 2,3
20	Acúmulo de 154,79	Remoção de 2,1
30	Remoção de 24,16	Remoção de 3,38
40	Acúmulo de 15,5	Remoção de 2,25

A facilitada separação da biomassa de *Geitlerinema sp.* do meio de cultivo é um aspecto tecnológico interessante, porém dificulta o monitoramento dos parâmetros de processo.

Assim, como o crescimento e o consumo de substrato são variáveis que dependem da medida de massa, a tendência desta cianobactéria em formar agregados dificulta estas análises. Isto pode explicar a variação apresentada principalmente nas Figuras 5.13 e 5.14.

A velocidade específica de crescimento máxima nessas condições é da mesma ordem de grandeza (0,05 h⁻¹) que apresentada para *Aphanocapsa* em frascos agitados (Tabela 5.2).



I

Figura 5.12: Curva de crescimento de *Geitlerinema sp.* em vinhaça com razão C/N 20

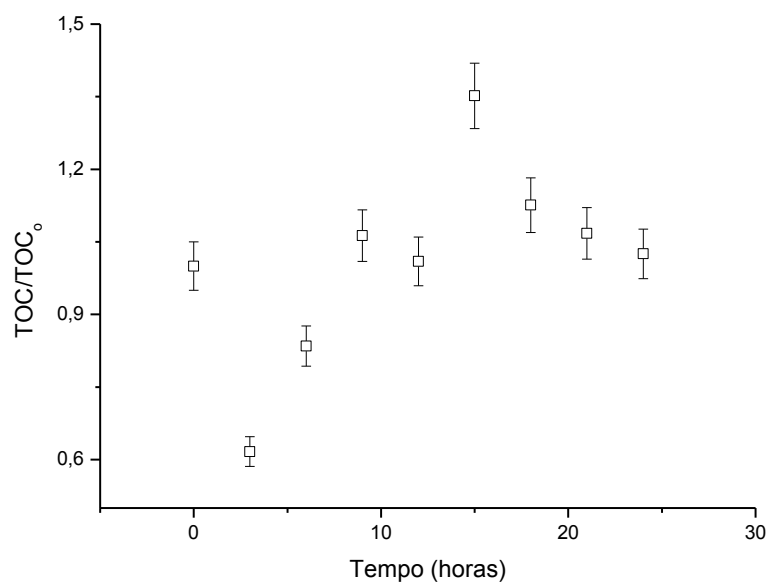


Figura 5.13: Perfil do consumo de carbono orgânico total (TOC) a partir do valor inicial (TOC_0) no cultivo da cianobactéria *Geitlerinema sp.* em vinhaça com razão C/N 20

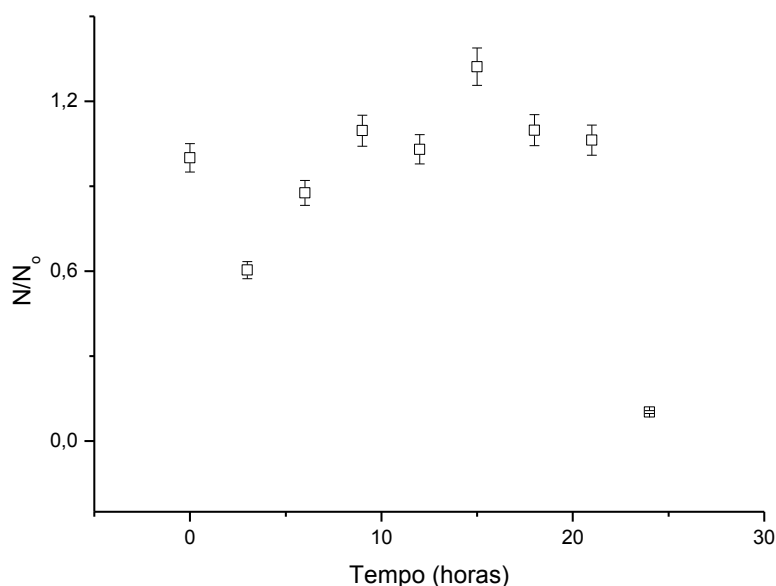


Figura 5.14: Perfil do consumo de nitrogênio (N) a partir do valor inicial (N_0) no cultivo da cianobactéria *Geitlerinema sp.* em vinhaça com razão C/N 20

As Figuras 5.15 a 5.17 referem-se aos experimentos de *Geitlerinema* em frascos agitados com a razão C/N ajustada para 5 com a adição de nitrato. A curva de crescimento não indica um desenvolvimento adequado desta cianobactéria nessas condições, havendo praticamente a manutenção do crescimento celular, com discreto crescimento a $0,0224 \text{ h}^{-1}$ até 9 horas de cultivo. Apesar disto, houve uma remoção de carbono por volta de 71% (Figura 5.16), com velocidade de consumo de primeira ordem de $0,045 \text{ h}^{-1}$. Este resultado é interessante em termos de tratamento de águas residuárias, uma vez que houve um considerável consumo de carbono orgânico no meio sem geração considerável de biomassa. A Figura 5.17 apresenta o perfil de nitrogênio no meio, indicando flutuações até 9 horas de cultivo, seguido de um consumo de conforme reação de ordem zero a uma taxa de $21,45 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ de nitrogênio. Este comportamento cinético indica que não houve limitação de

nitrogênio nesta condição, quando a vinhaça teve ajuste de C/N pela adição de nitrato. Assim, para a razão C/N baixa pode-se inferir que carbono é o substrato limitante que controla o crescimento desta cianobactéria.

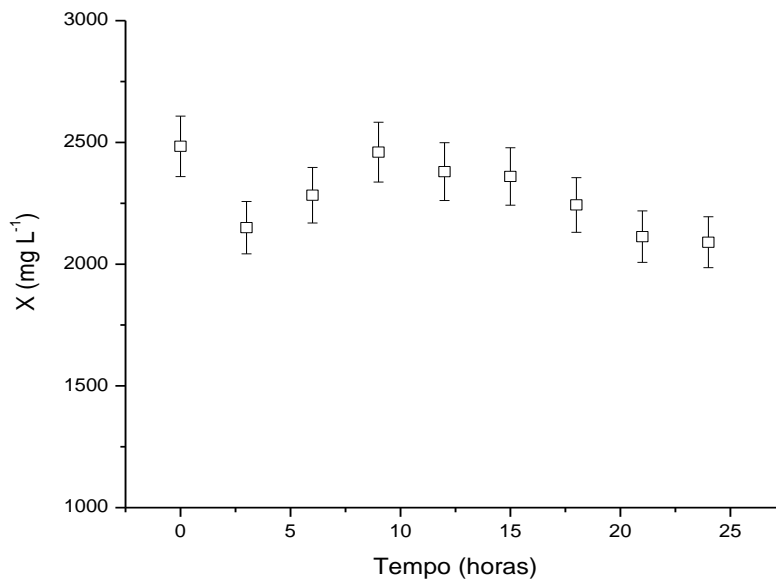


Figura 5.15: Curva de crescimento de *Geitlerinema sp* em vinhaça com razão C/N5

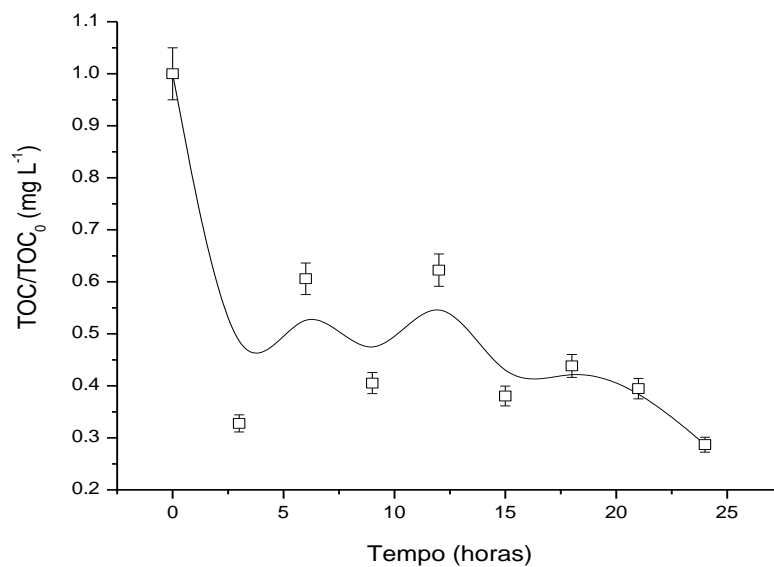


Figura 5.16: Perfil do consumo de carbono orgânico total (TOC) a partir do valor inicial (TOC₀) no cultivo da cianobactéria *Geitlerinema sp* em vinhaça com razão C/N 5

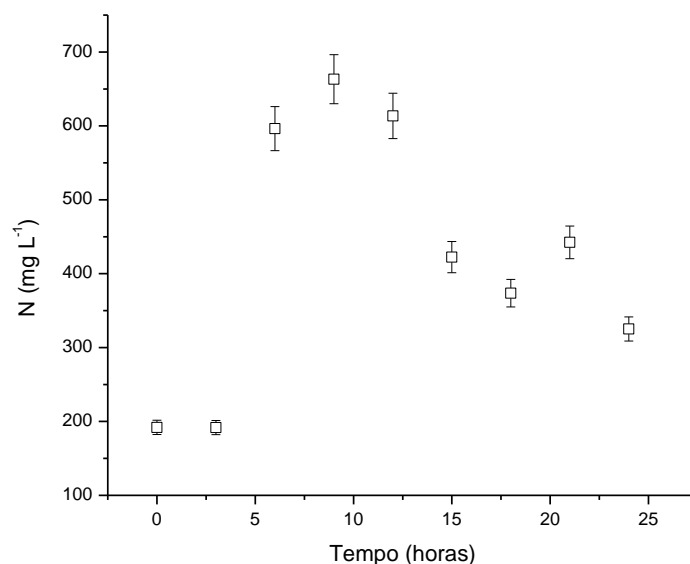


Figura 5.17: Perfil do consumo de nitrogênio (N) no cultivo da cianobactéria *Geitlerinema sp* em vinhaça com razão C/N 5

A Figura 5.18 apresenta a curva de crescimento de *Geitlerinema* na razão C/N ajustada para 40 com a adição de glicose. Os dados indicam uma elevada variação na concentração celular e estas flutuações podem ser justificadas pela dificuldade de quantificação da biomassa de micro-organismos filamentosos. De qualquer forma, os resultados sugerem que não houve um crescimento adequado nessas condições, provavelmente pela limitação de nitrogênio comparado com carbono. De fato, a Figura 5.19 apresenta o perfil de carbono orgânico no meio, o qual apresenta oscilações até 9 horas, seguindo após este período uma cinética de ordem zero (não limitante) com taxa de 237 mg L⁻¹h⁻¹. Por outro lado, o consumo de nitrogênio foi limitado, seguindo cinética de primeira ordem a partir de 9 horas (Figura 5.20) com 0,07 h⁻¹. Assim, esses resultados indicam que a limitação de nitrogênio é mais

importante, haja vista a curva de crescimento apresentada na Figura 5.18 para esta condição de C/N 40.

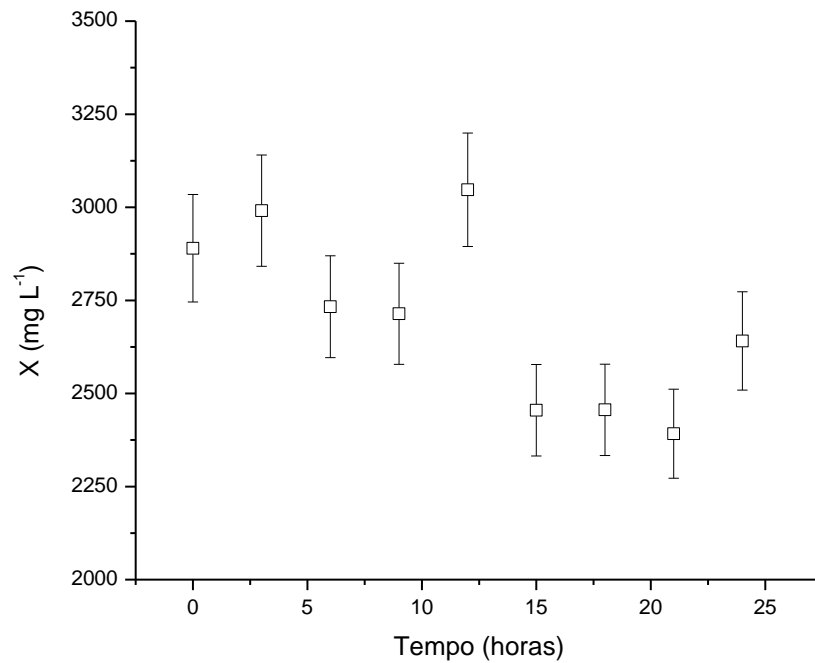


Figura 5.18: Curva de crescimento de *Geitlerinema sp* em vinhaça com razão C/N 40

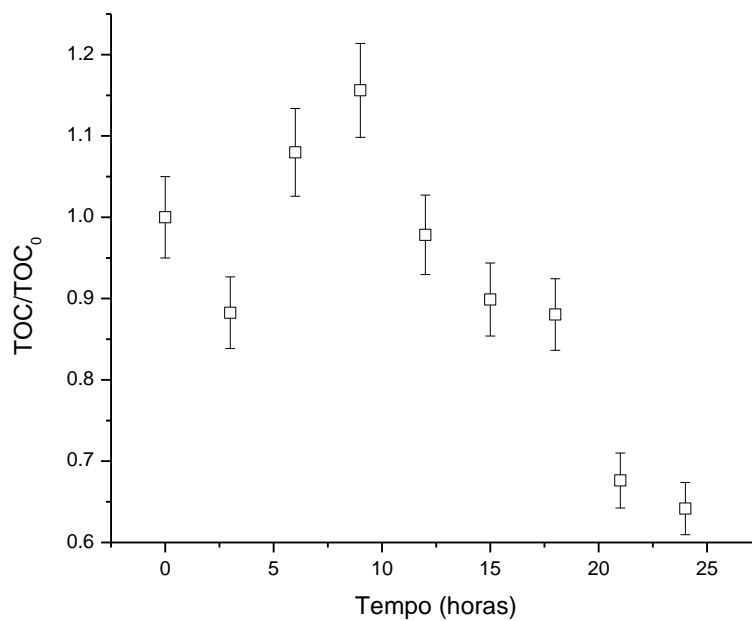


Figura 5.19: Perfil do consumo de carbono orgânico total (TOC) a partir do valor inicial (TOC₀) no cultivo da cianobactéria *Geitlerinema sp* em vinhaça com razão C/N 40

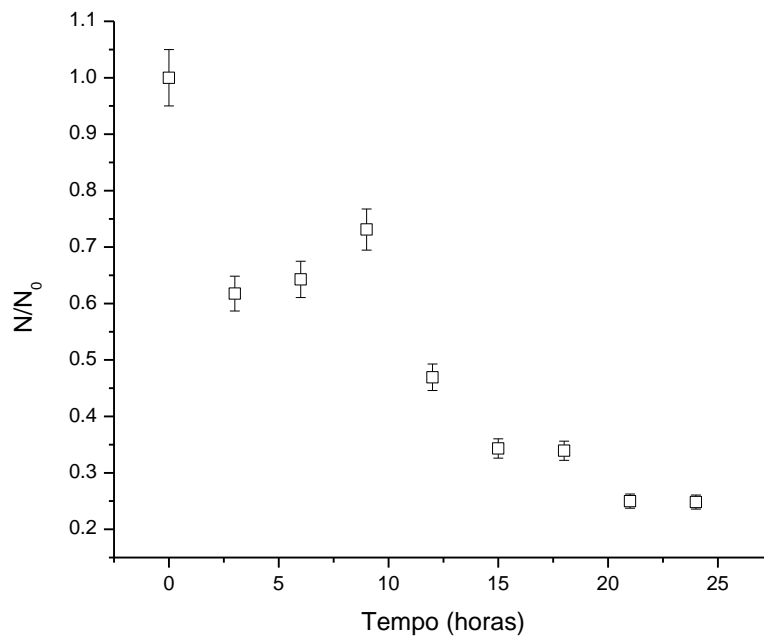


Figura 5.20: Perfil do consumo de nitrogênio (N) a partir do valor inicial (N_0) no cultivo da cianobactéria *Geitlerinema sp* em vinhaça com razão C/N 40

Os resultados obtidos para o cultivo desta cianobactéria filamentososa em vinhaça nas diferentes condições foram promissoras uma vez que elevada remoção de carbono pode ser obtido com a redução da razão C/N da vinhaça (71% na razão C/N 5). As cianobactérias filamentosas tendem a apresentar crescimento inferior às unicelulares, mas apresentam propriedades interessantes de agregação e sedimentação no meio líquido fundamentais para a aplicação industrial destes micro-organismos. Como o crescimento foi desconsiderável, não foi possível determinar as produtividades protéica e lipídica nessas condições. Sabe-se que as microalgas apresentam um potencial para diversas aplicações biotecnológicas, passando pela obtenção de bioprodutos industriais até processos de tratamento de águas residuárias. Porém, para viabilizar as chamadas “biorrefinarias” de microalgas, diversos

estudos têm sido conduzidos na obtenção de processo de separação da biomassa do meio de cultivo que envolvam baixos custos, já que esta etapa compreende cerca de 30% do investimento financeiro (GUTIÉRREZ et al., 2015; WANG et al., 2015; BARROS et al., 2015; NDIKUBWIMANA et al., 2014; CHEN et al., 2011).

A principal razão para este custo é o tamanho reduzido das células e a tendência a crescer produzindo meios diluídos, ou seja, obtendo-se concentrações finais em torno de 1 g L^{-1} com densidade próxima da água, dificultado a centrifugação, por exemplo.

Além disso, a superfície das células é carregada negativamente e carregam moléculas orgânicas algogênicas, tais como ácido glicólico, carboidratos, aminoácidos, peptídeos, fósforo orgânico, enzimas, vitaminas e inibidores, os quais auxiliam na formação de uma dispersão mais estável na fase líquida (HER et al., 2004; HENDERSON et al., 2008).

Pode-se ponderar que não existe, até o momento, um método de separação da biomassa microalgal que seja eficiente e viável economicamente, sendo este um ponto chave para a produção de microalgas em escala industrial (BARROS et al., 2015).

Sendo assim, torna-se fundamental o estudo de métodos físicos (flotação, centrifugação, filtração, decantação) e físico-químicos (coagulação, floculação) ou de processo onde a concentração final obtida seja mais elevada. Outra proposta ainda seria o uso de micro-organismos filamentosos, os quais apresentam uma tendência a formar agregados, sendo desta forma separados da fase líquida de forma mais facilitada.

5.4 Cultivo de *Geitlerinema sp* em biorreator de bancada com vinhaça ajustada na razão C/N selecionada

De forma semelhante aos cultivos de *A. holsatica*, a razão C/N 5 foi selecionada para o cultivo de *Geitlerinema sp* em reator de bancada, o qual permite monitoramento da quantidade de oxigênio dissolvido no meio líquido. Nesse sentido, as Figuras 5.21 e 5.22 apresentam o perfil de oxigênio (O_2) dissolvido em vinhaça durante o cultivo. Com relação a Figura 5.22, na primeira parte da curva, sem aeração forçada, percebe-se o consumo de oxigênio de acordo com a taxa de $1,14 \text{ mgL}^{-1}\text{min}^{-1}$ enquanto que, na segunda parte da curva, após a realimentação, verifica-se que o biorreator apresenta um coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (k_{LA}) em torno de $0,024 \text{ s}^{-1}$. Conclui-se que o biorreator apresenta nessas condições um k_{LA} da mesma ordem de grandeza do que os ensaios para cianobactéria unicelular (Figura 5.7). Porém, ocorre um consumo de oxigênio bem superior para *Geitlerinema*, o que pode dificultar seu crescimento em escala industrial.

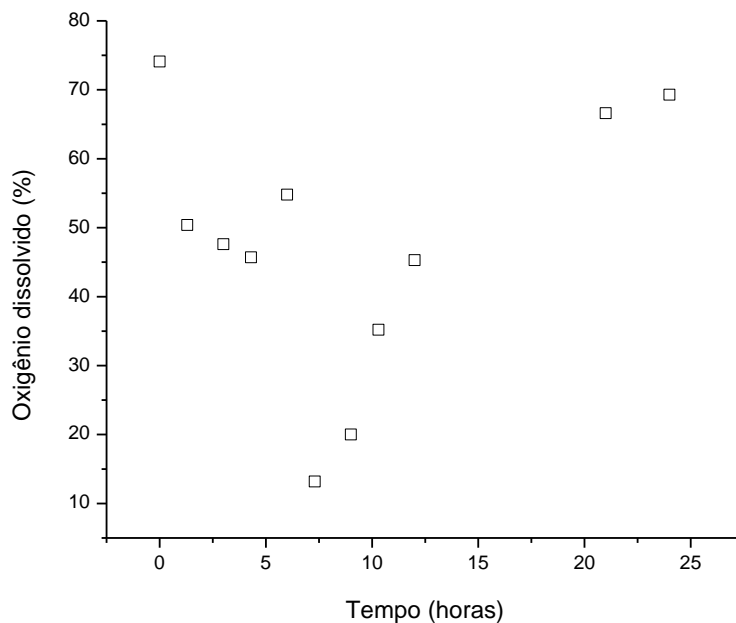


Figura 5.21: Monitoramento de oxigênio no cultivo de *Geitlerinema sp* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5

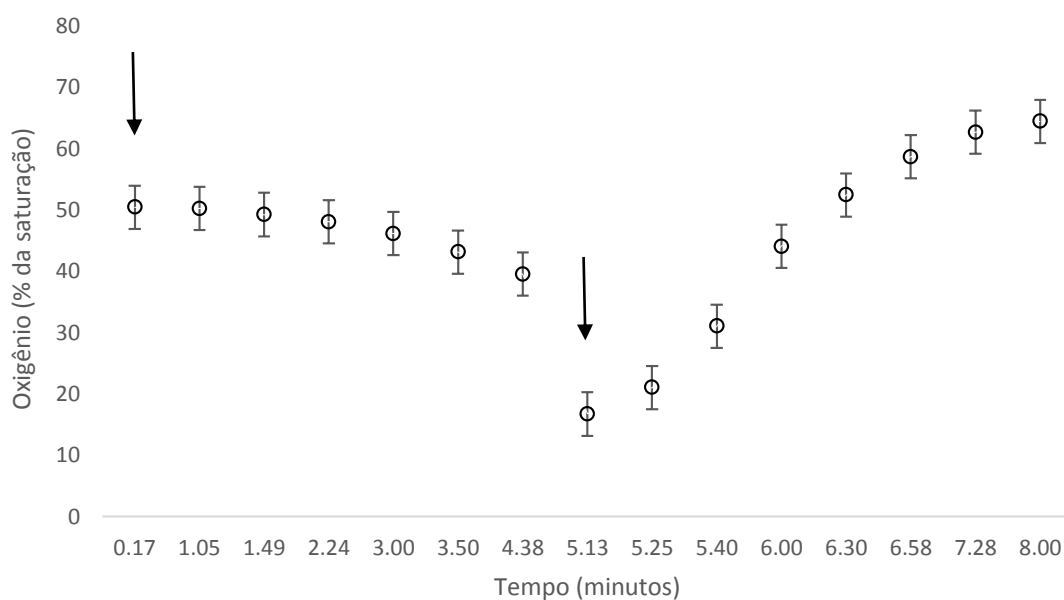


Figura 5.22: Perfil de oxigênio no cultivo de *Geitlerinema sp* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5 (as setas indicam o corte e posterior realimentação da aeração)

O perfil de pH do meio é apresentado na Figura 5.23, o qual intensificando-se após cerca de 6 horas de cultivo. Novamente, atribui-se essa

variação à liberação de nitrogênio amoniacal no meio, em conformidade com uma discreta queda e posterior estabilização na biomassa total (Figura 5.24).

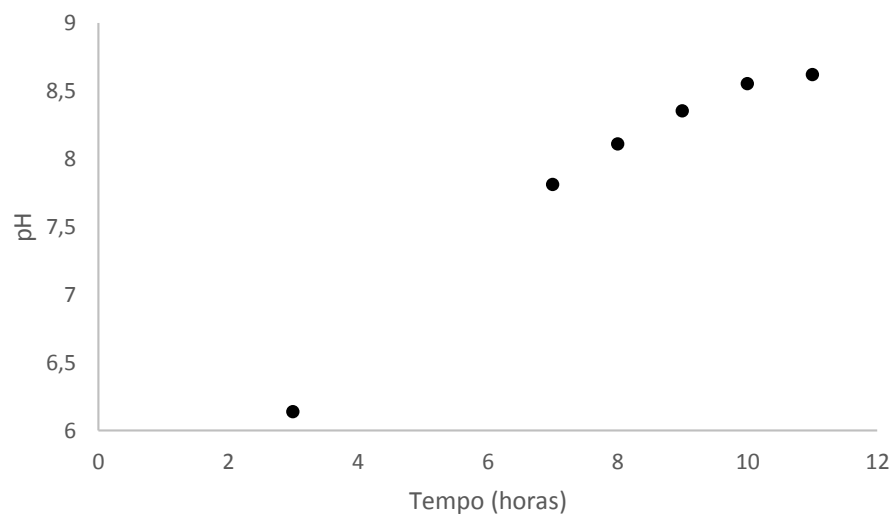


Figura 5.23: Monitoramento do pH do meio no cultivo de *Geitlerinema sp* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5

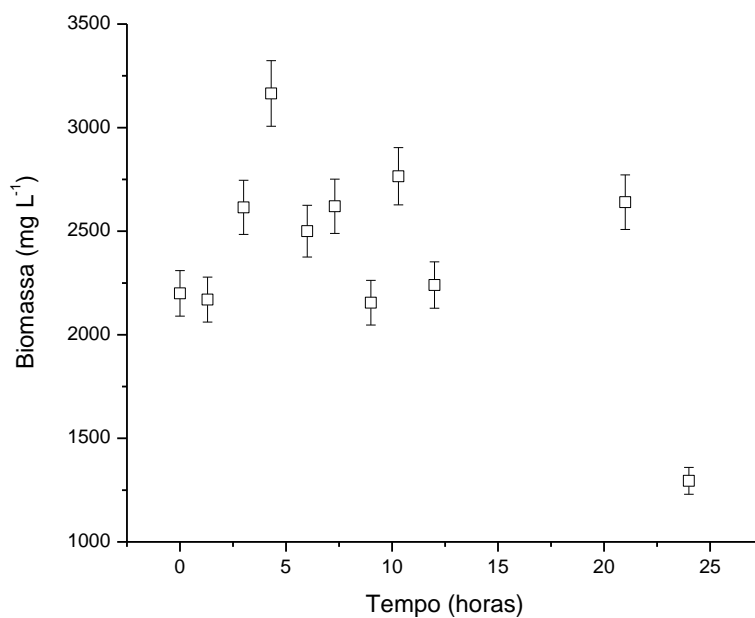


Figura 5.24: Curva de crescimento de *Geitlerinema sp* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5.

O consumo de carbono, de forma semelhante ao ocorrido no cultivo de *A. holsatica*, foi mais intenso ao final das 24 horas (Figura 5.25a), com velocidade de $0,21 \text{ h}^{-1}$, com remoção máxima de 85%. Este consumo de carbono apresenta o mesmo comportamento do experimento em razão C/N 5 nos frascos agitados, com uma taxa na mesma ordem de grandeza. A remoção superior de matéria orgânica pode estar relacionada a melhor disponibilidade de oxigênio nessas condições. Desta forma, pode-se considerar que houve um sucesso no escalonamento deste processo, uma vez que o mecanismo de remoção de carbono foi mantido e os parâmetros cinéticos não sofreram consideráveis variações.

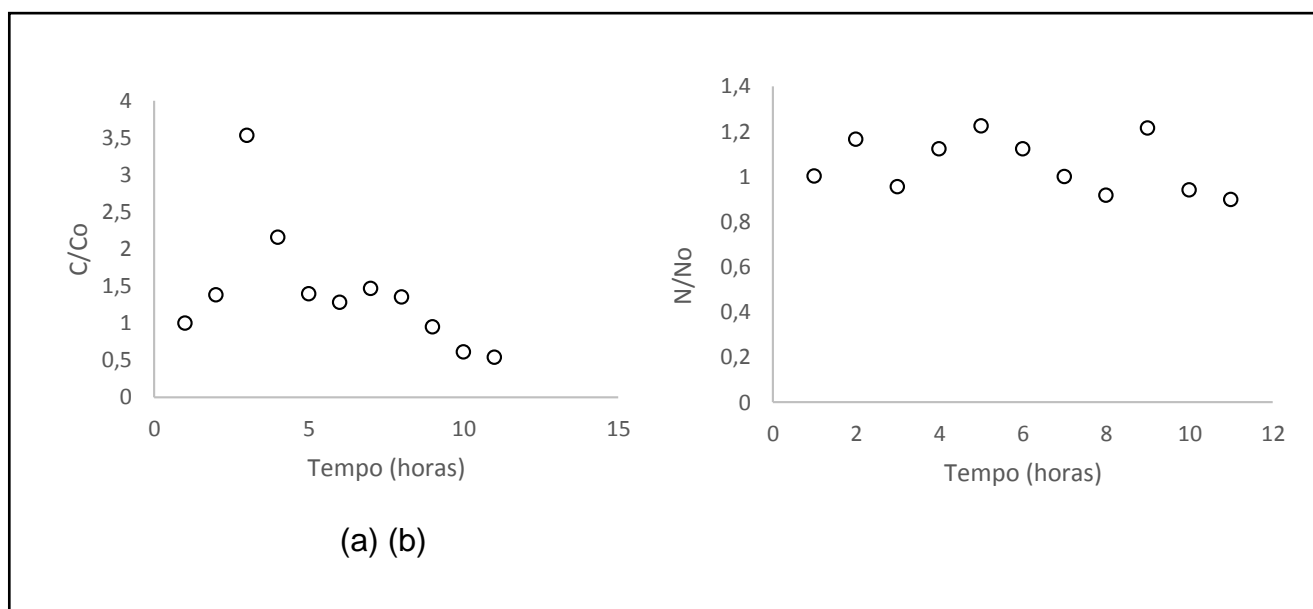


Figura 5.25: Perfis de carbono orgânico total (C/C_0) (a) e nitrogênio total (N/N_0) no meio durante o cultivo de *Geitlerinema sp* em biorreator de bancada com vinhaça na razão C/N 5

Os resultados experimentais indicaram que, apesar da dificuldade maior em se trabalhar com micro-organismos filamentosas, como é o caso da

cianobactéria *Geitlerinema sp*, a taxa de consumo e a remoção de carbono indica que é viável a sua utilização para tratamento de águas residuárias como vinhaça. Além disso, a sua facilitada separação do meio de cultivo garante remoção de matéria orgânica original da vinhaça e pouca interferência de células no efluente final.

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, foi possível concluir:

- A cianobactéria unicelular *Aphanocapsa holsatica* apresentou crescimento em vinhaça nas diferentes razões C/N em frascos agitados, com destaque para altas produtividades e velocidades específicas de crescimento obtidas para C/N 5 e 40;
- Nessas condições, houve um discreto consumo de carbono e nitrogênio para todas as razões C/N testadas;
- Os valores de produtividade lipídica e protéica, avaliados na condição de maior crescimento celular, foram compatíveis aos apontados para a espécie na literatura.
- Em biorreator de bancada, pôde-se verificar a baixa demanda de oxigênio da cianobactéria unicelular e condições de aeração adequada;
- Diferentemente dos frascos agitados, foram obtidas remoções de carbono e nitrogênio em biorreator da ordem de 25 e 18%, respectivamente, além de uma velocidade específica de crescimento máximo cerca de cinco vezes superior ($0,5 \text{ h}^{-1}$);
- A cianobactéria filamentosa *Geitlerinema sp.* cresceu nas diferentes razões C/N da vinhaça testadas, também com elevadas produtividades em 5 e 40, velocidade específica similar, mas apresentando remoções de carbono e nitrogênio superiores aos cultivos de *Aphanocapsa*.

- Na razão C/N ajustada em 5, a cianobactéria *Geitlerinema sp.* apresentou cinética de consumo de carbono e primeira ordem e elevadas remoções, em torno de 71 e 85% para frascos agitados e reator de bancada, respectivamente;

- De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir é viável o cultivo de *Aphanocapsa holsatica* e *Geitlerinema sp.* em vinhaça na faixa de razão C/N de 5 a 40, com elevada conversão em biomassa para a cianobactéria unicelular e elevada remoção de carbono para a cianobactéria filamentosa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAOUF, N.; IBRAHEEM, B.M. **Antibiotic activity of two *Anabaena* species against four fish pathogenic *Aeromonas* species.** African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 15, 2008.

AlgaeBASE. Plataforma de informações sobre algas. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 18/07/2015.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 21^o ed., 2005.

ANAGNOSTIDIS, K. ***Geitlerinema*, a new genus of oscillatorialean cyanophytes.** Plant systematics and evolution, v. 164, n. 1-4, p. 33-46, 1989.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. **Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales.** Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes, p. 247-345, 1989.

AQUINO, S. F. SANTOS, A. R. L., S. F., CARVALHO, C. F., VIEIRA, L. A., & GONTIJO, E. S. J. **Characterization and treatability of wastewater from a dying hood of a furniture industry.** Engenharia Sanitaria e Ambiental, 15(4), 357-366.2010.

ARAGÃO, M. S. S. **Tratamento da vinhaça com *Pleurotos sajor-caju* CCB 020 em testes de bancada e biorreatores AIR-LIFT.** Aracaju, (Mestrado). Universidade Tiradentes, 2012.

BARROS, A.I. et al. **Harvesting techniques applied to microalgae: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, 41, pp.1489–1500; 2015.

BASTOS, R.G.; MATTOS, L.F.A.; DESSIA, V.C. GOLDEMBERG, S.; DA SILVA, D. **Heterotrophic growth of *Desmodesmus subspicatus* using sugarcane vinasse in batch stirred reactor.** Proceedings of Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Elsevier. San Diego, CA, Estados Unidos, 2012.

BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I. **Consumo e transferência de oxigênio no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*.** Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, Brasil, 2008.

BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I., ALMEIDA, R.V., ALMEIDA, T.L., BENERI, R.L.; PADILHA, M. **Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica Nägeli* na ausência de luminosidade.** Revista da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES) v.9 (2), p. 112-116. 2004.

BASTOS, R.G.; SILVA, M.A.; RIGO, M.; VEIGA, G. E QUEIROZ, M.I. **Growth of cyanobacteria *Aphanothece sp.* on exogenous sugars.** Bioscience Journal. v. 27, p. 156-161, 2011.

BASTOS, R.G. et al. **Treatment of rice parboiling wastewater by cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nägeli* with potential for biomass products.**Desalination and Water Treatment, (July), pp.1–7; 2014a.

BASTOS, R.G. et al. **Treatment of rice parboiling wastewater by cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nägeli* with potential for biomass products.**Desalination and Water Treatment, (July), pp.1–7; 2014b.

BASTOS, R. G. ; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; JACOB-LOPPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.**Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*.**Revista Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science: v. 5, n. 3, 2010.

BERNAL, C. B. et al. **Microalgal dynamics in batch reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water.**Water, air, and soil pollution, v. 190, n. 1-4, p. 259-270, 2008.

BONINI, M. A.**Cultivo heterotrófico de *Aphanotece microscópica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça.** Araras, (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos; Centro de Ciências Agrárias.2012.

CHEN, C.-Y. et al. **Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review.** Bioresource technology,102(1),pp.71–81; 2011.

CRISPINO, L. M. B.; SANT'ANNA, C. L. **Cianobactérias marinhas bentônicas de ilhas costeiras do Estado de São Paulo, Brasil.** Revista Brasileira de Botânica, v. 29, n. 4, p. 45-56, 2006.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis e Efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana-SP.** 2003, 137f. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.2005

DE MATTOS, L. F. A.; BASTOS R. G."**COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus sp.***" Desalination and Water Treatment ahead-of-print 1-9. 2015

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles.** Academic press, 1995.

DUMAS, A. ; LALIBERTÉ, G.; LESSARD, P.; DE LA NOÛE, J. et al. **Biotreatment of fish farm effluents using cyanobacterium *Phormidium bohneri*.**Aquacultural Engineering, v. 17, p.57-68.1998.

ELICKER, C.; FLORES, C. P.; SANTOS, M. A. Z.; COLEPICOLO, P.; PEREIRA, C. M. P.**Estudo da Utilização da Biomassa de Cianobactérias como Matéria-Prima para a Síntese de Biodiesel Através da Reação de**

Esterificação In Situ. Revista Virtual de Química, 2015, XX. Publicação em 6 de setembro de 2015.

Encycloedia of Life. Disponível em < <http://eol.org/pages/919341/overview>> Acesso em : 17/08/2014.

FAY, P. **Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria.** Microbiological Reviews, V.56 (2), p.340-373, 1992.

FAY, P. **The blue-greens (Cyanophyta – Cyanobacteria).** Edward Arnold Publishes. London, 1983.

FLORES, E.; HERRERO, A. **Assimilatory Nitrogen Metabolism and Its Regulation.**In: BRYANT, D.A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. p. 409-435, 1994.

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

GALACTION, A. I. ; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.;&TURNEA, M. **Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths.**Biochemical Engineering Journal, 20(1), 85–94. doi:10.1016/j.bej.2004.02.005. 2004.

GANTZER, C. J.; RITTMANN, B. E.; HERRICKS, E. E. **Mass transport to streambed biofilms.** Water Research, v. 22, n. 6, p. 709-722, 1988.

GONÇALVES, I. S. **Cultivo da microalga *Synechococcus nidulans* para produção de biopolímeros.**Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 1, p. 562-566, 2014.

GOLDBECK, R.; SILVA, A. G.; JACQUES, A. C.; COGO, S. L.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. **Relação entre o nitrogênio total não-protéico na cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli*.**Revista Vetor, Rio Grande, 16 (1/2): 47-53, 2006.

GUTIÉRREZ, R. et al. **Harvesting microalgae from wastewater treatment systems with natural flocculants: Effect on biomass settling and biogas production.**Algal Research, 9, pp.204–211. 2015.

HER, N. et al. **Characterizing algogenic organic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling.**Water research, 38(6), pp.1427–38. 2004.

HENDERSON, R. K. et al. **Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms.** Water research, v. 42, n. 13, p. 3435-3445, 2008.

HORNES, M; SILVA, A. G.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ; M.I. **Influência dos compostos nitrogenados na concentração da cianobactéria *Aphanothece***

microscópica Nägeli. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 30(2): 364-371, abr.-jun. 2010.

JACOB-LOPES, E. ; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F. M. **Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece microscópica Nägeli* cultivada no efluente da parboilização do arroz.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 26(2): 482-488, abr.-jun. 2006.

LIM, S.-L., Chu, W.-L. & Phang, S.-M. **Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater.** Bioresource technology, 101(19), pp.7314–22. 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** Décima edição. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAINUL, I. H.; PHILLIE J; LOUIS M, A. P. **Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture.** Process Biochem, 31(4):355–361; 1996.

MANETTI, A. G. S. **Avaliação do reuso da água residuária oriunda de uma indústria processadora de pescado utilizando *Aphanothece microscópica Nägeli*.** Rio Grande: UFRG, 85p. Dissertação Mestrado; 2008.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: a review.** Renewable and sustainable energy reviews, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MATTOS, L. F. A. **Tratamento físico-químico e cultivo de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar.** Universidade Federal de São Carlos - Centro de Ciências Agrárias. Dissertação de Mestrado, 2014.

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

MOORE, L. R. et al. **Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*.** Limnology and Oceanography, v. 47, n. 4, p. 989-996, 2002.

MORALEZ-Sánchez, D. et al. **Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source.** Biotechnology for biofuels, 6,p.100,2013.

MUTTON, M. A.; ROSETTO, R.; MUTTON, M. J. R. **Utilização agrícola da vinhaça.** In: Bioetanol de cana-de-açúcar - P&D para produtividade e sustentabilidade. Luís Augusto Barbosa Cortez (coordenador). Pág. 423-440. São Paulo: Blucher, 2010.

NDIKUBWIMANA, T. et al. **Harvesting of microalgae *Desmodesmus sp.F51* by bioflocculation with bacterial bioflocculant.** Algal Research, 6, pp.186–193, 2014.

OREN, A.; SHILO, M. **Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*: sulfur respiration and lactate fermentation.** Archives of Microbiology, v. 122, n. 1, p. 77-84, 1979.

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

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, 98(11), pp.2163–9. 2007.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, R.G., BENERI, R.L. & ALMEIDA, R.V. **Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece microscopica Nögeli* en las aguas residuales de la parbolización del arroz.** Revista Información Tecnológica, Chile, v.13 (1). p. 61-65, 2002.

RIPKA, R.; DERUELLE, J.; WATERBURY J.B.; HERDMAN; M.; STAINER, R.Y. **Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria.** Journal of General Microbiology. Great Britain, n.111, p. 1-61, 1979.

SAFONOVA, E.; KVIKTO, K. V.; IANKEVITCH, M. I.; SURGKO, L. F.; AFTI, I. A.; REISSER, W. **Biotreatment of Industrial Wastewater by Selected Algal-Bacterial Consortia.** Engineering in Life Sciences, 4, No.4, 2004.

SANTANNA, C. L. **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras.** Instituto de Botânica, São Paulo, 2012.

SILVA, A. P. M.; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. A. R. **Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 18, n. 1, p. 38-43, 2013. ISSN 1807-1929.

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.

SKAPHANDRUS. Plataforma de gestão de dados. Disponível em <<http://skaphandrus.com>>. Acesso em: 17/08/2014.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. **Commercial Applications of Microalgae.** Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 101, No 2, 87-96; DOI: 10.1263/jbb.101.87.2006.

SZYMANSKI, M. S. E.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, W. N. **Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 4, p. 901-912, out./dez. 2010.

TAM, N. F. Y.; Wong, Y. S. **Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal.** Environmental Pollution 107.1: 145-151; 2000.

VASCONCELOS, V.M.; PEREIRA, E. **Cyanobacteria diversity and toxicity in wastewater treatment plant.** WasterResearch 35 (5), p. 1354-1357, 2001. Portugal, 2001.

WANG, S.-K. et al. **Harvesting microalgae by magnetic separation: A review.** Algal Research, 9, pp.178–185. 2015.

XIN, L.; HONG-YING, H; KE, G.; YING-XUE, S. **Effects of different nitrogen and phosphorus concentration of growth uptake, and lipid accumutation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.*** BioresouceTechnology v. 101, p. 5494-5500, 2010.

ANEXO

Artigo submetido para publicação na Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental e Algal

**INFLUENCE OF C/N RATIO IN THE GROWTH OF *Aphanocapsa*
sp. FROM SUGARCANE VINASSE**

FONTE, Jéssica Cristina

Student of the Post - Graduate Program in Agriculture and Environment. Agricultural Sciences Center of the Federal University of São Carlos - Araras / SP. Brazil. E-mail: jessicafonte@hotmail.com

BASTOS, Reinaldo Gaspar

Professor of the Post - Graduate Program in Agriculture and Environment. Agricultural Sciences Center of the Federal University of São Carlos - Araras / SP. Brazil. E-mail: reinaldo@cca.ufscar.br

Corresponding author: Jéssica Cristina Fonte – jessicafonte@hotmail.com

ABSTRACT

Vinasse is the main by-product of the ethanol distillation-fermentation process. From the biochemical point of view, vinasse can be regarded as a nutrient broth due to its nutrient composition. Despite of this, few studies address the use of this wastewater as a substrate for the cultivation of microorganisms. Some strains of cyanobacteria, as *Aphanocapsa sp.*, are capable of heterotrophic growth, a property that allows the application of wastewater treatment. In this context, this study aimed at evaluating the influence of vinasse C/N ratio in the biomass production by *Aphanocapsa sp.* Results indicate that the heterotrophic cultivation of cyanobacterium from vinasse with a wide range of carbon/nitrogen ratio is feasible. The highest maximum specific growth rates were obtained for C/N ratio 5 and 40, although the condition “more available carbon” allowed a balanced growth of microorganisms.

KEYWORDS

Cyanobacteria; vinasse; *Aphanocapsa*; C/N ratio; wastewater

RESUMEN

La vinaza es el principal subproducto del proceso de destilación-fermentación de etanol. Desde el punto de vista bioquímico, la vinaza puede ser considerado como un caldo de nutrientes debido a su composición de nutrientes. A pesar de esto, algunos estudios abordan el uso de estas aguas residuales como sustrato para el cultivo de microorganismos. Algunas cepas de cianobacterias, como *Aphanocapsa sp.*, Son

capaces de crecer heterótrofos, una propiedad que permite la aplicación de tratamiento de aguas residuales. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la influencia de la relación de vinaza C / N en la producción de biomasa por *Aphanocapsa* sp. Los resultados indican que el cultivo heterotrófico de cianobacteria de vinaza con una amplia gama de relación carbono / nitrógeno es factible. Las tasas de crecimiento específico máximas más altas se obtuvieron para la relación C / N 5 y 40 años, aunque la condición "de carbono más disponible" permitió un crecimiento equilibrado de los microorganismos.

PALABRAS CLAVE

Las cianobacterias; vinaza; *Aphanocapsa*; relación C / N; aguas residuales.

1 INTRODUCTION

The large-scale production of microalgae and cyanobacteria has been studied for decades because of the diversity of metabolites and obtained products, such as whole biomass, dietary supplements, lipids, enzymes, polymers, toxins and pigments, as well as its application in wastewater treatment processes. In this sense, the approach of heterotrophic cultivation of this microorganism, preferably photosynthetic, have as objective the two major deficiencies of autotrophic processes with luminosity, i.e., it allows the use of any conventional bioreactor and improve biomass yields (Perez-Garcia et al., 2011). In heterotrophic cultivation, some strains of microalgae and/or cyanobacteria grow without light sources, with simple organic molecules available such as glucose, acetate and organic acids (Fay, 1983; Queiroz et al., 2007; Bastos et al.,

2014.). Cyanobacteria are prokaryotic microorganisms able to perform oxygenic photosynthesis similarly to higher plants and vegetables. *Aphanocapsa sp.* are unicellular cyanobacteria capable of photoheterotrophic growth, a property that allows the application of wastewater treatment (Bullerjahn et al., 1985).

Vinasse is the main wastewater generated from alcoholic solution distillation after ethanol fermentation (Parnaudeau et al., 2008). Therefore, inevitably, it is a by-product of the production of ethanol, whose raw materials most commonly used in Brazil is the broth of sugarcane juice, molasses or mixing ratios. Currently, ethanol-fermentation methods generate about 10 L of vinasse per liter of ethanol. From the biochemical point of view, vinasse can be regarded as a nutrient broth, may be utilized as a fertilizer, in the extraction of components, drying and use as a feed supplement and in aerobic and anaerobic cultures. Despite the potential of vinasse due to its nutrient composition, few studies address the use of this wastewater as a substrate for the cultivation of microorganisms (Macedo, 1991; Navarro, 2000; Oliveira, 1988; Bonini, 2012; Mattos and Bastos, 2015). In all the cases, the great variability in the composition of the wastewater should be noted, depending on the means of fermentation employed. Therefore, it is necessary to evaluate this effluent as a culture medium considering these variations, especially regarding the carbon-nitrogen ratio (C/N ratio), since this parameter may influence both the growth of microorganisms in the composition the biomass obtained.

In this study, the influence of vinasse C/N ratio in the biomass production by *Aphanocapsa sp.*

2 MATERIAL AND METHODS

The vinasse was collected at a sugarcane processing industry in the city of Araras, state of São Paulo, Brazil, directly after ethanol distillation at 96°C, fractionated in 2 L bottles at approximately 80°C in the Applied Microbiology Laboratory (LABMAC) of the Center of Agricultural Sciences (CCA) of the Federal University of São Carlos (UFSCar). Previous experiments with a volume of vinasse was subjected to centrifugation at 1260 xg/20min and sterilization by autoclaving at 121°C for 20 minutes and the pH adjusted to 7.6.

C/N ratio of vinasse was estimated by the ratio between carbon and nitrogen given TOC - LCPN SHIMADZU®, i.e., the original value in the collected samples was adjusted to different C/N ratios with addition of glucose or sodium nitrate.

The strain of *Aphanocapsa sp.* was propagated in BGN medium (Ripka et al., 1979) in a TECNAL® TE-402 photoperiod chamber at 25°C, 12 hours photoperiod (light and dark) and luminous flux of about 45 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Cell concentration was obtained gravimetrically after filtration of a known volume of 0.22 microns filter (APHA, 2005).

Experiments set up with original C/N ratio of vinasse (about 20), and adjusted at 5 and 40 in 125 mL Erlenmeyer's Flasks with 25 mL broth, 25°C, inoculum of 300 mg L⁻¹ in orbital shaker TECNAL® TE-420 at 150 rpm and considering the initial value after 24 hours. The dried cell mass was obtained gravimetrically after filtration of a known volume filter with 0.22 microns porosity. Furthermore, we monitored the cell count MOTIC® BA 210 TL microscope. The amount of total carbon and nitrogen in the medium were determined on SHIMADZU® TOC-LCPN, and maximum specific growth velocity ($\mu_{\text{máx}}$) was determined by the slope of the exponential phase in semi-logarithmic growth curves.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the growth curves for cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. at 5, 20 and 40 C/N ratio of vinasse. Profiles indicate maximum cell concentration in the lower C/N ratio (1870 mg L⁻¹ in 24 hours), i.e., the condition of greater availability of nitrogen to carbon, suggesting the importance of this nutrient. In these conditions, we obtained the highest value of μ_{max} (0.09 h⁻¹) compared with 0.05 h⁻¹ at C/N 20, and 0.08 h⁻¹ at C/N 40, even though the values are very close.

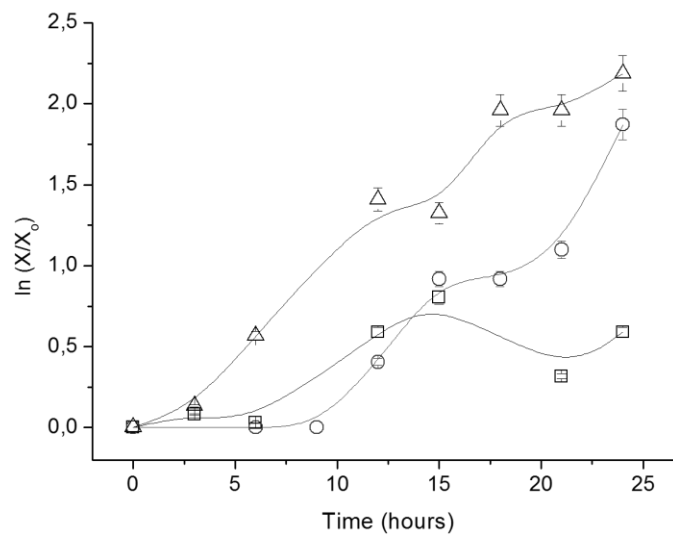


Figure 1. Growth curves for *Aphanocapsa* sp. at vinasse C/N ratio 5 (Δ), 20 – original (\square) and 40 (\circ)

Figure 2 presents C/N ratio monitoring at different conditions. Results indicate that the C/N ratio was 40, a similar cell growth at lower C/N ratio (5), but that the development of microorganisms has been balanced, considering that the C/N ratio was kept substantially constant during 24 hours. The trend of increased C/N ratio for the other conditions suggests the need for a larger amount of the carbon support heterotrophic growth of these cyanobacteria. Thus, the adjustment ratio C/N for growth of this cyanobacterium would be important to vinasse. Anyway, the results indicate the feasibility of heterotrophic cultivation of cyanobacteria *Aphanocapsa* sp. in vinasse within a wide range of C/N ratio, which is interesting from the point of view of industrial application.

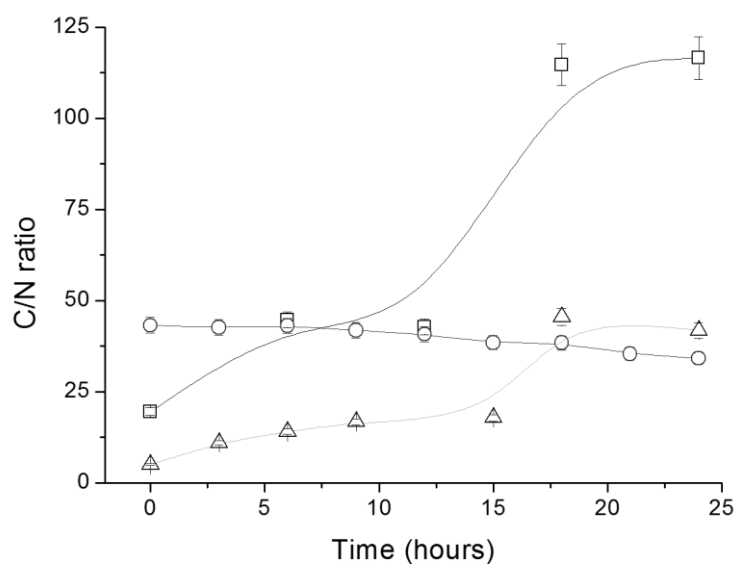


Figure 2. Profiles of C/N ratio of vinasse during *Aphanocapsa* growth at initial values 5 (Δ), 20 – original (\square) and 40 (\circ)

4 CONCLUSIONS

In the experimental conditions, we concluded that the heterotrophic cultivation of cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. from vinasse with a wide range of carbon/nitrogen ratio is feasible. The highest maximum specific growth rates were obtained for C/N ratio 5 and 40, although the condition “more available carbon” has allowed a balanced growth of microorganisms.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CAPES, CNPq and BNDES/FUNTEC for the financial support.

6 REFERENCES

- APHA - American Public Health Association, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21^a ed. Washington: AWWA/APHA/WEF.
- Bastos, R.G., Bonini, M. a., Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Queiroz, M.I., 2014. Treatment of rice parboiling wastewater by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli with potential for biomass products. Desalin. Water Treat. 1–7.

- Bonini, M. A., 2012. Cultivo de *Aphanotece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça. Dissertação Mestrado em Agricultura e Ambiente. Universidade Federal de São Carlos, 112p.
- Bullerjahn, G. S., Riethman, H.C., Sherman, L.A., 1985. Organization of the thylakoid membrane from the heterotrophic cyanobacterium *Aphanocapsa* 6714. *Biochimica et Biophysica Acta* 810, 148–157.
- Fay, P. (1983) *The blue-greens (Cyanophyta-cyanobacteria)*. Ed. Edward Arnold Publishers, 5^a ed., London, 88p.
- Macedo, R.V.T., 1991. Estudo da utilização do vinhoto como substrato para o crescimento de leveduras e bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 151p.
- Navarro, A.R.; Sepúlveda, M.C.; Rubio, M.C., 2000., Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management*, v.20, p.581-585.
- Oliveira, H.T., 1988. Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* CCAP-211/11b. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil.
- Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazevieuille, P., Recous, S., 2008. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresour. Technol.* 99, 1553–62.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11–36.

Queiroz, M.I., Lopes, E.J., Zepka, L.Q., Bastos, R.G., Goldbeck, R., 2007. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresour. Technol.* 98, 2163–9.