

Produção de biomassa de *Aphanothece microscopica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de Glicose

Biomass production by *Aphanothece microscopica* and *Chlorella vulgaris* in heterotrophic growth from glucose

Monica de Albuquerque Bonini¹; Reinaldo Gaspar Bastos²

Resumo

Microalgas e cianobactérias são microrganismos preferencialmente fotossintetizantes, no entanto algumas linhagens possuem a capacidade de se desenvolver no escuro, a partir do consumo de moléculas orgânicas simples, como glicose, acetato e glicerol. Nestes tipos de cultivos, denominados mixotróficos e heterotróficos, glicose é a fonte de carbono mais comumente utilizada, entretanto, informações quanto à concentração ideal para o crescimento ótimo dos microrganismos são ainda dispersas e não permitem alcançar uma conclusão definitiva. Este trabalho teve por objetivo explorar o estudo do cultivo heterotrófico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli e da microalga clorofícea *Chlorella vulgaris* Beyerink a partir de glicose, visando a usufruir do metabolismo versátil destes microrganismos no tratamento de águas residuárias agroindustriais. Ensaios foram conduzidos primeiramente em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose em sistema mixotrófico. Na melhor condição de crescimento (12,5 e 25 g L⁻¹, para *C. vulgaris* e *A. microscopica*, respectivamente), avaliou-se o cultivo em sistema puramente heterotrófico, obtendo-se velocidades específicas de crescimento máximas de 0,09 e 0,089 h⁻¹ e remoções de 30,4% e 42% de glicose, para a cianobactéria e a clorofícea, respectivamente, demonstrando viabilidade do cultivo de ambas as espécies nestas condições.

Palavras-chave: Microalgas. Cianobactérias. Cultivo. Carbono orgânico.

Abstract

Microalgae and cyanobacteria are preferentially photosynthetic microorganisms, however some strains can to develop in the dark by the consumption of simple organic molecules, such as glucose, acetate and glycerol. In these systems, known as mixotrophic and heterotrophic, glucose is the most commonly used carbon source. There is little information in the literature about the carbon source concentration required for optimal metabolic growth. Thus, this study aimed to explore the heterotrophic cultivation of cyanobacteria *Aphanothece microscopica* Nägeli and chlorophyceae microalgae *Chlorella vulgaris* Beyerink from glucose, in order to apply the versatile metabolism of these microorganisms in the agro-industrial wastewater treatment. Experiments were set up initially in the culture medium with different glucose concentrations in mixotrophic systems. In the best condition for growth (12.5 and 25 g L⁻¹ for *C. vulgaris* and *A. microscopica*, respectively) were evaluated the typically heterotrophic cultivation system, resulting in maximum specific growth rate of 0.09 and 0.089 h⁻¹ and glucose removal of 30.4% and 42% by the Cyanobacteria and Chlorophyceae, respectively. The results demonstrated the possibility of cultivation of both species under heterotrophic cultures.

Keywords: Microalgae. Cyanobacteria. Cultivation. Organic carbon.

¹Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil. E-mail: monicabonini@ig.com.br

²Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil. E-mail: reinaldo@cca.ufscar.br

Introdução

Até poucos anos, em ficologia aplicada o termo microalga referia-se às algas microscópicas *stricto sensu*, e também às bactérias fotossintéticas oxigênicas, ou seja, cianobactérias (TOMASELLI, 2004). Assim, “microalgas” representavam tanto organismos eucarióticos, como as algas verdes (Chlorophyta) e diatomáceas (Bacillariophyta), quanto procarióticos (Cyanophyceae) (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Entretanto, a evolução de técnicas moleculares e de microscopia eletrônica levou à alteração do termo comum Cyanophyceae para Cyanobacteria, e estes microrganismos, atualmente, são classificados como bactérias (KOMÁREK; HAUER, 2011).

O interesse para estes dois grupos distintos de microrganismos fotoautotróficos reside no potencial de utilização da biomassa para as mais variadas aplicações, como alimentação humana e animal, além da produção de metabólitos secundários úteis (HARUN et al., 2010; SPOLAORE et al., 2006). Além disso, alguns gêneros têm-se mostrado potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias, pois possuem a habilidade de remover matéria orgânica e nutrientes de efluentes, incorporando-os à biomassa (BASTOS et al., 2004; DE-BASHAN; BASHAN, 2010; QUEIROZ et al., 2007).

A utilização de microalgas e cianobactérias no tratamento de águas residuárias vêm sendo estudada, devido aos baixos custos envolvidos, quando esse procedimento é comparado aos sistemas convencionais de tratamento de efluentes. Além disso, soma-se a esta vantagem a valoração dos resíduos, com possibilidade de se obter uma biomassa passível de ser utilizada na fertilização dos solos, na forma de proteínas unicelulares ou na obtenção de biocombustíveis (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; TAM; WONG, 2000). Contudo, essa aplicação encontra limitações, principalmente devido ao custo das condições autotróficas, além da turbidez característica

das águas residuárias agro-industriais, que não permite penetração da luz de forma homogênea no sistema de cultivo (HEREDIA-ARROYO et al., 2011). Entretanto, a literatura reporta que, embora sejam organismos naturalmente fotossintetizantes, algumas linhagens de microalgas e cianobactérias apresentam a distinta capacidade de se desenvolver na ausência de luz: por meio dos metabolismos mixotrófico ou heterotrófico, elas consomem moléculas orgânicas solúveis, tais como acetato, ácidos orgânicos e açúcares (BASTOS et al., 2004; BASTOS et al., 2011; DE-BASHAN; BASHAN, 2010; DUMAS et al., 1998; FAY, 1992; JACOB-LOPES et al., 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Os termos mixotrófico e heterotrófico apresentam uma diferença particular na fonte de energia necessária para suportar o crescimento e a produção de metabólitos específicos pelos microrganismos. Assim, heterotrofia pode ser definida como a utilização somente de compostos orgânicos como fonte de carbono e de energia, possibilitando o aumento da concentração de biomassa e sua produtividade. Já o termo mixotrofia é definido como um processo metabólico em que a fotossíntese é a principal fonte de energia, embora a presença de compostos orgânicos seja essencial. Neste caso, o organismo é capaz de assimilar compostos orgânicos como fonte de carbono enquanto utiliza compostos inorgânicos como doadores de elétrons (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A habilidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono aumentou o interesse nas relações entre fotossíntese e respiração de microalgas e cianobactérias. A maioria das cianobactérias utiliza o período escuro para ajuste da fotossíntese e dos mecanismos de biossíntese para uma posterior fase ativa na presença de luz. A glicose do meio de cultivo pode ser convertida em glicose 6-fosfato e metabolizada via respiratória. No entanto, algumas enzimas do Ciclo de Krebs são detectadas com atividades extremamente

baixas e o metabolismo no escuro está ligado à presença de oxigênio, sendo que a principal rota é a via das pentoses fosfato (ARDELAN; ZARNEA, 1998; FAY, 1983). Assim, pode-se utilizar a capacidade de esses microrganismos crescerem heterotroficamente na ausência de luz e substituírem a fixação do CO₂ atmosférico que ocorre nas culturas autotróficas por uma fonte de carbono orgânico dissolvido no meio de cultura, como uma alternativa interessante (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Acetato e glicose são as fontes de carbono mais utilizadas para cultivos mixotrófico e heterotrófico de microalgas e cianobactérias, tanto em pesquisa quanto em escala comercial (SHI et al., 1999). Entretanto, as informações acerca da concentração inicial destas fontes de carbono necessárias para o crescimento ideal dos microrganismos são ainda muito dispersas (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Chlorella vulgaris Beyerink, uma Chloroficeae de água doce, é uma das microalgas mais estudadas no tratamento de água residuárias (ASLAN; KAPDAN, 2006; GONZÁLES; CANIZARES; BAENA, 1997; KIM et al., 2010). Já *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma Cyanobacteria de grande aplicação na valoração de resíduos agroindustriais no sul do Brasil, reconhecida pelo seu elevado teor protéico e pelo potencial de remoção de matéria orgânica de efluentes agroindustriais em cultivos heterotróficos (BASTOS et al., 2004; BASTOS et al., 2010; FRANCO, 2008; JACOB-LOPES; SCOPARO; MANETTI, 2008; QUEIROZ et al., 2007; QUEIROZ et al., 2011).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi selecionar uma concentração de glicose ideal para o desenvolvimento da microalga *C. vulgaris* e da cianobactéria *A. microscopica* e, posteriormente, a viabilidade do cultivo heterotrófico de ambas espécies, avaliando o crescimento e o consumo de glicose do meio. Assim, a hipótese de trabalho é que as espécies *A. microscopica* e *C. vulgaris* são passíveis de cultivo heterotrófico, com consumo da glicose como única fonte de carbono.

Material e Métodos

Os inóculos da cianobactéria *Aphanothece microscopica* e da microalga *Chlorella vulgaris* foram mantidos e propagados no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/CCA/UFSCar), em estufa a 25°C e fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro, com densidade de fluxo luminoso de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). *A. microscopica* foi mantida em meio padrão BGN (Braun-Grunow Medium) (RIPKA et al., 1979), enquanto para *C. vulgaris* utilizou-se o meio WC (Water Culture) (GUILLARD; LORENZEN, 1972).

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de meio de cultura (BGN ou WC, para *A. microscopica* e *C. vulgaris*, respectivamente), 10% v/v de inóculo (10^6 cel mL⁻¹) e glicose.

Inicialmente, foi selecionada a melhor condição de crescimento para os microrganismos, através da adição de diferentes concentrações de glicose (0; 12,5; 25; 37,5 e 50 g L⁻¹) aos meios de cultivo em ensaios mixotróficos. Os frascos foram mantidos a 25°C, fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro), com densidade de fluxo luminoso de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e aeração forçada de 1 VVM (volume de ar por volume de líquido por minuto) durante aproximadamente 75 horas. Em seguida, procedeu-se aos cultivos sob condições heterotróficas (ausência de luz), com cultivo dos microrganismos durante 40 horas em meio suplementado, com a condição otimizada de glicose previamente selecionada nos ensaios mixotróficos, 25°C e aeração forçada de 1 VVM.

Nos cultivos mixotróficos, monitorou-se a concentração celular por contagem direta das células em microscópio utilizando Câmara de Neubauer. As velocidades específicas de crescimento (μh^{-1}) foram determinadas pela inclinação do ajuste linear das curvas semi-logarítmicas concentração celular vs. tempo. O efeito da concentração de glicose foi avaliado pelos Modelos de Monod (Equação 1) e de

Haldane (Equação 2), onde S é a concentração de glicose (g L^{-1}), k_s a constante de saturação de Monod (g L^{-1}) e k_i a constante de inibição (g L^{-1}). A concentração ótima de substrato (S_{mi}) foi calculada considerando os efeitos de inibição pelo substrato a partir da Equação 3, conforme proposto por Shi et al. (1999).

Nos cultivos heterotróficos, as amostras foram coletadas a aproximadamente cada 4 horas para monitoramento e análise dos perfis de biomassa e substrato. Da mesma forma que nos ensaios mixotróficos, a concentração celular foi obtida por contagem das células em microscópio utilizando Câmara de Neubauer, obtendo-se as velocidades específicas de crescimento pela inclinação do ajuste linear das curvas semi-logarítmicas concentração celular vs. tempo. Em seguida, as amostras foram passadas por filtros de $0,22 \mu\text{m}$ para separação da biomassa e o filtrado foi avaliado quanto ao teor de glicose por meio do método enzimático glicose oxidase-peroxidase, utilizando kit Laborlab® e seguindo as especificações do fabricante.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{k_s + S} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{k_s + S + \frac{S^2}{k_i}} \quad (\text{Equação 2})$$

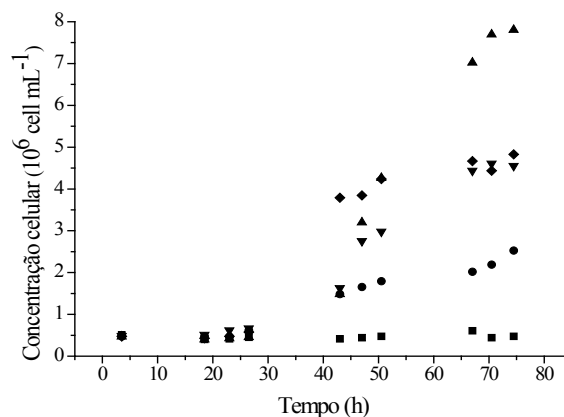
$$S_{mi} = \sqrt{k_s k_i} \quad (\text{Equação 3})$$

Resultados e Discussões

Durante o período escuro, o crescimento de microalgas e cianobactérias é suportado pelo consumo de moléculas orgânicas simples, sendo condicionado ao tipo de substrato e a espécie de microrganismo (FAY, 1983; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Assim, a adição de moléculas orgânicas, como glicose, ácidos orgânicos ou glicerol, pode ser utilizada como estratégia para se obter elevada concentração celular durante os cultivos mixotróficos e heterotróficos destes microrganismos, tornando viável a produção de biomassa em grande escala (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

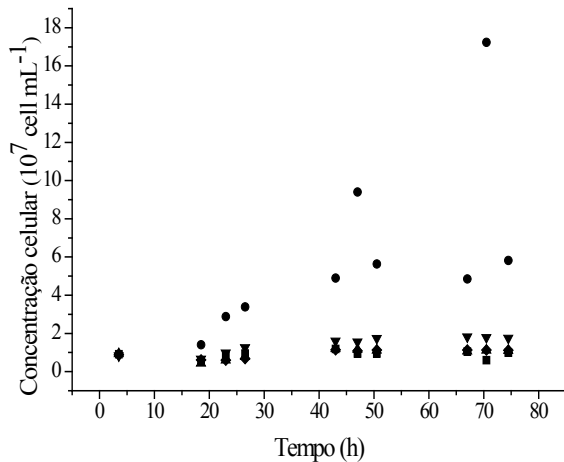
As Figuras 1 e 2 apresentam os perfis das concentrações celulares da cianobactéria *Aphanothece microscopica* e da clorofícea *Chlorella vulgaris* cultivadas em meios BGN e WC, respectivamente, suplementados com diferentes concentrações de glicose.

Figura 1 - Perfis de biomassa de *Aphanothece microscopica* em cultivo mixotrófico em meio suplementado com diferentes concentrações de glicose (■ = 0; ● = 12,5; ▲ = 25; ▼ = 37,5 e ◆ = 50 g L^{-1}).



Fonte: Autores.

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



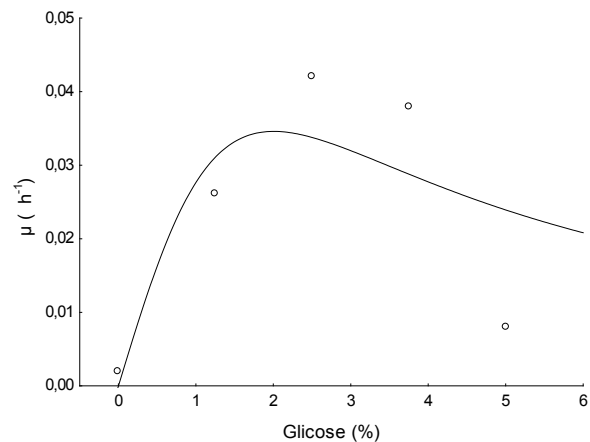
Fonte: Autores.

Os dados indicam perfis característicos de crescimento microbiano em batelada, sugerindo a viabilidade do cultivo de ambas as espécies nessas condições. Os meios BGN e WC não apresentam nenhuma fonte orgânica de carbono, de modo que a adição de glicose é interessante para manter o metabolismo dos microrganismos durante o período de escuro. De fato, verifica-se crescimento mais acentuado nos ensaios com adição de glicose do que nos experimentos em que não se adiciona substrato ao meio. Em culturas mixotróficas, a adição de substratos orgânicos resulta em aumento na taxa de crescimento (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004), uma vez que a incorporação do substrato ocorre durante o período de escuro. Nessas condições, a principal via metabólica do catabolismo da glicose é o ciclo das pentoses-fosfato pela glicose 6-fosfato desidrogenase, com síntese de transportadores específicos de prótons e hexose

(PEREZ-GARCIA et al., 2011).

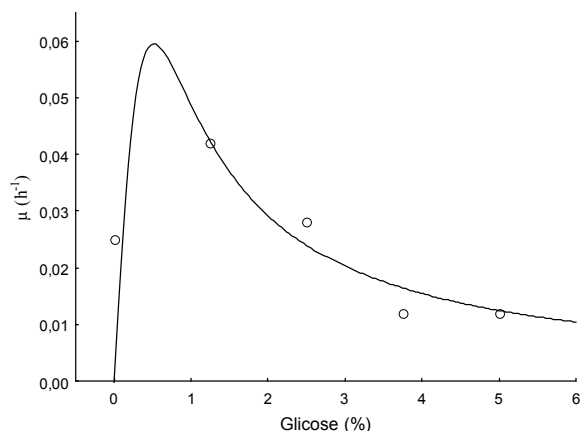
Para ambas as espécies, a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi de 0,042 h⁻¹, refletindo num tempo de geração de 16,5 h. Para *A. microscopica*, $\mu_{\text{máx}}$ foi observada quando se utilizou a concentração intermediária de glicose (25 g L⁻¹), enquanto para *C. vulgaris* este valor ocorreu na concentração 12,5 g L⁻¹ de glicose. A partir destas concentrações ótimas, os resultados demonstram inibição pelo substrato (Figuras 3 e 4). De fato, altas concentrações de glicose têm-se mostrado inibitórias para o crescimento de microalgas e cianobactérias, conforme reportado na literatura (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; PEREZ-GARCIA et al., 2011; SHI et al., 1999; YAN et al., 2011).

Figura 3 - Ajuste da velocidade específica de crescimento de *Aphanothece microscopica* pelo modelo de Haldane.



Fonte: Autores.

Figura 4 - Ajuste da velocidade específica de crescimento de *Chlorella vulgaris* pelo modelo de Haldane.



Fonte: Autores.

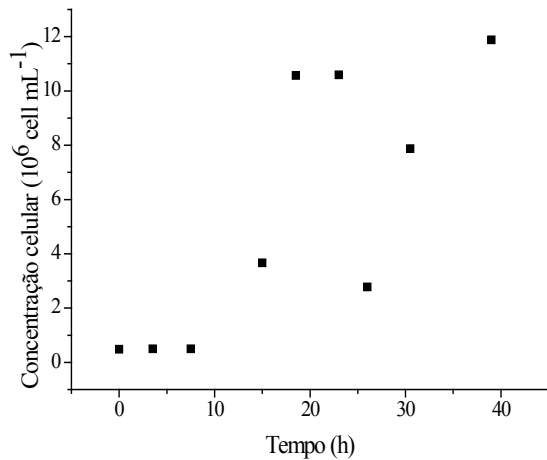
De acordo com Perez-Garcia et al. (2011), informações acerca da concentração ideal de glicose para o crescimento ideal de microalgas e cianobactérias são ainda dispersas para se alcançar uma conclusão definitiva, e a resposta está relacionada a uma combinação específica de fatores, como condições de cultivo e tipo de microrganismo. A avaliação do efeito da fonte de carbono no cultivo mixotrófico ou heterotrófico de cianobactérias e microalgas é objeto de estudos recentes na literatura. Ainda assim, a melhor condição encontrada para a cianobactéria (25 g L⁻¹ de glicose) corrobora com os resultados obtidos por Bastos et al. (2011) em ensaios heterotróficos com *Aphanothece microscopica* a partir de 2,5 e 10% de glicose. Também Liang; Sarkany e Cui (2009), trabalhando com *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico, verificaram que a adição de 1 e 2% de glicose ao meio de cultivo proporcionou melhor crescimento do que 5 e 10%, sugerindo 1% como a concentração ideal a ser utilizada para se obter elevada produtividade de biomassa e lipídios pela microalga. A velocidade específica de crescimento máxima obtida nos ensaios com *A. microscopica* e *C. vulgaris* ($\mu_{\text{máx}} = 0,042 \text{ h}^{-1}$) foi inferior às observadas por Heredia-Arroyo et al. (2011) em cultivo mixotrófico

de *C. vulgaris* com concentrações iniciais de 5, 15 e 30 g L⁻¹ de glicose ($\mu_{\text{máx}} = 0,13; 0,13$ e $0,12 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Entretanto, esses autores utilizaram um meio de cultura mais rico, contendo, além dos minerais inorgânicos e da fonte de carbono, extrato de levedura. Por outro lado, $\mu_{\text{máx}} = 0,042 \text{ h}^{-1}$ é superior à velocidade específica de crescimento máxima observada por Yan et al. (2011) durante o cultivo da cianobactéria *Synechococcus sp.* a partir de 4 g L⁻¹ de glicose ($\mu_{\text{máx}} = 0,025 \text{ h}^{-1}$) e semelhante às observadas por Shi et al. (1999) durante o cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides* em meio suplementado com 10 e 40 g L⁻¹ de glicose ($\mu_{\text{máx}} = 1,10$ e $1,14 \text{ d}^{-1}$, respectivamente).

Considerando os dados apresentados nas Figuras 3 e 4, o perfil das velocidades específicas de crescimento de ambas espécies pode ser descrito pelo Modelo de Haldane. No caso da *Aphanothece microscopica*, a concentração ótima de glicose, ou seja, sem efeitos de inibição, foi de 24,48 g L⁻¹, valor muito próximo ao experimental. Até 37,5 g L⁻¹, a curva seguiu a cinética de Monod, com constante de saturação de 11 g L⁻¹. Da mesma forma, para *Chlorella vulgaris*, a concentração ótima de glicose foi de 5,2 g L⁻¹. Os dados são comparáveis aos obtidos por Shi et al. (1999) em ensaios com diferentes concentrações de glicose utilizando-se a microalga *C. protothecoides*. Entretanto, estes autores indicam 40 g L⁻¹ como a concentração inicial de glicose ideal, havendo também para esta microalga uma inibição pelo substrato estimada pela Equação de Haldane. Segundo Chen (1996), o efeito inibitório de substratos orgânicos resulta não somente no decréscimo da velocidade de crescimento, mas também na diminuição do rendimento total do crescimento celular, uma vez que é necessário aumentar a energia de manutenção das células, em detrimento do crescimento.

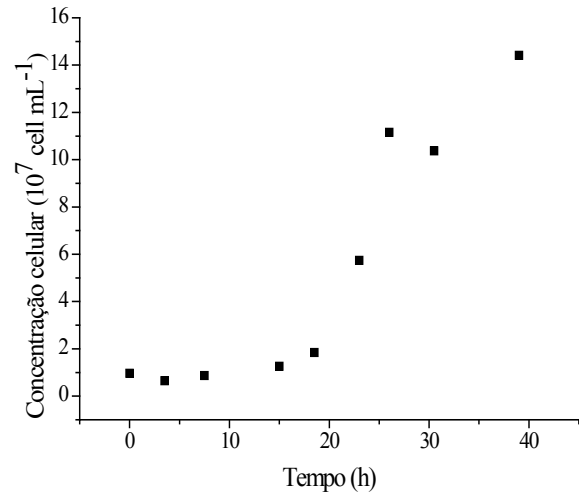
As Figuras 5, 6, 7 e 8 apresentam as variações de biomassa e glicose da *A. microscopica* e da *C. vulgaris* cultivadas em meio BGN e WC suplementados com 25 g L⁻¹ e 12,5 g L⁻¹ de glicose, respectivamente, sob condições heterotróficas.

Figura 5 - Variação de biomassa durante cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* em meio suplementado com 25 g L⁻¹ de glicose.



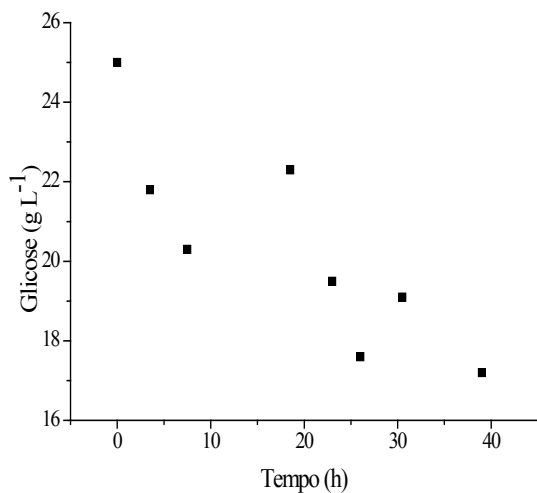
Fonte: Autores.

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



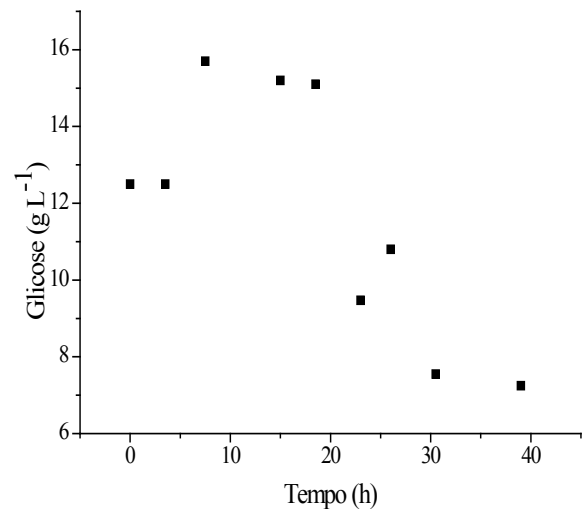
Fonte: Autores.

Figura 6 - Variação de glicose durante cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* em meio suplementado com 25 g L⁻¹ de glicose.



Fonte: Autores.

Figura 8 - Variação de glicose durante cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em meio suplementado com 12,5 g L⁻¹ de glicose.



Fonte: Autores.

Pelo perfil das curvas, verifica-se a assimilação de glicose por ambas as espécies de microrganismos quando cultivadas sob condições heterotróficas. Nessas condições, a velocidade específica de crescimento máxima da cianobactéria foi de $0,09\text{h}^{-1}$, refletindo num tempo de geração de 7,7 h. Para a mesma concentração de glicose (25 g L^{-1}), a velocidade específica de crescimento no cultivo heterotrófico foi superior à do cultivo mixotrófico ($0,042\text{ h}^{-1}$). Um comportamento semelhante foi verificado para *C. vulgaris*, com $\mu_{\text{máx}} = 0,089\text{ h}^{-1}$, superior ao verificado no cultivo mixotrófico. A luminosidade é o parâmetro que mais influencia a assimilação de glicose, uma vez que a luz inibe a expressão do sistema de transporte de elétrons e hexoses. Assim, os dados indicam a viabilidade do cultivo de ambos os microrganismos em condição não dependente da luminosidade. De fato, é possível atingir altas velocidades específicas de crescimento e obter altas densidades de células de microalgas e cianobactérias em sistemas heterotróficos, tornando viável o processo de produção de biomassa em grande escala (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Sob condições heterotróficas, a glicose é metabolizada principalmente pela via das pentoses-fosfato, enquanto a via Embden-Meyerhof é utilizada na presença de luz. Ambas as vias são funcionais em células de microalgas e cianobactérias, contudo, a via das pentoses-fosfato pode ter uma maior taxa de fluxo do que a Embden-Meyerhof (PEREZ-GARCIA et al., 2011), o que explicaria a maior velocidade de crescimento dos microrganismos quando cultivados heterotroticamente na presença de glicose. Neste sentido, Yang; Hua e Shimizu (2000), trabalhando com a microalga *Chlorella pyrenoidosa*, verificaram que o cultivo heterotrófico gerou mais ATP a partir do fornecimento de glicose do que cultivos autotróficos e mixotróficos a partir de energia fornecida pela luz.

Embora as velocidades específicas de crescimento máximas tenham sido semelhantes para ambos microrganismos, o consumo de glicose pela *Aphanothece microscopica* foi mais acelerado nas primeiras 10 horas de cultivo, ocorrendo mais lentamente para *Chlorella vulgaris*. Para ambas

as espécies, no entanto, não houve esgotamento do substrato, com reduções de 30,4 e 42% para a cianobactéria e a clorofícea, respectivamente, ao fim de 40 horas de cultivo. Esta informação difere de Sansawa e Endo (2004), os quais avaliaram o cultivo heterotrófico de *Chlorella regularis* em meio contendo $1,5\text{ g L}^{-1}$ de glicose, observando consumo total do substrato em 6 horas de cultivo e Liang; Sarkany e Cui (2009) que, trabalhando com cultivo mixotrófico de *Chlorella protothecoides*, observaram depleção total do substrato quando o meio foi suplementado com concentrações de 5 e 15 g L^{-1} de glicose em 48 e 144 horas, respectivamente. Os resultados obtidos para *A. microscopica* e *C. vulgaris* sugerem que, ao se utilizar concentrações superiores de glicose, o tempo de cultivo de 40 horas é insuficiente para consumo total do substrato. De fato, Shi et al. (1999), utilizando concentrações de 10 e 60 g L^{-1} de glicose no cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, observaram esgotamento da glicose apenas após seis dias de cultivo.

Considerando a aplicação destes microrganismos no tratamento de águas residuárias, Lim; Chu e Phang (2010) e Feng; Li e Zhang (2011), trabalharam com *Chlorella vulgaris* em águas residuárias distintas. Os primeiros, utilizando água residuária oriunda de uma indústria têxtil, observaram, além da remoção de cor, remoções de 62% de DQO, 43% de N-NH_4 e 33% de P-PO_4^{3-} . Já Feng, Li e Zhang (2011) verificaram remoções de 86% de DQO, 97% de N-NH_4 e 96% do fósforo total de uma água residuária sintética. Além deles, Queiroz et al. (2007) verificaram que a máxima remoção de matéria orgânica (DQO) e nitrogênio total (83,44% e 72,74%, respectivamente) do efluente da parboilização do arroz por cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* ocorria após 15 horas de cultivo. Também Silva et al. (2005) observaram remoções de 42,1% de DQO e 58,5% de nitrogênio total em efluente de beneficiamento de milho e de 53,7% de DQO e 73,2% de nitrogênio total em efluentes de beneficiamento de pêssego e figo, após 24 horas. Os resultados desses autores indicam que ocorre consumo mais satisfatório da fonte de carbono

por cianobactérias em meios mais complexos, como efluentes industriais, do que quando se utilizam meios de cultivo padrão. Isso se deve, possivelmente, à presença de outros nutrientes e da relação carbono-nitrogênio dos efluentes, que contribuem para crescimento satisfatório dos microrganismos.

Conclusões

Nas condições experimentais, foram selecionadas as concentrações de 12,5 e 25 g L⁻¹ de glicose como ideais para o crescimento mixotrófico da microalga *Chlorella vulgaris* e da cianobactéria *Aphanothece microscopica*, respectivamente, com $\mu_{\text{máx}} = 0,042$ h⁻¹ e efeito inibitório em concentrações superiores. Durante os cultivos heterotróficos, foram obtidas maiores velocidades específicas de crescimento (0,089 e 0,09 h⁻¹, para a microalga clorofícea e a cianobactéria, respectivamente) e consumo do substrato, porém sem esgotamento. Os resultados auxiliam o entendimento do cultivo heterotrófico, o qual não é convencional para microalgas e cianobactérias, sugerindo um potencial para produção de biomassa com remoção de matéria orgânica de águas residuárias agroindustriais

Referências

ARDELAN, I.; ZARNEA, G. Photosynthesis respiration interplay in cyanobacteria: fundamentals and application. In: SUBRAMANIAN, G.; KAUSHIK, B. D.; VENKATARAMAN, G. S. (Ed.) *Cyanobacterial biotechnology*. Enfield: Science Publishers, 1998. p. 103-107.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, Amsterdam, v. 28, p. 64-70, 2006.

BASTOS, R. G.; PAIVA, P. R.; RIGO, M.; VEIGA, G.; QUEIROZ, M. I. Growth of cyanobacteria *Aphanothece sp.* on exogenous sugars. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 27, n. 1, p. 156-161, 2011.

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. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 112-116, 2004.

BASTOS, R. G.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; JACOB-LOPES, 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*, Taubaté, v. 5, n. 3, p. 258-264, 2010.

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

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

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

DUMAS, A.; LALIBERTÉ, G.; LESSARD, P.; DE LA NOUE, J. Biotreatment of fish farm effluents using cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacultural Engineering*, London, v. 17, n. 1, p. 57-68, 1998.

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

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

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

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

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

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G.; DANQUAH, M. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Golden, v. 14, p. 1037-1047, 2010.

- HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, Oxford, v. 35, p. 2245-2253, 2011.
- JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; FRANCO, T. T. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing*, Lausanne, v. 47, p. 1365-1373, 2008.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F. M. Protein characterization of the *Aphanothece microscopica* Nägeli cyanobacterium cultivated in parboiled rice effluent. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, New York, v. 26, n. 2, p. 482-488, 2006.
- KIM, J.; LINGARAJU, B. P.; RHEAUME, R.; LEE, J. Y.; SIDDIQUI, K. F. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science and Technology*, Beijing, v. 15, n. 4, p. 391-396, 2010.
- KOMÁREK, J.; HAUER, T. *The on-line database of cyanobacterial genera*. Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, 2011. Disponível em: <http://www.cyanodb.cz>. Acesso em: 3 out. 2011.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CU, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, Netherlands, v. 31, p. 1043-1049, 2009.
- LIM, S-L.; CHU, W-L.; PHANG, S-M. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*, New York, v. 101, p. 7314-7322, 2010.
- MANETTI, A. G. S. *Avaliação do reúso da água residuária oriunda de uma indústria processadora de pescado utilizando Aphanothece microscopica* Nägeli. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO N. S. Microalgae for biodiesel production and others applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Golden, v. 14, p. 217-232, 2010.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, Oxford, v. 45, p. 11-36, 2011.
- QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Applied Energy*, England, v. 88, p. 3438-3443, 2011.
- QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R. G.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*, New York, v. 98, n. 11, p. 2163-2169, 2007.
- RIPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STAINER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, London, v. 111, p. 1-61, 1979.
- SANSAWA, H.; ENDO, H. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 98, n. 6, p. 437-444, 2004.
- SHI, X. M.; LIU, H. J.; ZHANG, X. W.; CHEN, F. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations. *Process biochemistry*, Barking, v. 34, p. 341-347, 1999.
- SILVA, E. B.; ISOLDI, L. A.; QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R.; PIEDRAS, S. R. N. Remoção de nutrientes em águas residuárias da indústria de conservas utilizando *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Vetor*, Rio Grande, v. 15, n. 1, p. 19-23, 2005.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.
- TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, Amherst, v. 107, p. 145-151, 2000.
- TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Culture*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 3-19.
- YAN, R.; ZHU, D.; ZHANG, Z.; ZENG, Q.; CHU, J. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus sp.* PCC7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition. *Journal of Applied Phycology*, Boston, v. 26, n. 9, 2011.
- YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 6, p. 87-102, 2000.

Recebido em 3 de novembro de 2011
Aceito em 21 de maio de 2012