

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
**HELENA RODRIGUES OLIVEIRA**

BIOFLOCULAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS COM *PELLETS* DO FUNGO  
*Aspergillus niger*

**RIO DE JANEIRO**  
**2019**

Helena Rodrigues Oliveira

BIOFLOCULAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS COM *PELLETS* DO FUNGO  
*Aspergillus niger*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadoras: Magali Christe Cammarota, D.Sc.  
Isabelli Dias Bassin, D.Sc.

Rio de Janeiro  
2019

### CIP - Catalogação na Publicação

048b Oliveira, Helena Rodrigues  
Biofloculação de cianobactérias com pellets do  
fungo *Aspergillus niger* / Helena Rodrigues  
Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2019.  
107 f.

Orientador: Magali Christe Cammarota.  
Coorientador: Isabelli Dias Bassin.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia de Processos Químicos e  
Bioquímicos, 2019.

1. Biofloculação. 2. Cianobactéria. 3.  
*Aspergillus niger*. I. Cammarota, Magali Christe,  
orient. II. Bassin, Isabelli Dias, coorient. III.  
Título.

BIOFLOCULAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS COM *PELLETS* DO FUNGO  
*Aspergillus niger*

Helena Rodrigues Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS (EPQB), ESCOLA DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS.

Aprovada por:

---

Magali Christe Cammarota, D.Sc.

---

Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.

---

Ricardo Moreira Chaloub, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Março de 2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir que eu chegasse até aqui, me concedendo as oportunidades e a saúde necessária para que mais essa etapa fosse cumprida em minha vida.

Agradeço também a minha família, por todo o apoio dado durante todo o processo. Aos meus pais, Sergio e Lúcia, por sempre terem sido exemplos de força e superação e por terem me feito a pessoa que sou hoje. Aos meus irmãos pela paciência e carinho.

Ao meu namorado Lucas, pela alegria que me dá e por ficar do meu lado em todos os momentos difíceis, acreditando em mim mesmo quando eu não consegui.

Aos meus colegas e amigos do curso de engenharia química, por toda a companhia durante os momentos felizes e tristes ao longo do curso, compartilhando dificuldades, mas também conhecimentos e memórias boas.

A todos os amigos que, sempre com palavras de conforto, ajuda e orações, me auxiliaram a superar todas as dificuldades encontradas.

Aos amigos e colegas do LTA e do LaMInd, por toda a ajuda concedida e também por todas as alegrias compartilhadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Melissa, pela disponibilização do LaMInd para a realização de algumas etapas deste trabalho.

Ao Laboratório H2CIN e à Juliana Pinto que forneceram cultivos de cianobactérias avaliadas neste estudo.

Ao professor Ricardo Chaloub, por toda a atenção e pelo auxílio na medição da intensidade luminosa.

Por fim, agradeço às minhas orientadoras, as professoras Magali e Isabelli, por todos os ensinamentos passados, toda paciência e todo o apoio que me deram no processo de realização deste trabalho.

## RESUMO

Oliveira, Helena Rodrigues. **Biofloculação de cianobactérias com pellets do fungo *Aspergillus niger***. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Um dos principais obstáculos à utilização de microalgas e cianobactérias na produção de energia renovável é a dificuldade de separação da biomassa da elevada quantidade de água nos cultivos. A floculação com fungos filamentosos é um método alternativo que pode reduzir os custos envolvidos nesta etapa. Este trabalho teve por objetivo avaliar a biofloculação de cianobactérias com pellets do fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Foi avaliada a formação de pellets do fungo em diferentes velocidades de agitação (100 e 150 rpm) e valores de pH (4,0 e 5,7), sendo escolhida a condição de pH 5,7 e 150 rpm para os demais experimentos. Estudou-se a densificação de quatro espécies de cianobactéria: *Anabaena variabilis*, *Anabaena siamensis*, *Spirulina maxima* e *Synechococcus subsalsus*. Cocultivos de *A. niger* e cianobactérias na proporção fungo:cianobactéria de 1:1 (g/g SST), a 28 °C e 100 rpm, sem reposição de matéria orgânica, resultaram em eficiências de biofloculação de 92% em 48 h com *S. maxima* e de 94% em 24 h com *S. subsalsus*. Enquanto que com *A. variabilis* e *A. siamensis* a biofloculação não ocorreu. A influência de alguns fatores sobre a eficiência de biofloculação foi estudada somente com a cianobactéria *S. subsalsus*. Verificou-se que uma concentração de cianobactéria no cocultivo duas vezes maior diminuía a eficiência de 94% para 19%. Uma maior proporção de fungo na mistura com cianobactéria (proporção fungo:cianobactéria 1:1) resultou em maior eficiência (94% contra 59% para a proporção 1:5). A reposição das concentrações de matéria orgânica (extrato de levedura e sacarose) no cocultivo aumentaram as eficiências de 59% (sem reposição) para 98% (com quase 100% de reposição) em 48 h. O cocultivo realizado em pH 6 resultou em maior eficiência (61%, na proporção 1:5, com reposição de 14% de extrato de levedura e sacarose), enquanto que em pH 3 não ocorreu biofloculação. Concentrações de biomassa de 3,2 a 62,3 vezes foram obtidas, sendo os maiores valores verificados em condições com menores eficiências (59%), mas com pellets de menor tamanho (2,5 mm). O estudo comprovou a viabilidade do método de biofloculação, no entanto mais estudos são necessários a fim de se estabelecer condições de cocultivo que permitam elevadas eficiências de biofloculação com menor crescimento dos pellets.

Palavras-chave: Biofloculação. Cianobactéria. *Aspergillus niger*.

## ABSTRACT

Oliveira, Helena Rodrigues. **Bioflocculation of cyanobacteria pellets of *Aspergillus niger***. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

One of the main hurdles of renewable energy production from microalgae and cyanobacteria is the difficulty of biomass separation from high amounts of water in cultures. Bioflocculation with filamentous fungi is an alternative method that can reduce costs involved in this step. This work aimed to evaluate the bioflocculation of cyanobacteria with pellets of filamentous fungus *Aspergillus niger*. Fungal pellet formation was assessed in different agitation rates (100 and 150 rpm) and pH values (4.0 e 5.7). Densification of four species of cyanobacteria was studied: *Anabaena variabilis*, *Anabaena siamensis*, *Spirulina maxima* e *Synechococcus subsalsus*. Coculture of *A. niger* and cyanobacteria with fungal:cyanobacterial ratio of 1:1 (g / g TSS), at 28°C and 100 rpm, without organic matter, resulted in bioflocculation efficiencies of 92% in 48 h with *S. maxima* and 94% in 24 h with *S. subsalsus*. While with *A. variabilis* and *A. siamensis* bioflocculation did not occur. The influence of some factors on the efficiency of bioflocculation was studied only with cyanobacteria *S. subsalsus*. It was found that when of cyanobacteria concentration was twice higher, efficiency decreased from 94% to 19%. A higher fungal:cyanobacterial ratio in the mixture with cyanobacteria (1:1) resulted in a higher efficiency (94% vs. 59% for 1:5 ratio). Organic matter supplementation (yeast extract and sucrose) in coculture increased efficiencies from 59% (without supplementation) to 98% (with almost 100% supplementation) in 48 h. Coculture carried out at pH 6 resulted in a higher efficiency (61%, at 1:5 ratio, with a 14% supplementation of yeast extract and sucrose), whereas at pH 3 no bioflocculation occurred. Biomass concentrations of 3.2 to 62.3 times were obtained, with the highest values being attained in conditions with lower efficiencies (59%), but with smaller pellets (2.5 mm). The study proved the feasibility of this bioflocculation method. However, more studies are necessary to establish coculture conditions that allow high bioflocculation efficiencies with lower pellet growth.

Keywords: Bioflocculation. Cyanobacteria. *Aspergillus niger*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Imagens microscópicas das espécies estudadas: <i>Anabaena variabilis</i> , com os heterocistos destacados (A), <i>Anabaena siamensis</i> , apenas células vegetativas, sem heterocistos (B), <i>Spirulina máxima</i> (C) e <i>Synechococcus sp.</i> (D). .....	16
Figura 2.2: Morfologia macroscópica (A) e microscópica (B) do fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	19
Figura 2.3: Comparação de métodos de densificação de biomassas algáceas, agrupados em métodos físicos, químicos e biológicos. ....	28
Figura 2.4: Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de <i>pellets</i> de microalga e fungo.....	29
Figura 2.5: Talo do líquen .....	29
Figura 3.1: Sequência de procedimentos utilizados no estudo de biofloculação de biomassas de cianobactéria com o fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	39
Figura 3.2: Aspecto macroscópico do fungo <i>Aspergillus niger</i> utilizado nos experimentos.....	40
Figura 4.1: Efeito da velocidade de agitação e pH nos <i>pellets</i> do fungo <i>Aspergillus niger</i> , cultivado a 28 °C: com pH inicial 5,7 e rotação de 150 rpm (A) e 100 rpm (B); e com pH inicial 4,0 e rotação de 150 rpm (C) e 100 rpm (D). ....	53
Figura 4.2: Curvas de crescimento <sup>1</sup> do fungo <i>Aspergillus niger</i> em meio à base de extrato de levedura e sacarose, a 28°C e 150 rpm, com cultivos iniciados em dias diferentes (A e B).....	55
Figura 4.3: Imagens de MEV dos <i>pellets</i> de <i>A. niger</i> com tempos de cultivo de 24 h – aumento de 2120 x (A), 48 h – com aumento de 2040 x (B) e 72 h – com aumento de 3650 x (C).....	58
Figura 4.4: Cocultivo da cianobactéria <i>A. siamensis</i> com o fungo <i>A. niger</i> (na proporção 1:1 g/g SST) no tempo 0 (A) e após 24 h a 28°C/100 rpm (B). .....	60
Figura 4.5: Cocultivo de <i>Anabaena variabilis</i> com <i>Aspergillus niger</i> (na proporção 1:1 g/g SST) no tempo 0 (A) e após 24 h (B) a 28°C e 100 rpm, e aparência dos <i>pellets</i> após 48 h (C). ....	62
Figura 4.6: Cocultivo de <i>Synechococcus subsalsus</i> e <i>A. niger</i> (na proporção 1:1 g/g SST) no primeiro teste (concentração inicial = 0,738 g/L) no tempo 0 (A) e após 24 h a 28°C e 100 rpm (B).....	64
Figura 4.7: Cocultivo de <i>Synechococcus subsalsus</i> e <i>A. niger</i> (na proporção 1:1 g/g SST) no segundo teste (concentração inicial = 0,345 g/L) no tempo 0 (A) e após 24 h (B e C) a 28°C e 100 rpm. ....	64
Figura 4.8: Cocultivo de <i>Spirulina maxima</i> e <i>Aspergillus niger</i> (na proporção 1:1 g/g SST) após 24 h (A) e 48 h (B) a 28°C e 100 rpm. ....	65
Figura 4.9: Crescimento da cianobactéria <i>Synechococcus subsalsus</i> em diferentes cultivos em meio BG-11 a 23°C e 150 rpm e fotoperíodo de 12 h (43 µmol fótons/m <sup>2</sup> .s). ....	69



Figura 4.10: Biofloculação de <i>S. subsalsus</i> com <i>pellets</i> de <i>A. niger</i> , com proporção fungo:cianobactéria 1:1 e 1:5 (g/g SST) a 28 °C e 100 rpm após 24 h. ....	70
Figura 4.11: Biofloculação de <i>S. subsalsus</i> com <i>pellets</i> de <i>A. niger</i> , com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm, sem e com diferentes percentuais de reposição de fontes de carbono. ....	71
Figura 4.12: Cocultivo de <i>S. subsalsus</i> com <i>A. niger</i> , com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST) a 28 °C e 100 rpm, nas condições sem reposição (0h, 24 h e 48 h, respectivamente A, B e C), com 14% de reposição (0h, 24 h e 48 h, respectivamente C, D e E) e com 96% de reposição (0h, 24 h e 48 h, respectivamente F, G e H). ....	72
Figura 4.13: Variação da razão DQOt/DQOi* no cocultivo de <i>S. subsalsus</i> com <i>A. niger</i> , na proporção fungo: cianobactéria de 1:5, a 28°C e 100 rpm, nas diferentes condições de reposição de extrato de levedura e sacarose. ....	74
Figura 4.14: Razão dt/di * no cocultivo de <i>S. subsalsus</i> com <i>A. niger</i> com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST), nas diferentes condições de reposição.....	75
Figura 4.15: <i>Pellet</i> após o cocultivo de <i>S. subsalsus</i> e <i>A. niger</i> na proporção fungo:cianoibactéria 1:5 (g/g SST) e sem reposição.....	75
Figura 4.16: Relação entre eficiências de biofloculação, consumo de DQO e diâmetro dos <i>pellets</i> no cocultivo de <i>S. subsalsus</i> e <i>A. niger</i> na proporção 1:5 (g/g SST) sem e com reposição: eficiências até 60% (A e B) e eficiências acima de 60% (C e D).....	76
Figura 4.17: Eficiência de biofloculação de <i>S. subsalsus</i> com <i>A. niger</i> em diferentes valores de pH do cocultivo com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST), a 28 °C e 150 rpm, com 14% de reposição, após 24 h. ....	78
Figura 4.18: Cocultivo de <i>S. subsalsus</i> e <i>A. niger</i> com proporção fungo:cianobactéria 1:5 (g/g SST), a 28 °C e 150 rpm, com pH ajustado para 6 em 0h (A) e 24 h (B), e com pH ajustado para 3, em 0h (C) e 24 h (D). ....	79
Figura 4.19: <i>Pellets</i> após o cocultivo de <i>S. subsalsus</i> e <i>A. niger</i> após 24 h (A) e 48 h (B), com proporção fungo:cianobactéria 1:5 (g/g SST), a 28°C e 150 rpm, com reposições de 0%, 14%, 46% e 96%.....	80
Figura 4.20: Cocultivo de <i>S. subsalsus</i> e <i>A.niger</i> com proporção fungo:cianobactéria de 1:5 (g/g SST), a 28°C e 150 rpm, com 14% de reposição em 0h (A) e 24 h (B) e com 96% de reposição em 0h (C) e 24 h (D).....	81
Figura 4.21: Observação ao microscópio com aumento de 4000 X da cultura de <i>S. subsalsus</i> a fresco (A) e com coloração de Gram (B) e do cocultivo a fresco (C) e com coloração de Gram (D). ....	82
Figura 4.22: Comparação de densificação de <i>S. subsalsus</i> com <i>A. niger</i> sob diferentes diâmetros e eficiências de biofloculação. ....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Comparação entre métodos de densificação de biomassas algáceas .....	27
Tabela 2.2: Efeito de diversas variáveis na biofloculação com fungos filamentosos. ....	37
Tabela 2.3: Espécies utilizadas nos estudos de biofloculação com fungos .....	38
Tabela 3.1: Composição do meio de cultivo das cianobactérias (BG-11) .....	43
Tabela 3.2: Composição da mistura de metais traço para o preparo do meio BG-11 .....	43
Tabela 3.3: Curvas de peso seco para quantificação das cianobactérias .....	44
Tabela 3.4: Quantidades de sacarose e extrato de levedura adicionadas ao cocultivo (com 100 mL) .....	48
Tabela 4.1: Valores médios de SST após 24 h de cultivo submerso de <i>A. niger</i> a 28°C sob diferentes condições de agitação e pH inicial. ....	52
Tabela 4.2: Tamanho dos <i>pellets</i> e densidade óptica do sobrenadante na fermentação submersa com o fungo <i>A. niger</i> em meio à base de extrato de levedura e sacarose, a 28°C e 150 rpm. ....	54
Tabela 4.3: Valores médios de SST para cada tempo de cultivo em meio à base de extrato de levedura e sacarose, a 28°C e 150 rpm. ....	56
Tabela 4.4: Resultado da biofloculação de <i>Anabaena siamensis</i> com <i>Aspergillus niger</i> na proporção 1:1 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm. ....	59
Tabela 4.5: Resultado da biofloculação de <i>Anabaena variabilis</i> com <i>A. niger</i> na proporção 1:1 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm. ....	61
Tabela 4.6: Resultados da biofloculação de <i>Synechococcus subsalsus</i> com <i>Aspergillus niger</i> na proporção 1:1 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm. ....	63
Tabela 4.7: Resultados da biofloculação de <i>Spirulina maxima</i> com <i>Aspergillus niger</i> na proporção 1:1 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm. ....	65
Tabela 4.8: Características dos gêneros de cianobactérias utilizados nos testes de biofloculação com <i>Aspergillus niger</i> . ....	67
Tabela 4.9: Variação da DQO no cocultivo de <i>S. subsalsus</i> com <i>A. niger</i> , na proporção fungo: cianobactéria de 1:5, a 28°C e 100 rpm, nas diferentes condições de reposição de extrato de levedura e sacarose. ....	73
Tabela 4.10: Tamanho dos <i>pellets</i> no cocultivo de <i>S. subsalsus</i> com <i>A. niger</i> , com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST), a 28°C e 100 rpm, nas diferentes condições de reposição. ....	74
Tabela 4.11: Comparação dos melhores resultados da biofloculação de <i>S. subsalsus</i> com <i>A. niger</i> . ....	83

## LISTA DE SIGLAS

DO	Densidade Óptica
DQO	Demanda Química de Oxigênio
GRAS	Generally Recognized As Safe (geralmente reconhecido como seguro)
NAABB	National Alliance for Advanced Biofuels and Bioproducts
SST	Sólidos Suspensos Totais
TRL	Technology Readiness Level (nível de maturidade da tecnologia)
ATP	Adenosina Trifosfato
NADPH	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Fosfato

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	12
1.1	Introdução .....	12
1.2	Objetivos .....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Cianobactérias.....	15
2.2	Fungos filamentosos .....	18
2.3	Métodos de Densificação de Biomassas.....	21
2.4	Biofloculação Assistida por Fungos Filamentosos .....	28
2.4.1	Mecanismos propostos para a biofloculação .....	28
2.4.2	Efeito de condições de cocultivo na biofloculação.....	31
2.4.2.1	Método de inoculação .....	31
2.4.2.2	pH.....	32
2.4.2.3	Temperatura .....	32
2.4.2.4	Concentração de biomassa .....	33
2.4.2.5	Tempo de cultivo do fungo .....	34
2.4.2.6	Agitação .....	34
2.4.2.7	Fonte de carbono .....	35
3	METODOLOGIA .....	39
3.1	Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> .....	40
3.1.1	Crescimento e manutenção dos esporos.....	40
3.1.2	Preparo da suspensão de esporos .....	41
3.1.3	Obtenção dos <i>pellets</i> .....	41
3.1.4	Determinação da curva de crescimento da linhagem de <i>Aspergillus niger</i> .....	42
3.2	Cultivo das cianobactérias.....	42
3.3	Experimentos preliminares de biofloculação com <i>Aspergillus niger</i> .....	45
3.4	Experimentos com a cianobactéria <i>Synechococcus subsalsus</i> .....	46
3.4.1	Determinação do crescimento microbiano .....	47
3.4.2	Biofloculação com <i>Aspergillus niger</i> .....	47
3.5	Métodos analíticos.....	49
3.5.1	pH .....	49
3.5.2	Sólidos Suspensos Totais.....	49
3.5.3	Demanda Química de Oxigênio (DQO) .....	50
3.5.4	Densidade Óptica .....	50
3.5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	50
3.5.6	Diâmetro dos <i>pellets</i> .....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
4.1	Cultivo do fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	52
4.1.1	Obtenção de <i>pellets</i> do fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	52
4.1.2	Determinação da curva de crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	54
4.2	Experimentos preliminares de biofloculação com <i>Aspergillus niger</i> .....	59
4.2.1	Biofloculação de <i>Anabaena siamensis</i> com <i>A. niger</i> .....	59
4.2.2	Biofloculação de <i>Anabaena variabilis</i> com <i>A. niger</i> .....	60
4.2.3	Biofloculação de <i>Synechococcus subsalsus</i> com <i>A. niger</i> .....	62
4.2.4	Biofloculação de <i>Spirulina máxima</i> com <i>A. niger</i> .....	65
4.2.5	Comparação da biofloculação de diferentes espécies de cianobactérias com o fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	66

4.3	Experimentos com <i>Synechococcus subsalsus</i> .....	68
4.3.1	Crescimento de <i>Synechococcus subsalsus</i> .....	68
4.3.2	Experimentos de biofloculação com <i>A. niger</i> .....	69
4.3.2.1	Efeito de diferentes proporções fungo: cianobactéria... 69	69
4.3.2.2	Efeito da reposição de nutrientes .....	70
4.3.2.3	Efeito da variação do pH .....	77
4.3.2.4	Dificuldade de quantificação da eficiência de biofloculação .....	80
4.3.2.5	Densificação das suspensões de <i>S. subsalsus</i> .....	83
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	86
5.1	Conclusões.....	86
5.2	Sugestões .....	87
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICE – Artigo a ser submetido na Water Science & Technology.....	97

## 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

### 1.1 Introdução

Micro-organismos como cianobactérias e microalgas têm ganhado importância em função de sua capacidade fotossintética, fixando dióxido de carbono e mitigando os efeitos do acúmulo desse gás na atmosfera. Tais organismos têm aplicação promissora devido a sua elevada produtividade e requerimentos nutricionais relativamente simples (OLAIZOLA, 2003; RUFFING, 2011).

Além disso, seu cultivo não requer a utilização de terras aráveis, evitando competição com a produção de alimentos; e de água limpa, devido à possibilidade do uso de águas residuárias (LI et al., 2011; PARMAR et al., 2011), o que aumenta a atratividade de processos baseados em biomassas algáceas e de cianobactérias.

A biomassa gerada pode ainda ser utilizada para a geração de energia renovável. Já foram sugeridas diversas aplicações desse tipo de biomassa para a geração de energia, como: produção de biodiesel a partir dos lipídios acumulados no interior das células (MURADOV et al., 2015); geração de bioetanol (MÖLLERS et al., 2014) e de biohidrogênio (ROY et al., 2014) pela fermentação da biomassa; e também a geração de biogás a partir da digestão anaeróbia da biomassa (PRAJAPATI et al., 2016).

Um dos principais obstáculos à utilização industrial de processos baseados em biomassas algáceas é a dificuldade no processamento *downstream* do cultivo de microalgas e cianobactérias, devido a elevada quantidade de água presente (CHEN; CHANG; LEE, 2015).

Cultivos de microalgas apresentam concentrações de biomassa muito baixas (cerca de 0,5 g/L, podendo chegar a 5 g/L em fotobiorreatores) (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). A otimização de tecnologias de concentração da biomassa é essencial para a obtenção de biocombustíveis produzidos por biomassas algáceas em larga escala e para a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia da biomassa (PRAJAPATI et al., 2016). Além disso, a água removida poderia ainda ser reutilizada no cultivo de mais

biomassa, reduzindo ainda mais os custos envolvidos no processo (UMMALYMA et al., 2016; VANDAMME et al., 2014; ZHOU et al., 2012).

O aumento da concentração de biomassa se torna um processo difícil devido à estabilidade coloidal da suspensão, decorrente da carga superficial fortemente negativa e do reduzido tamanho das células (2-20  $\mu\text{m}$ ) (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). Esses fatores fazem com que os processos convencionais de densificação de biomassas, como a sedimentação, não sejam tecnicamente viáveis; enquanto processos efetivos, como a centrifugação, são muito onerosos.

Dessa forma, a concentração da biomassa algácea é um dos principais gargalos dos processos que utilizam esses micro-organismos, representando de 20 a 30 % do custo total de produção (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013).

A floculação com fungos filamentosos pode ser um método efetivo para a densificação de suspensões de microalgas e cianobactérias (ZHANG; HU, 2012), podendo reduzir significativamente os custos envolvidos nesta etapa e potencializando sua aplicação para tratamento de água e geração de energia economicamente viável. Apesar de não ser possível separar as células fotossintéticas do fungo, os *pellets* obtidos no cocultivo podem ser utilizados como biomassa na digestão anaeróbia para a produção de biogás (PRAJAPATI et al., 2016), possibilitando a redução de volume dos reatores e, conseqüentemente, dos custos do processo.

Contudo, ainda existem poucos estudos sobre esse método, e os mecanismos envolvidos na biofloculação ainda não são completamente compreendidos, o que dificulta a otimização das condições para a obtenção de elevadas eficiências em tempos reduzidos, tornando importante o estudo desse método de densificação.

## 1.2 Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a possibilidade de biofloculação de cianobactérias com *pellets* do fungo filamentoso *Aspergillus niger*.

Para tal, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Avaliar as melhores condições de pH e agitação para obtenção de *pellets* do fungo filamentoso *A. niger* por meio de fermentação submersa a 28°C em meio de cultivo à base de extrato de levedura e sacarose;
- Obter curva de crescimento do fungo *A. niger* para definição do tempo de cultivo para obtenção dos *pellets*;
- Quantificar o potencial de biofloculação de suspensões de quatro espécies de cianobactérias cultivadas em meio BG-11 a partir do cocultivo com *pellets* do fungo *A. niger* para seleção da espécie de maior potencial de biofloculação;
- Avaliar o efeito da concentração inicial de cianobactéria, da proporção fungo:cianobactéria, da concentração de matéria orgânica e pH do cocultivo sobre a eficiência de biofloculação com *pellets* do fungo *A. niger*, empregando a espécie de cianobactéria com maior potencial de biofloculação;
- Obter e comparar fatores de concentração ou densificação celular da cianobactéria com maior potencial de biofloculação com *pellets* de *A. niger* sob as diferentes condições de cocultivo avaliadas.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

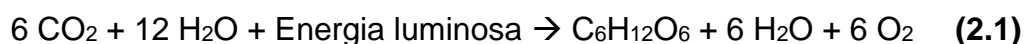
Neste capítulo será apresentada a revisão bibliográfica realizada acerca dos temas abordados no trabalho, de modo a compreender os micro-organismos utilizados e o estado da arte da densificação de biomassas de microalgas e cianobactérias.

### 2.1 Cianobactérias

Cianobactérias são bactérias Gram-negativas fotossintéticas de morfologia variada, podendo ser unicelulares, coloniais ou filamentosas. Muitas espécies são fixadoras de nitrogênio e possuem vacúolos gasosos como um mecanismo de movimentação celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A parede celular das cianobactérias é composta por uma camada de peptidoglicana exterior à membrana celular, um espaço periplásmico e uma membrana externa. Algumas espécies possuem ainda outras camadas externas, como a *Serrated external layer (S-layer)*, e uma camada de fibras, que permitem a ocorrência de *gliding*, mecanismo de movimentação celular sobre superfícies. A presença de poros na parede é um importante mecanismo de transporte de substâncias em organismos filamentosos (LEE, 2008).

Cianobactérias são capazes de produzir matéria orgânica a partir do processo de fotossíntese. Durante esse processo, moléculas orgânicas, como açúcares, são sintetizados a partir de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água, com a energia proveniente da luz (Reação 2.1) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).



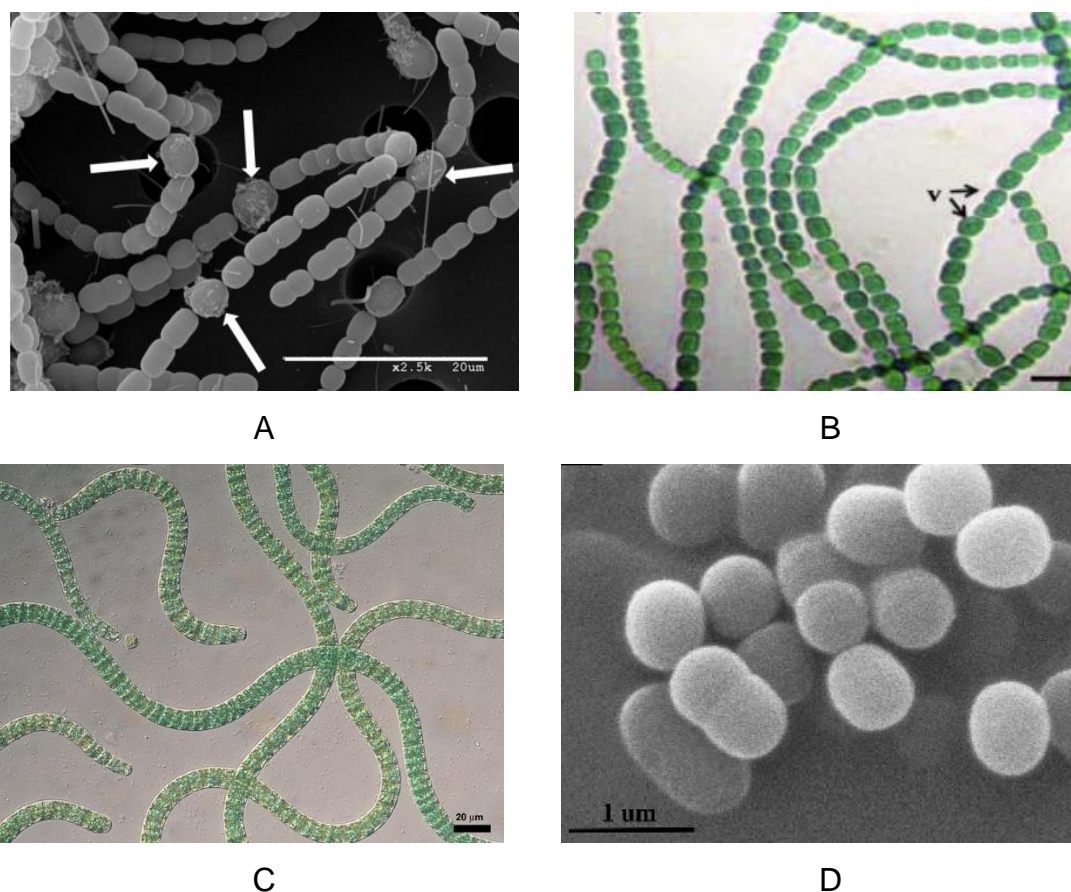
O processo de fotossíntese ocorre em duas etapas: uma etapa fotoquímica, na qual a energia luminosa é utilizada na obtenção de ATP e NADPH (energia química); e uma etapa química, na qual os elétrons obtidos na etapa luminosa são utilizados juntamente com a energia do ATP para a redução do CO<sub>2</sub> a açúcar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os principais pigmentos envolvidos no sistema fotossintético das

cianobactérias são a clorofila *a*, presente na membrana do tilacoide, e as ficobiliproteínas, cromoproteínas que formam agregados aderidos à face exterior da membrana do tilacoide. Além disso, há também a presença de carotenoides, clorofila *b* e clorofila *d* em algumas espécies (LEE, 2008). As enzimas envolvidas na fotossíntese também são encontradas nos tilacoides (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Neste estudo foram avaliadas as espécies *Anabaena variabilis*, *Anabaena siamensis*, *Spirulina maxima* e *Synechococcus subsalsus* (Figura 2.1).

**Figura 2.1: Imagens microscópicas das espécies estudadas: *Anabaena variabilis*, com os heterocistos destacados (A), *Anabaena siamensis*, apenas células vegetativas, sem heterocistos (B), *Spirulina máxima* (C) e *Synechococcus sp.* (D).**



**Fonte: Khetkorn, Lindblad e Incharoensakdi (2010), Thiel et al. (2014), Culture Collection of Autotrophic Organisms<sup>1</sup>, Liu et al. (2015)**

Ambas as espécies do gênero *Anabaena* são filamentosas e formadoras

<sup>1</sup> Disponível em <[http://ccala.butbn.cas.cz/sites/default/files/styles/ccala\\_big/public/ccala\\_collection/13256/1352919359-28.jpg](http://ccala.butbn.cas.cz/sites/default/files/styles/ccala_big/public/ccala_collection/13256/1352919359-28.jpg)>. Acesso em 13/01/2019.

de heterocistos, que são células especializadas nas quais ocorre a fixação de nitrogênio (KHETKORN; LINDBLAD; INCHAROENSAKDI, 2010; THIEL et al., 2014). A espécie *S. maxima* é uma das mais importantes espécies produzidas comercialmente e é muito utilizada como complemento alimentar (WHITTON; POTTS, 2012). Esta espécie possui vacúolos gasosos e também apresenta morfologia filamentosa, mas não forma heterocistos. Já o gênero *Synechococcus* é caracterizado pela forma cocoide e pelo reduzido tamanho celular, sendo abundante componente do fitoplâncton (LEE, 2008). Estas espécies dificilmente são separadas do meio de cultivo por sedimentação, devido às células serem muito pequenas, como é o caso da *S. subsalsus*, ou à presença de vacúolos gasosos, como ocorre com a *S. maxima*.

Cianobactérias podem ser cultivadas em sistemas abertos, como lagoas ou canais, ou em sistemas fechados, como fotobiorreatores tubulares. Sistemas abertos são de baixo custo e fácil operação, mas não permitem um bom controle da temperatura e demais variáveis e estão sujeitos a contaminações. Assim, sistemas fechados são utilizados para evitar o crescimento de outros micro-organismos, permitindo a produção de culturas puras, mas possuindo um custo de construção e operação mais elevado, além de ter como desvantagem a ocorrência de *fouling* (acúmulo de células na parede do fotobiorreator), o que diminui a penetração de luz no sistema (ACIÉN et al., 2017).

A tendência futura dos fotobiorreatores reside no desenvolvimento de tecnologias de cultivo com maior eficiência (permitindo melhor controle de variáveis, aumentando a eficiência de utilização da luz e reduzindo os custos), no *scale-up* dos processos de produção existentes e na industrialização da produção de biomassa (com a implementação de operação contínua e estratégias de controle, por exemplo) (ACIÉN et al., 2017).

A capacidade de captura de CO<sub>2</sub> torna esses micro-organismos atrativos para a síntese de biocombustíveis. Estudos foram feitos na direção da geração de diversos biocombustíveis a partir de cianobactérias e microalgas. Os biocombustíveis podem ser produzidos diretamente pelas células ou a partir de produtos da mesma, como é o caso do bioetanol (GAO et al., 2012), do biohidrogênio (AVILAN et al., 2018) e do biodiesel produzido a partir de lipídeos acumulados nos micro-organismos (ANAHAS; MURALITHARAN, 2015). Além

disso, biocombustíveis também podem ser produzidos a partir da utilização da biomassa das cianobactérias como insumo na fermentação para a produção de bioetanol por leveduras (MÖLLERS et al., 2014), na geração de biohidrogênio (ROY et al., 2014) ou na digestão anaeróbia para a produção de biogás (MENDEZ et al., 2016).

A conversão de energia luminosa em biomassa por esses micro-organismos é cerca de 10 vezes maior do que em plantas tradicionais. Além disso, o emprego dessas biomassas para produção de biocombustíveis possui diversas outras vantagens sobre as matérias-primas agrícolas (SHARMA; STAL, 2013), como:

- alta produtividade por área;
- utilização de recursos não-alimentícios;
- utilização de terras não-aráveis;
- utilização de diversas fontes de água além da água potável;
- produção de bioprodutos em conjunto com biocombustíveis;
- sequestro de dióxido de carbono;
- potencial para remoção de nutrientes e metais de águas residuárias.

## 2.2 Fungos filamentosos

Fungos filamentosos são organismos eucariotos e aeróbios estritos. Eles geralmente crescem melhor em pH ligeiramente ácido (em torno de 5), sendo resistentes também à pressão osmótica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os fungos são utilizados em processos fermentativos na indústria, que podem ser submersos (desenvolvimento celular no seio do meio de cultivo) ou no estado sólido (processo ocorre na superfície do substrato sólido e na ausência de água livre) (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

Fungos filamentosos possuem uma parede celular formada por uma espessa rede fibrosa cujo principal componente é um polissacarídeo (como quitina, glucanos ou quitosana). A parede celular pode variar com a espécie de fungo, mas também entre as diferentes formas morfológicas de uma mesma espécie ou em resposta a um estresse ambiental (WALKER; WHITE, 2018).

*Aspergillus niger*, o micro-organismo empregado no presente estudo, é

um fungo filamentoso da divisão Ascomycota, caracterizado por conídios esféricos de coloração preta (Figura 2.2). Esta espécie possui requerimentos nutricionais bem simples, sendo capaz de produzir seus fatores de crescimento a partir do açúcar do meio de cultivo (WALKER; WHITE, 2018).

**Figura 2.2: Morfologia macroscópica (A) e microscópica (B) do fungo *Aspergillus niger***



Fonte: Svanström (2013)

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é uma das espécies mais utilizadas industrialmente, sendo considerado como não produtor de micotoxina e geralmente reconhecido como seguro (*generally recognized as safe* - GRAS), devido ao seu longo histórico de utilização pelo homem sem patogenicidade e pela não produção de cancerígenos nas culturas (GÓMEZ; FERNÁNDEZ; VEGA, 2016). É o micro-organismo mais utilizado para a produção de ácido cítrico, devido a sua facilidade de manuseio, habilidade de fermentar uma grande quantidade de materiais de baixo custo e elevada produtividade (HORGAN; MURPHY, 2018). Além disso, essa espécie também é utilizada para a produção de enzimas como amilases, lipases e proteases (MCKELVEY; MURPHY, 2018).

O crescimento de fungos filamentosos na forma de *pellets*, tal como utilizado para a densificação de biomassa de cianobactérias, é comum em processos de fermentação submersa, resultando em melhora nas transferências

de massa e de oxigênio, na agitação e na recuperação da biomassa e dos produtos por ela gerados, mas tendo como principal problema o transporte de nutrientes para o interior dos *pellets* (KRULL et al., 2013).

A formação dos *pellets* pode ser classificada como coagulativa, caso do *Aspergillus niger*, na qual há a agregação de esporos antes da germinação; e não coagulativa, na qual cada *pellet* é produzido a partir de um esporo (PAPAGIANNI, 2004). Algumas condições de cultivo do fungo, como, por exemplo, a velocidade de agitação, pH e tamanho do inóculo, podem influenciar na formação dos *pellets* e nas características apresentadas pelos mesmos.

A velocidade de agitação é um parâmetro importante no controle da formação e tamanho dos *pellets* fúngicos. Na ausência de agitação, não há a formação de *pellets* (ZHOU et al., 2013), o que sugere uma contribuição do estresse hidráulico na sua formação. Contudo, uma agitação muito vigorosa também pode evitar a ocorrência de *pellets* (LIU; LIAO; CHEN, 2008), pois impede a formação dos agregados de células. A velocidade de rotação também influencia o tamanho e quantidade dos *pellets*. Em velocidades mais elevadas, é formada uma maior quantidade de *pellets* menores, enquanto em agitações mais lentas se forma uma quantidade menor de *pellets* com maior diâmetro (KELLY et al., 2006; LIU; LIAO; CHEN, 2008).

O pH do meio também parece influenciar no crescimento em forma de *pellets*. A formação de agregados pode ser inibida em valores de pH muito reduzido (menor que 2) ou mais elevado (igual a 8), resultando na ausência de *pellets* ou na formação de *pellets* com tamanho muito reduzido (PRIEGNITZ et al., 2012; VECHT-LIFSHITZ; MAGDASSI; BRAUN, 1990).

O tamanho do inóculo é outro fator importante no processo de *pelletização*. Conforme aquele aumenta, percebe-se uma diminuição do tamanho dos *pellets* formados (BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2010; PAPAGIANNI; MATTEY, 2006). Em concentrações muito elevadas, não ocorre a formação de *pellets*, mas um crescimento em forma de micélio livre (PAPAGIANNI; MATTEY, 2006).

### 2.3 Métodos de Densificação de Biomassas

A concentração de biomassa nos cultivos de cianobactérias e microalgas é bastante reduzida (cerca de 0,5 g/L, podendo chegar a 5 g/L em fotobiorreatores) (VANDAMME; FOUBERT; MUYLEAERT, 2013). Assim, o aumento da concentração de biomassa é essencial para viabilizar sua aplicação na produção de biocombustíveis. A densificação da biomassa é um dos principais gargalos da produção industrial de microalgas e cianobactérias, representando de 20 a 30 % do custo total de produção (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013).

As principais técnicas existentes para a densificação de cultivos de cianobactérias e microalgas são sedimentação, flotação, filtração, centrifugação e floculação (CHEN; CHANG; LEE, 2015).

Apesar da sedimentação ser um processo simples e com custos reduzidos, a velocidade de sedimentação das células é muito baixa e a concentração da biomassa obtida por esse método é muito pequena (BARROS et al., 2015). Isso se deve ao pequeno tamanho das células (2-20  $\mu\text{m}$ ) e sua carga superficial negativa, que gera uma estabilidade coloidal na suspensão (VANDAMME; FOUBERT; MUYLEAERT, 2013), tornando a sedimentação um método de concentração pouco eficiente e tecnicamente inviável. Além disto, a sedimentação depende de processos de floculação (DOE, 2016), que também serão abordados neste capítulo, para a formação de agregados celulares que possam ser facilmente separados do meio de cultivo.

A flotação, que também é um processo físico de separação, pode ser feita de três maneiras distintas: por ar dissolvido, por ar disperso, ou eletrolítica (UDUMAN et al., 2010). Assim como na sedimentação, é necessário um processo anterior à flotação para que a separação da biomassa seja suficientemente eficiente, sendo geralmente aplicada em combinação com a floculação química, o que traz consigo as desvantagens desse método (DOE, 2016). Os principais fatores que influenciam o processo são o tipo de coletor utilizado, o pH e o tipo de formação de bolhas (CHEN; CHANG; LEE, 2015). Com esse método, é possível alcançar recuperações da biomassa próximas a 90% em minutos (GARG; WANG; SCHENK, 2015; WILEY; BRENNEMAN;

JACOBSON, 2009). Apesar da flotação por ar dissolvido ter sido identificada como o método mais eficiente para separação de microalgas, foi demonstrado que a flotação por ar disperso pode processar maiores volumes mais rapidamente e com menores gastos energéticos (WILEY; BRENNEMAN; JACOBSON, 2009).

A filtração também pode ser utilizada como um processo de separação da biomassa algácea. Apesar de ser um método simples, é potencialmente oneroso (DOE, 2016). A filtração convencional pode ser utilizada para concentrar microalgas de maior tamanho; mas para espécies menores não é eficiente, sendo utilizadas, nesse caso, membranas de micro e ultrafiltração (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013). O material constituinte da membrana pode afetar a filtração; membranas de cerâmica apresentam maior permeabilidade que membranas poliméricas, além de terem melhor reprodutibilidade e serem de mais fácil limpeza (RIOS et al., 2011). Além disso, o material de filtração ideal pode depender da espécie que se quer concentrar, devido a diferença nos materiais dissolvidos presentes em cada cultivo, que podem acumular nos poros das membranas e causar redução no fluxo de permeado (NAABB, 2014). Com esse método, podem ser obtidas eficiências de remoção acima de 95%, concentrando em até 45 vezes a biomassa algácea (BILAD et al., 2012; NAABB, 2014). Os custos envolvidos com a aplicação de membranas podem ser menores que na centrifugação para volumes pequenos, mas para a produção em larga escala a centrifugação se torna mais econômica (ROSSIGNOL et al., 1999). Para reduzir os custos e gastos energéticos deste processo são necessários maior fluxo permeado e maior resistência ao *fouling* (NAABB, 2014).

A centrifugação é um processo no qual a biomassa é separada do meio pela aplicação da força centrífuga. Alguns fatores influenciam a eficiência desse processo, como as características da microalga, o tempo de retenção e o *design* da centrífuga (CHEN et al., 2015). Em um estudo conduzido por Dassey e Theegala (2013), foi obtida uma eficiência de captura de 94% utilizando centrifugação contínua. Neste estudo também se observou que a utilização de baixas vazões leva a maiores eficiências, mas também a um maior gasto energético por unidade de volume processado, enquanto que para vazões maiores as eficiências e o gasto energético são menores, sendo necessária a



avaliação da condição de melhor custo/benefício. Além da possibilidade de danos na estrutura celular, que limitaria as aplicações posteriores da biomassa (CHEN; CHANG; LEE, 2015), a principal desvantagem da centrifugação é econômica, relacionada aos elevados gastos energéticos e aos custos capitais envolvidos em sua aplicação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

A floculação é um dos métodos mais populares de concentração de microalgas e cianobactérias, devido a sua capacidade de separar os microorganismos de grandes volumes de suspensão, podendo ser utilizado com as mais diversas espécies (UDUMAN et al., 2010). O processo de floculação é utilizado para aumentar a velocidade de sedimentação da microalga (UDUMAN et al., 2010), para melhorar o processo de flotação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010) ou para diminuir a demanda de energia e os custos de operação dos demais métodos de separação, como a centrifugação (SALIM; VERMUE; WIJFFELS, 2012). A floculação pode ser atingida a partir de processos químicos, físicos ou biológicos.

Na coagulação/floculação química, a adição de sais inorgânicos e polímeros facilita a separação da biomassa (WAN et al., 2015) por meio da neutralização das cargas superficiais negativas das células de microalgas e da promoção de uma ligação entre as partículas suspensas (*bridging*) (BRENNAN; OWENDE, 2010), que favorece a formação de agregados. Sulfato de alumínio ( $Al_2(SO_4)_3$ ), sulfato férrico ( $Fe_2(SO_4)_3$ ) e policloreto de alumínio (PAC) são exemplos de coagulantes inorgânicos utilizados, podendo-se obter eficiências de coagulação/floculação superiores a 90% em alguns minutos (ELDRIDGE; HILL; GLADMAN, 2012; UMMALYMA et al., 2016).

Apesar da utilização de alguns polímeros orgânicos resultar em uma eficiência menor do que a dos coagulantes químicos convencionais (inorgânicos) (ELDRIDGE; HILL; GLADMAN, 2012), a quitosana, que é um polímero biodegradável, biocompatível, renovável e com propriedades físico-químicas desejáveis (VARMA; DESHPANDE; KENNEDY, 2004), pode alcançar eficiências de coagulação/floculação iguais ou maiores com uma menor concentração (CHEN et al., 2013; UMMALYMA et al., 2016). Materiais poliméricos podem sofrer mudanças na configuração e dimensão em altas forças iônicas, se tornando pouco efetivos na floculação de biomassa cultivada em água

salina (UDUMAN et al., 2010).

A coagulação/floculação química possui como desvantagem o impacto de diversos fatores sobre a eficiência, como pH, características microbianas, salinidade, concentração de coagulante/floculante e concentração da biomassa. Como muitos desses fatores não são estáticos durante o cultivo, a otimização da concentração de floculante pode ser difícil (GERARDO et al., 2015). Além disso, na coagulação/floculação química há o acúmulo do produto utilizado na biomassa concentrada, o que pode limitar suas aplicações ou dificultar o processamento *downstream* (WAN et al., 2015).

Em algumas espécies, a floculação ocorre espontaneamente em pH elevado, podendo chegar a quase 100% em um curto intervalo de tempo quando o valor de pH é igual ou superior a 11 (PÉREZ et al., 2017; UMMALYMA et al., 2016). Contudo, já foi sugerido que o mecanismo de floculação neste caso está relacionado com a formação de precipitados de magnésio no meio de cultivo (VANDAMME et al., 2012). Dessa forma, esses precipitados estarão presentes na biomassa concentrada, podendo limitar suas aplicações.

A coagulação/floculação física elimina a adição de químicos (WAN et al., 2015). A aplicação de ultrassom para a obtenção de um fator de concentração de até 18x utilizando vazões de operação de 45 a 225 L/h para diversas espécies de microalgas é relatada (NAABB, 2014), mas com gastos energéticos significativos com o aumento de escala. A eletrocoagulação, na qual as células carregadas negativamente tendem a migrar para o anodo, onde formam agregados (WAN et al., 2015), é uma outra forma de floculação física. Utilizando eletrodos de alumínio, atingiu-se uma recuperação de 95% da biomassa algácea, com um fator de concentração de 50 vezes, com apenas 25% da energia aplicada na centrifugação (NAABB, 2014). Contudo, o custo da troca do eletrodo e os riscos de contaminação da biomassa com alumínio são desvantagens desse processo (WAN et al., 2015).

A biofloculação é uma alternativa ambientalmente amigável e com elevado potencial. Possui três subdivisões: autofloculação, biofloculação associada a biofloculantes microbiológicos e biofloculação associada a microorganismos (WAN et al., 2015).

A autofloculação ocorre quando células se agregam entre si. Observando

espécies de microalgas com linhagens autofloculantes (*Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*), que atingem eficiências de floculação de 85% (GUO et al., 2013) e 76% (ALAM et al., 2014), respectivamente, Wan et al. (2015) identificaram que a síntese de polissacarídeos pelas células era responsável pela autofloculação. Enquanto na autofloculação de *Ettlia texensis*, Salim et al. (2014) propuseram o envolvimento de glicoproteínas. A utilização desse mecanismo de concentração de biomassa pode se dar a partir do estudo da genética dessas espécies, possibilitando a superexpressão dos genes envolvidos na produção de polissacarídeos e glicoproteínas, de modo a aumentar a eficiência da autofloculação (WAN et al., 2015).

A floculação associada a biofloculantes microbianos apresenta elevadas eficiências, até maiores que a de floculantes químicos (WAN et al., 2013). Grupos funcionais carregados, atuando na neutralização das cargas ou pelo mecanismo de *bridging*, foram sugeridos como os responsáveis pela eficiência dos biofloculantes (SALIM et al., 2011). A presença de cátions como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , em conjunto com biofloculantes poliméricos produzidos por *Paenibacillus* sp., beneficiou a floculação de microalgas (KIM et al., 2011), mas acarretou a contaminação da corrente concentrada. Ndikubwimana et al. (2014) avaliaram a biofloculação da microalga *Desmodesmus* sp. F51 com poli  $\gamma$ -ácido glutâmico produzido por *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876, atingindo eficiência de 99% e verificando-se que o pH inicial tem influência significativa na eficiência obtida. Apesar da elevada eficiência, esse método apresenta custos muito altos para a coleta e purificação dos biofloculantes, além da elevada concentração requerida, o que torna o processo oneroso (WAN et al., 2015).

O último tipo de biofloculação está associada a micro-organismos (e.g., microalgas autofloculantes, bactérias, fungos filamentosos). O uso de microalgas autofloculantes é uma opção mais econômica, com baixa demanda de energia, mas que ainda conta com poucos estudos, não estando esclarecido o mecanismo da autofloculação (UMMALYMA et al., 2017). A interação das células de microalgas com as células bacterianas (ou suas substâncias poliméricas extracelulares – EPS) foram levantadas como as principais causas da ocorrência da floculação assistida por bactérias (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2009). Li et al. (2018) apontaram que a parede celular das bactérias, em especial alguns

aminoácidos presentes na mesma, era responsável pela floculação (a viabilidade das células bacterianas não influenciou a biofloculação). Além disso, este estudo também percebeu o aumento da eficiência obtida na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . O tamanho do inóculo necessário e o tempo elevado do cocultivo (podendo levar até 3 dias) são os principais problemas do processo, o que explica a necessidade de estudos para otimização do processo (WAN et al., 2015).

O processo de biofloculação utilizando fungos filamentosos pode alcançar elevadas eficiências de floculação, a partir do cocultivo dos *pellets* de fungo com a biomassa algácea a ser concentrada. Os baixos custos da biofloculação realizada com fungos é um grande atrativo para o estudo da mesma, por poder potencialmente reduzir o impacto econômico da etapa de concentração da biomassa algácea (ALAM et al., 2016). O principal problema relacionado a esse método é o período relativamente longo necessário para o cocultivo (de 2 a 3 dias) (ZHOU et al., 2012). Além disso, os mecanismos envolvidos na interação entre as células de microalgas e do fungo ainda não são conhecidos (UMMALYMA et al., 2017).

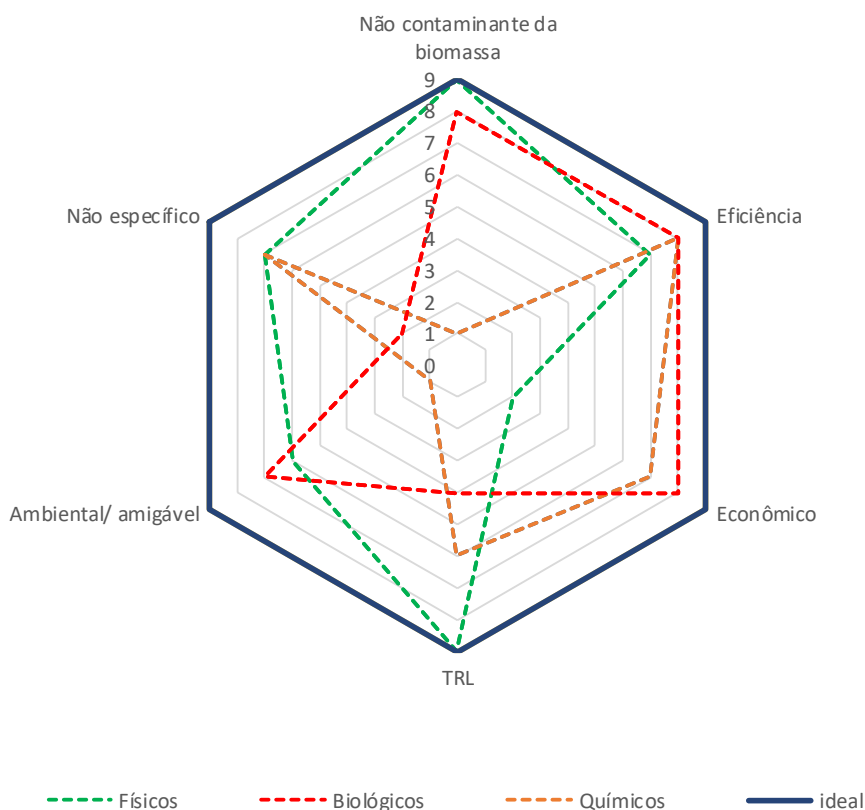
A Tabela 2.1 apresenta um resumo dos principais métodos de densificação de biomassas algáceas, relacionando as suas respectivas vantagens e desvantagens. Na Figura 2.3 é apresentado um gráfico de comparação dos métodos físicos, químicos e biológicos de densificação de biomassas algáceas com relação a parâmetros importantes como eficiência, custos de operação, impactos ambientais, especificidade, contaminação da biomassa e nível de maturidade da tecnologia (TRL – *technology readiness level*). Este gráfico mostra que os métodos biológicos (autofloculação, floculação com biofloculantes e com micro-organismos) se aproximam do método ideal em termos de eficiência, custos, impactos ambientais e contaminação da biomassa, apresentando como desvantagens o fato de serem métodos espécie-específicos e ainda se encontrarem em fase de estudos em escala de bancada. Os métodos físicos apresentam como desvantagem os elevados custos (e.g. centrifugação, flotação) e baixas eficiências (e.g. sedimentação), enquanto nos químicos as desvantagens são os elevados impactos ambientais e contaminação da biomassa.

**Tabela 2.1: Comparação entre métodos de densificação de biomassas algáceas**

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Referências</b>
<b>Sedimentação</b>	Custos reduzidos, fácil operação	Velocidade de sedimentação baixa, necessidade de floculação	Barros et al. (2015), DOE (2016)
<b>Flotação</b>	Elevadas eficiências (com o uso de floculantes)	Necessidade de processos de floculação, gastos energéticos	Chen et al. (2015), DOE (2016), Garg et al. (2015), Uduman et al. (2010)
<b>Filtração</b>	Elevadas eficiências	Gastos de manutenção devido ao <i>fouling</i> ; redução do fluxo de permeado com o tempo de operação; maiores gastos energéticos em volumes elevados	Bilad et al. (2014), DOE (2016), NAABB (2014), Pragma, Pandey e Sahoo (2013), Rossignol et al. (1999)
<b>Centrifugação</b>	Elevadas eficiências	Elevados gastos energéticos, possível dano da estrutura celular, limitando aplicações posteriores	Chen et al. (2015), Dassey e Theegala (2013), Mata, Martins e Caetano (2010)
<b>Coagulação/ floculação química</b>	Elevadas eficiências, custo reduzido, utilização de polímeros biodegradáveis	Eficiências afetadas pela salinidade, acúmulo do coagulante utilizado na biomassa concentrada	Salim, Vermuë e Wijffels (2012), Eldridge, Hill e Gladman (2012), Chen et al. (2013, 2015), Gerardo et al. (2015), Uduman et al. (2010), Vandamme et al. (2012), Ummalya et al (2016)
<b>Floculação física</b>	Elevadas eficiências, custo relativamente baixo	Riscos de contaminação da biomassa com a utilização de eletrodos de alumínio na eletrocoagulação	NAABB (2014), Wan et al. (2015)
<b>Autofloculação</b>	Promoção da densificação pela própria biomassa algácea, eficiências razoáveis	Limitação a linhagens autofloculantes, necessidade de estudos genéticos	Alam et al. (2014), Guo et al. (2013), Salim et al. (2014), Wan et al. (2015)
<b>Floculação c/ biofloculantes microbianos</b>	Elevadas eficiências	Elevados custos de coleta e purificação dos biofloculantes, contaminação da biomassa por íons metálicos	Kim et al. (2011), Ndikubwimana et al. (2014), Wan et al. (2013), Wan et al. (2015)
<b>Floculação c/ micro-organismos</b>	Baixos custos, reduzida demanda energética, elevadas eficiências	Elevado tempo de processo, necessidade de otimização dos processos	Alam et al. (2016), Li et al. (2018), Salim et al. (2011), Wan et al. (2015), Zhou et al. (2012).

**Fonte: Elaboração própria**

**Figura 2.3: Comparação de métodos de densificação de biomassas algáceas, agrupados em métodos físicos, químicos e biológicos.**



Fonte: Elaboração Própria

## 2.4 Biofloculação Assistida por Fungos Filamentosos

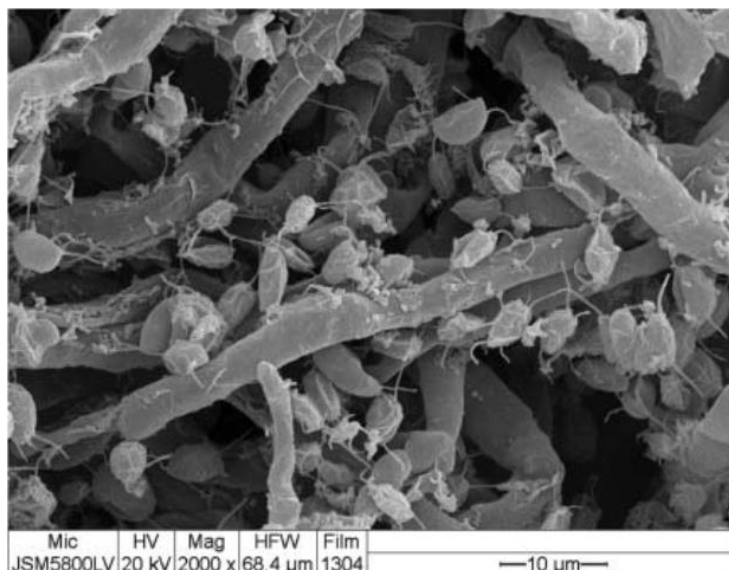
### 2.4.1 Mecanismos propostos para a biofloculação

O processo de biofloculação de microalgas e cianobactérias assistida por fungos filamentosos é baseado no princípio de que a mesma fique aderida na superfície das hifas, como ocorre no caso da formação de líquen (Figura 2.4).

Segundo Tortora, Funke e Case (2012), líquens são formados por uma relação mutualística entre algas verdes ou cianobactérias e fungos filamentosos, que habitam áreas em que nenhum dos organismos que os compõem poderiam sobreviver sozinhos. Os líquens podem ser utilizados para obtenção de ácidos orgânicos, corantes ou agentes antimicrobianos. O talo (ou corpo) de um líquen se forma a partir do crescimento das hifas ao redor das células de microalgas ou

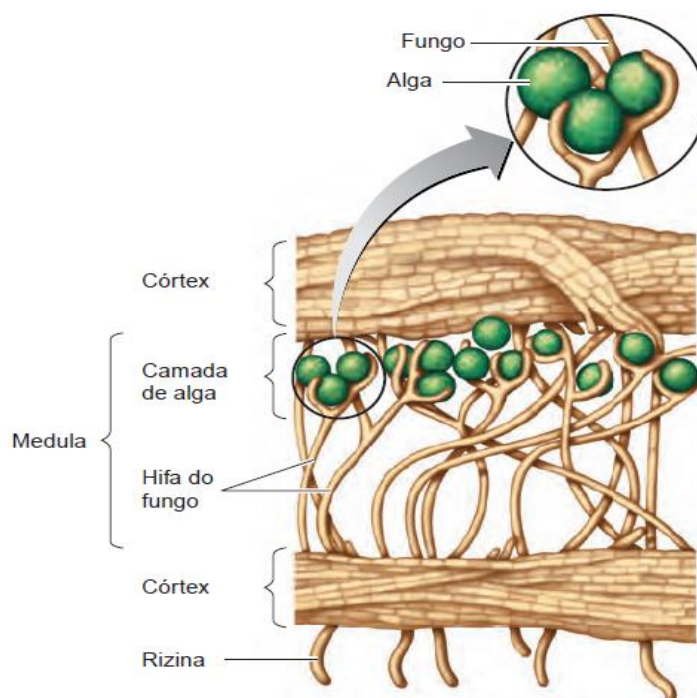
cianobactérias, se tornando a medula. Abaixo do talo, hifas projetadas formam as estruturas de fixação chamadas rizinas. Acima e, por vezes, abaixo das células é formada uma camada protetora chamada córtex (Figura 2.5).

**Figura 2.4: Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *pellets* de microalga e fungo.**



Fonte: Srinuanpan et al. (2018).

**Figura 2.5: Talo do líquen**



Fonte: Tortora, Funke e Case (2012).

Ao crescer na forma de líquen, mais de 60% dos produtos da fotossíntese de algas ou cianobactérias são excretados pelas células, fornecendo matéria orgânica necessária para o desenvolvimento do fungo filamentosos. Em contrapartida, a alga ou cianobactéria recebe proteção contra dessecação e facilidade para fixação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Uma teoria sobre o mecanismo de floculação da biomassa algácea com *pellets* fúngicos é a de que a superfície carregada das hifas interage com a superfície celular das microalgas (WREDE et al., 2014; ZHANG; HU, 2012). Dessa forma, as células de microalgas e cianobactérias aderem à superfície ou são aprisionadas no interior dos *pellets* (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014). Isso ocorre porque muitas microalgas e cianobactérias são carregadas negativamente e alguns fungos possuem grupos funcionais protonados no pH do cultivo (pH 4), tornando-se positivamente carregados (BHATTACHARYA et al., 2017). Porém, mesmo com ambas linhagens fúngicas e algas com cargas superficiais negativas, a *pelletização* pode ocorrer. É o caso da *pelletização* de *Chlorella vulgaris* com *Aspergillus niger* (ZAMALLOA et al., 2017), indicando que a atração de cargas pode não ser o principal mecanismo do processo.

Feofilova (2010) sugere que a atração pode estar ligada à produção de ácidos orgânicos por parte dos fungos, o que pode fazer com que a parede celular se torne mais ácida que o meio externo. Propriedades superficiais, como a presença de proteínas hidrofóbicas, também podem estar relacionadas com o mecanismo da biofloculação, promovendo a agregação das células algáceas nos *pellets*, já que tais proteínas têm como função a aderência das hifas a substratos sólidos (FEOFILOVA, 2010).

Bhattacharya (2017), para compreender melhor os mecanismos envolvidos na biofloculação, realizaram testes com *pellets* em três condições diferentes: vivos, pré-tratados com cicloheximida e autoclavados. No primeiro caso, a eficiência de floculação foi bastante elevada (95%), enquanto nos outros dois foi significativamente menor (15% e 0%, respectivamente). Tais resultados sugerem que, para a ocorrência da biofloculação, é necessário que os fungos estejam vivos e com metabolismo ativo.

Li, Y et al. (2017) realizaram diversos tratamentos preliminares nos *pellets*, buscando a inativação das proteínas superficiais dos *pellets* fúngicos (e.g.



temperatura, ácido, base, proteinase), e em todos os testes houve uma redução significativa da eficiência de floculação, indicando o papel essencial das proteínas na floculação. Neste mesmo estudo, também foram realizados testes de floculação com o material intra e extracelular, além do micélio fúngico propriamente dito; os resultados apontaram que a atividade floculante está no próprio micélio, com os materiais intra e extracelulares levando a eficiências de floculação muito reduzidas.

## **2.4.2 Efeito de condições de cocultivo na biofloculação**

### **2.4.2.1 Método de inoculação**

Os esporos fúngicos podem ser inoculados diretamente na suspensão de biomassa algácea (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014; ZAMALLOA et al., 2017; ZHANG; HU, 2012; ZHOU et al., 2012, 2013), consistindo no método de inoculação *fungus spore – algae* (FSA). Ou o cultivo do fungo pode ser feito separadamente e os *pellets* formados utilizados como floculantes em um cocultivo posterior com as células algáceas (BHATTACHARYA et al., 2017; CHOI et al., 2016; LI et al., 2017b; MURADOV et al., 2015; SRINUANPAN et al., 2018; WREDE et al., 2014), constituindo o método *fungus pellet – algae* (FPA).

Enquanto o primeiro método apresenta a vantagem de o cultivo dos microorganismos poder ser realizado em um mesmo reator, questões como a inibição do crescimento do fungo devido aos elevados pH e tempo de cocultivo são problemas que podem ser superados com a utilização de *pellets* pré-cultivados (BHATTACHARYA et al., 2017).

Chen et al. (2018) realizaram um estudo comparativo dos dois métodos, chegando à conclusão de que o método FPA necessita da adição de menos matéria orgânica e atinge altas eficiências em um tempo menor, podendo ser considerado um método mais promissor que o FSA. No entanto, a concentração de glicose foi uma variável importante em ambos os métodos. Além disso, neste estudo, a temperatura se mostrou um fator determinante para o alcance de elevadas eficiências no método FSA.

### 2.4.2.2 pH

No método FSA, durante o crescimento do fungo no cocultivo é observada uma queda no pH, assim como muitas vezes ocorre no cultivo do fungo puro, devido à produção de ácidos orgânicos. Observando diferentes faixas de pH, percebe-se que a formação dos *pellets* se dá mais rapidamente em valores de pH mais baixos e que quanto maior o inóculo, menor é o pH ao final do cocultivo, devido à maior quantidade de células fúngicas no meio (ZHOU et al., 2013).

Já quando o cocultivo é realizado com *pellets* pré-cultivados (método FPA), o pH não parece ter efeito significativo na flocculação da cianobactéria, como é o caso do estudo realizado para a flocculação de *Synechocystis sp.* com *Aspergillus oryzae*, indicando que o pH pode ser um fator importante para a *pelletização* de fungos, mas não para a adesão da biomassa algácea aos *pellets*. Além disso, nesse estudo, o pH final foi ligeiramente superior ao pH inicial, tendo valores finais próximos entre si para todos os valores iniciais de pH utilizados (5,4, 6,1 e 7,4) (CHOI et al., 2016). Chen et al. (2018) também realizaram uma avaliação da variação do pH durante o cocultivo de *Chlorella sp.* com *Penicillium sp.* e atingiram quase 100% de eficiência com pH igual a 4, ligeiramente superior aos resultados obtidos com pH igual a 3 e 3,5.

Bhattacharya et al. (2017), por outro lado, observaram uma queda no pH ao longo do cocultivo de *Chlorella pyrenoidosa* com *Aspergillus fumigatus*. Essa queda é acentuada quando não há grupos funcionais com pKa na faixa de pH do meio, mas é suavizada quando este se aproxima do pKa de um grupo funcional presente na biomassa. Dessa forma, percebe-se uma tendência do pH final do cultivo para valores próximos dos valores de pKa de grupos funcionais presentes na superfície celular das espécies utilizadas.

### 2.4.2.3 Temperatura

A temperatura do cocultivo pode ser um fator importante na bioflocculação com o método FPA, segundo Bhattacharya et al. (2017), que realizaram a flocculação de *Chlorella pyrenoidosa* com *Aspergillus fumigatus*. Em temperaturas mais baixas, entre 28°C e 34°C, as eficiências de flocculação após 4 h foram menores que 20%. Já a 36°C, a eficiência atingiu 35% no mesmo tempo. E a 38°C e 42°C, após 4 h

ocorreu a floculação quase total da biomassa presente (99% de eficiência).

Chen et al. (2018) também perceberam a influência da temperatura na floculação de *Chlorella sp.* com *Penicillium sp.*. Com o método de floculação FSA, temperaturas mais altas (40°C) resultaram em formação mais rápida dos *pellets* e maior eficiência de floculação. Contudo, quando a temperatura foi de 45°C, as células da microalga morreram e o meio se tornou amarelado. Com a floculação FPA, a temperatura com maior eficiência de floculação foi mais baixa (34°C), o que resultaria em um menor custo energético.

#### 2.4.2.4 Concentração de biomassa

A concentração inicial de biomassa pode interferir na floculação quando é utilizado o método FSA. Concentrações muito elevadas de biomassa algácea podem prejudicar o crescimento do fungo e a eficiência de floculação. Um estudo constatou a redução da eficiência quando a concentração de *Chlorella vulgaris* foi elevada de  $2,55 \cdot 10^9$  células/L (eficiência de 90%) para  $8,50 \cdot 10^9$  células/L (eficiência de 0,7%) durante a floculação com *Aspergillus niger* (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014). Além disso, o número e o tamanho dos *pellets* também foram reduzidos, indicando que o crescimento do fungo filamentoso foi prejudicado pelas elevadas concentrações iniciais de microalga no cocultivo.

Já a concentração inicial de esporos não tem efeitos tão significativos neste método, sendo obtidas eficiências muito semelhantes com diferentes concentrações. Contudo, se a concentração for muito baixa, ocorre um favorecimento das células algáceas no cocultivo, resultando em uma menor quantidade de células fúngicas na composição dos *pellets* e reduzindo a eficiência de floculação (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014). Já com concentrações muito altas, pode não ocorrer a observação de *pellets* do fungo filamentoso (ZHOU et al., 2013), o que também pode ser observado em cultivos puros de fungos filamentosos (PAPAGIANNI; MATTEY, 2006).

Quando utilizado o método FPA, a quantidade de *pellets* adicionada ao cultivo da microalga ou cianobactéria se torna um fator importante. A eficiência de floculação é diretamente proporcional ao número de *pellets* utilizado (BHATTACHARYA et al., 2017; CHOI et al., 2016; SRINJANPAN et al., 2018), assim como ocorre na floculação química, na qual quanto maior a quantidade de floculante, maior a

eficiência. Da mesma forma que com floculantes químicos, a partir de uma dada concentração não há um aumento tão expressivo na eficiência com o aumento da quantidade de *pellets*. Tal fato é perceptível com a observação de eficiências próximas (99%) ao utilizar-se valores iniciais da razão entre fungo e biomassa algácea de 1:3 e 1:5 (BHATTACHARYA et al., 2017) e ao utilizar-se 6 ou 8 *pellets*, alcançando eficiências maiores que 90% (CHOI et al., 2016). Srinuanpan et al. (2018) sugeriram que há um limite de sítios para as células aderirem às hifas, logo, com uma razão fungo/alga menor, pode ocorrer que todos estejam ocupados, o que impediria que todas as células fossem removidas da suspensão, resultando em eficiências de floculação reduzidas.

#### **2.4.2.5 Tempo de cultivo do fungo**

Esta variável é aplicável apenas para o método FPA. Bhattacharya et al. (2017) realizaram testes com *Aspergillus fumigatus* em diversos estágios de desenvolvimento para concentrar *Chlorella pyrenoidosa*. Com *pellets* mais novos (24 h), nos quais a maioria das hifas estava viável, a eficiência de floculação foi muito maior (95%) do que com *pellets* mais antigos (72 h, 6%), nos quais já ocorrera alguma degeneração na estrutura das hifas.

Outros estudos, contudo, atingiram eficiências elevadas utilizando fungos cultivados por 72 h (MURADOV et al., 2015; WREDE et al., 2014), mas estes não avaliaram as eficiências obtidas com outros tempos de cultivo dos *pellets* fúngicos.

#### **2.4.2.6 Agitação**

A influência da velocidade de agitação na floculação, apesar de ser um fator conhecido, tanto para a formação de *pellets* fúngicos em culturas puras, quanto para a floculação química, ainda não foi muito estudada. Em ambos os métodos de inoculação, diversos estudos utilizam 150 rpm (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014; MURADOV et al., 2015; WREDE et al., 2014; ZAMALLOA et al., 2017; ZHANG; HU, 2012) ou 100 rpm (ZHOU et al., 2012) nos experimentos de floculação, obtendo-se bons resultados, mas não avaliando outras velocidades.

Quando são utilizadas velocidades diferentes no método FSA, percebe-se a formação de *pellets* maiores em velocidades de agitação menores, quando o fungo

filamentoso é inoculado diretamente no cultivo de biomassa algácea (ZHOU et al., 2013).

Com o método FPA, Bhattacharya et al. (2017) testaram diversas velocidades (80, 100, 120, 150 rpm), obtendo resultados similares e melhores para as duas velocidades mais baixas (99%) e percebendo uma queda na eficiência quando a agitação foi elevada para 150 rpm (6%). Dessa forma, concluíram que é necessária agitação suficiente para fornecer energia para que as partículas superem as forças de repulsão entre si, mas que também permita o tempo de contato necessário para a agregação.

Já no estudo de Chen et al. (2018), velocidades mais elevadas resultaram em uma maior eficiência de floculação, tanto para o método de floculação FSA quanto para o FPA, sendo 160 rpm a velocidade de agitação com maior eficiência (100%).

#### **2.4.2.7 Fonte de carbono**

Ao se utilizar o método FSA, quando o cocultivo ocorre na ausência de fontes de carbono externas (em condições autotróficas), a *pelletização* é prejudicada, podendo não ocorrer a formação de *pellets* (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014) ou uma formação mais lenta e com eficiência de floculação reduzida (ZHOU et al., 2013). Chen et al. (2018) relataram que com o aumento da concentração de glicose de 2 g/L para 5 g/L se observava o aumento da eficiência de floculação de cerca de 80% para 99% em 36h. Entretanto, quando a concentração foi aumentada para 10 g/L, a floculação não sofreu alteração.

Durante o cocultivo em condições heterotróficas é criada uma competição entre células fúngicas e biomassa algácea. Como o fungo, em geral, consome mais rapidamente os nutrientes, tem o crescimento semelhante ao que teria em uma cultura pura, enquanto o crescimento das microalgas fica menor (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014).

No caso do método FPA, as eficiências de floculação obtidas sem a utilização de fontes de carbono no cocultivo são muito baixas, cerca de 36% (CHOI et al., 2016). Tais evidências indicam que fungos filamentosos não são completamente capazes de se desenvolver utilizando apenas as células algáceas como fontes de alimento. Contudo, outros estudos (MURADOV et al., 2015; WREDE et al., 2014)

relatam a obtenção de eficiências de quase 90% em 24 h sem a adição de fontes externas de carbono.

O cocultivo pode ainda ser conduzido com fontes de carbono alternativas, como acetato de sódio (componente de águas residuárias), glicerol (subproduto da indústria de biodiesel), ou xilose (obtida da hidrólise de resíduos agrícolas), o que pode favorecer a viabilidade econômica do processo (CHOI et al., 2016; GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014). Contudo, ao utilizar tais substratos, as eficiências de floculação podem ser reduzidas frente à utilização de fontes de carbono convencionais, como a glicose (CHOI et al., 2016).

A Tabela 2.2 apresenta os principais fatores que influenciam a biofloculação com fungos e os efeitos que acarretam nos métodos FPA e FSA. Para o método utilizado neste trabalho (FPA), as condições mais favoráveis envolvem temperaturas mais altas, quantidade de *pellets* suficiente adicionada ao cocultivo, e a presença de fontes de carbono no mesmo.

**Tabela 2.2: Efeito de diversas variáveis na biofloculação com fungos filamentosos.**

Variável	FSA <sup>a</sup>	FPA <sup>b</sup>	Referências
<b>pH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH diminui durante o cocultivo;</li> <li><i>Pellets</i> são formados mais rapidamente em valores mais baixos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Não parece ter efeito significativo na floculação;</li> <li>pH tende a valores próximos do pKa de grupos funcionais da superfície das células.</li> </ul>	Bhattacharya et al. (2017); Chen et al. (2018); Choi et al. (2016); Gultom, Zamalloa e Hu (2014).
<b>Temperatura</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Pellets</i> são formados mais rapidamente em temperaturas mais altas, mas com 45°C há deterioração das células.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eficiência aumenta com o aumento da temperatura;</li> <li>Aparentemente a temperatura ótima é menor do que a do método FSA.</li> </ul>	Bhattacharya et al. (2017); Chen et al. (2018).
<b>Concentração de biomassa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Concentrações elevadas de microalgas prejudicam o crescimento do fungo;</li> <li>Concentração de esporos não tem efeitos significativos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A eficiência aumenta até uma certa quantidade de pellets adicionada</li> </ul>	Bhattacharya et al. (2017); Choi et al. (2016); Gultom, Zamalloa e Hu (2014); Srinuanpan et al. (2018); Zhou et al. (2013).
<b>Tempo de cultivo do fungo</b>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tempos de cultivo mais longos parecem prejudicar a biofloculação.</li> </ul>	Bhattacharya et al. (2017)
<b>Agitação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Pellets</i> maiores são formados em velocidades de agitação menores;</li> <li>Já foi relatada a obtenção de uma eficiência maior com uma maior velocidade de agitação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudos relatam que são obtidas eficiências maiores em velocidades menores e maiores de agitação com diferentes pares de fungo e microalga.</li> </ul>	Bhattacharya et al. (2017); Chen et al. (2018); Zhou et al. (2013).
<b>Fonte de carbono</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência ou baixa concentração de fonte de carbono resulta em eficiências reduzidas e formação mais lenta dos <i>pellets</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Foi relatada a diminuição da eficiência na ausência de fonte de carbono.</li> <li>Fontes de carbono alternativas podem resultar na diminuição da eficiência.</li> </ul>	Chen et al. (2018); Choi et al. (2016); Gultom, Zamalloa e Hu (2014); Muradov et al. (2015); Wrede et al. (2014); Zhou et al. (2013).

<sup>a</sup> *Fungal spore-algae*. <sup>b</sup> *Fungal pellet-algae*

Muitas espécies de microalgas e cianobactérias vêm sendo avaliadas para a biofloculação com fungos filamentosos, em especial o gênero *Chlorella*. As espécies de fungo avaliadas também são diversas, mas a maioria dos trabalhos utilizou espécies do gênero *Aspergillus*. A combinação estudada pelo maior número de autores foi a de *Chlorella vulgaris* com *Aspergillus niger* (Tabela 2.3). A maioria dos estudos de biofloculação é realizado com microalgas, havendo apenas um estudo com cianobactéria. Para as espécies estudadas neste trabalho, não foram encontrados estudos sobre biofloculação, sendo reportada a utilização de flotação, filtração e centrifugação para densificação da biomassa (DAVIES et al., 2014; FERREIRA et al., 2012; HAO et al., 2017; KANCHANATIP et al., 2016).

**Tabela 2.3: Espécies utilizadas nos estudos de biofloculação com fungos**

<b>Microalga / Cianobactéria</b>	<b>Fungo</b>	<b>Eficiência de Floculação</b>	<b>Referência</b>
<i>Chlorella protothecoides</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	90%	Muradov et al. (2015)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%	Bhattacharya et al. (2017)
<i>Chlorella sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	98%	Chen et al. (2018)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Aspergillus niger</i>	90-98%	Li, Y et al. (2017); Gultom et al. (2014); Zammaloa et al. (2017); Zhang e Hu (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	93%	Zhou et al. (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	~100%	Zhou et al. (2012)
<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	94%	Srinuanpan et al. (2018)
<i>Synechocystis sp.</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	90%	Choi et al. (2016)
<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	80%	Muradov et al. (2015)

**Fonte: Elaboração própria (2018)**

Na revisão dos efeitos das condições é possível perceber diferença nas eficiências obtidas para cada par de micro-organismos estudado, o que sugere que as melhores condições estão relacionadas com os organismos envolvidos no processo, sendo necessários mais estudos para compreender os mecanismos envolvidos na biofloculação com fungos filamentosos e determinar as condições ótimas para cada par de micro-organismos.

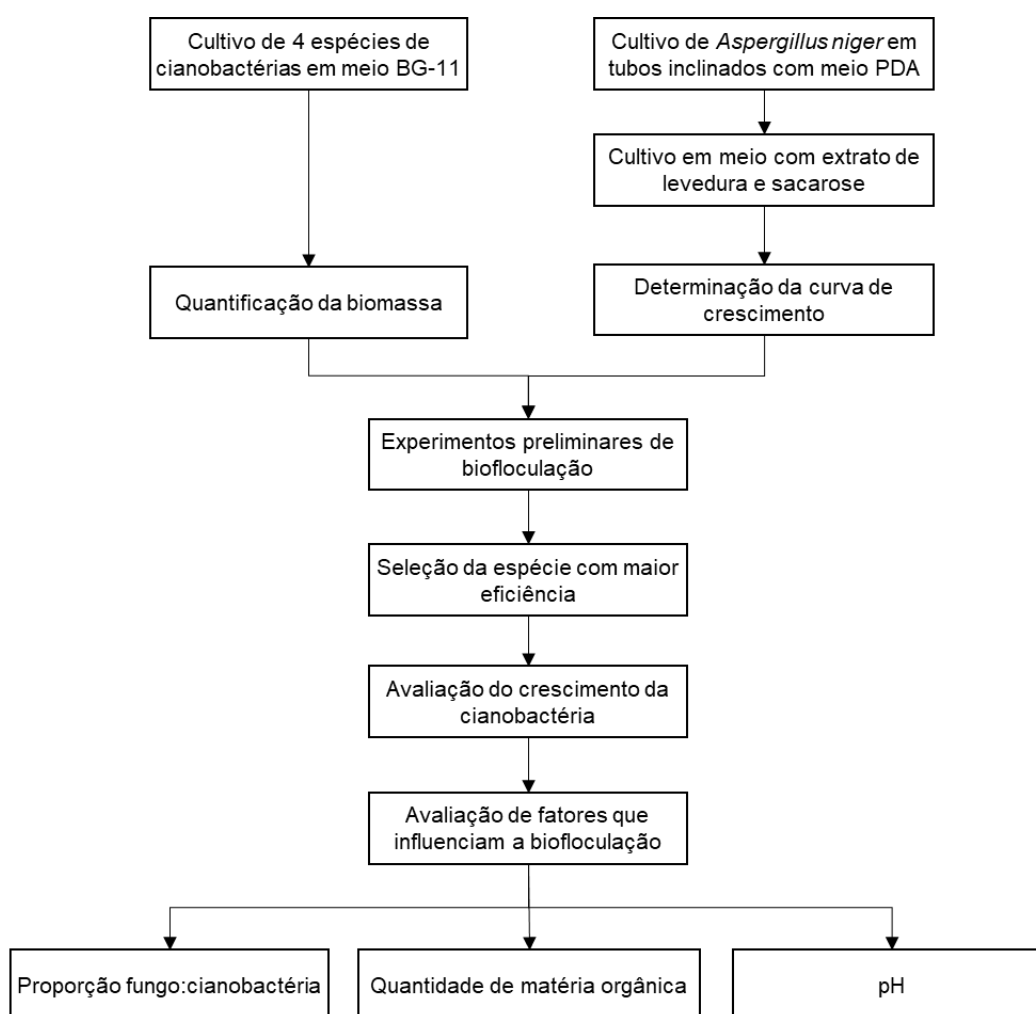


### 3 METODOLOGIA

Neste capítulo são apresentados os procedimentos de cultivo das cianobactérias e do fungo filamentososo e dos experimentos de biofloculação, bem como equipamentos e produtos químicos usados no estudo.

A Figura 3.1 apresenta um diagrama de blocos com a sequência de procedimentos utilizados. Inicialmente, foram realizados experimentos preliminares com quatro espécies de cianobactérias: *Anabaena siamensis*, *Anabaena variabilis*, *Spirulina maxima* e *Synechococcus subsalsus*. Em uma segunda etapa do estudo, foram realizados experimentos adicionais somente com a espécie que apresentou maior eficiência de biofloculação (*S. subsalsus*).

**Figura 3.1: Sequência de procedimentos utilizados no estudo de biofloculação de biomassas de cianobactéria com o fungo *Aspergillus niger***



Fonte: Elaboração própria (2018)

### 3.1 Cultivo de *Aspergillus niger*

#### 3.1.1 Crescimento e manutenção dos esporos

A linhagem de *Aspergillus niger* utilizada foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia do Petróleo, localizado na Escola de Química da UFRJ. Para a produção de esporos, foi preparado o meio *Potato Dextrose Agar* (PDA - Kasvi) com 1% de ágar bacteriológico (Reagen). Após esterilização a 121°C por 15 minutos, tubos de ensaio contendo o meio foram inclinados e mantidos à temperatura ambiente até solidificação do meio. Após inoculação de esporos da cultura de origem, com o auxílio de alça descartável estéril em capela de fluxo laminar (Elzividros), os tubos foram incubados em estufa (Quimis) a 28 °C por 5 a 7 dias.

A cultura se apresentou densa e com coloração preta, típica da espécie, como observado na Figura 3.2. Após o período de cultivo, os tubos foram armazenados a 4°C, sendo realizados repiques sempre que necessário para o preparo da suspensão de esporos empregada nos experimentos.

**Figura 3.2: Aspecto macroscópico do fungo *Aspergillus niger* utilizado nos experimentos**



Fonte: Acervo pessoal (2017)

### 3.1.2 Preparo da suspensão de esporos

A suspensão de esporos foi preparada em tubos com tampa rosqueada contendo 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 7 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Vetec), 0,1 mL de Tween 80 (Sigma-Aldrich) e cerca de 10 pérolas de vidro. Os tubos, contendo o tampão e demais componentes, foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Com o auxílio de uma alça descartável estéril, os esporos foram transferidos do tubo de ensaio inclinado com meio PDA para o tubo com tampão (sendo realizadas 3 raspagens por tubo), que foi submetido à agitação em vortex (Phoenix - AP56), com velocidade mediana, durante 3 minutos. Uma alíquota foi transferida para câmara de Neubauer, na qual os esporos foram contados utilizando-se um microscópio óptico (Zeiss) com aumento de 400 vezes. Quando necessário, para facilitar a contagem, a suspensão era diluída com água destilada em um tubo de ensaio. A concentração da solução de esporos foi calculada a partir da equação 3.1.

$$\text{Concentração (esporos / mL)} = M * 25 * d * 10^4 \quad (3.1)$$

Onde:

M: média dos esporos contados,

25: número total de quadrantes,

d: fator de diluição empregado,

$10^4$ : fator de correção do volume.

### 3.1.3 Obtenção dos *pellets*

A obtenção dos *pellets* de *A. niger* se deu por fermentação submersa em erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de meio de cultivo, ambos esterilizados a 121 °C durante 15 minutos em autoclave (Prismatec) e armazenados a 4°C, até o momento de uso, por até 30 dias. O meio continha 15 g/L de extrato de levedura (Reagen) e 10 g/L de sacarose (Vetec) e pH de  $5,7 \pm 0,1$ .

O volume de inóculo (suspensão de esporos obtida no item 3.1.2) foi calculado para uma concentração inicial de  $10^5$  esporos/mL.

Experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito da intensidade de agitação e do pH inicial sobre o crescimento do fungo, sendo estudados valores de 100 e 150 rpm para a agitação e de 4,0 e 5,7 (sem ajuste) para o pH. Os erlenmeyers foram incubados em *shaker* (Nova Ética – 430 RDB) a 28 °C durante 24 h. O crescimento foi avaliado por meio de análises de sólidos suspensos totais (SST).

Nos demais experimentos, os erlenmeyers foram incubados em *shaker* (Nova Ética – 430 RDB) a 28 °C e 150 rpm, sem ajuste de pH, por 24, 48 ou 72 h. Durante o cultivo foram acompanhadas as características do meio (pH e densidade óptica) e dos *pellets* (diâmetro).

#### **3.1.4 Determinação da curva de crescimento da linhagem de *Aspergillus niger***

Para a determinação da curva de crescimento da linhagem de *A. niger*, o fungo foi cultivado em dois experimentos independentes nas condições descritas no item 3.1.3, utilizando em cada um dos experimentos três erlenmeyers cujos cultivos foram interrompidos em tempos diferentes (24, 48 e 72 h). Os cultivos finalizados em 24, 48 ou 72 h foram submetidos a análises de concentração de biomassa e substrato.

Para quantificar a biomassa fúngica nos cultivos, foi realizada a análise de sólidos suspensos totais (SST), e para quantificação de matéria orgânica (substrato), a análise de Demanda Química de Oxigênio solúvel (DQO), ambas de acordo com o Standard Methods (APHA, 2005).

Valores médios de SST foram utilizados nos cálculos do volume da suspensão de *pellets* a ser transferido para o cultivo da cianobactéria nos experimentos de biofloculação. A integridade das hifas fúngicas em cada tempo de cultivo foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

## **3.2 Cultivo das cianobactérias**

Nos testes preliminares de biofloculação foram avaliadas quatro espécies de cianobactérias: *Anabaena siamensis*, *Anabaena variabilis*, *Spirulina maxima*

e *Synechococcus subsalsus*. As três primeiras foram obtidas da Coleção de Microalgas do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF) do Instituto de Química da UFRJ, enquanto a última foi obtida do Banco de Microalgas Aidar & Kutner (BMA&K), do Instituto Oceanográfico da USP. Nos demais experimentos foi utilizada somente a cianobactéria *Synechococcus subsalsus*.

Todas as cianobactérias foram cultivadas em meio BG-11, cuja composição é descrita nas Tabelas 3.1 e 3.2.

**Tabela 3.1: Composição do meio de cultivo das cianobactérias (BG-11)**

<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Nitrato de Sódio	NaNO <sub>3</sub>	1,500
Fosfato de Potássio Dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,040
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
Cloreto de Cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036
Ácido Cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,006
Citrato Férrico Amoniacal	(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,006
EDTA	-	0,001
Carbonato de Sódio	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,020
Mistura de Metais Traço	-	1 mL/L

Fonte: Cyanosite (2018)

**Tabela 3.2: Composição da mistura de metais traço para o preparo do meio BG-11**

<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8600
Cloreto de Manganês	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,8100
Sulfato de Zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2220
Molibdato de Sódio	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,3900
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0790
Cloreto de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0404

Fonte: Adaptado de Cyanosite (2018)

Nos experimentos preliminares, a quantificação da biomassa foi feita a partir de curvas de peso seco fornecidas pelo laboratório H2CIN, que relacionam a massa em base seca com a densidade óptica (DO) da suspensão. Para as

espécies *A. variabilis*, *A. siamensis* e *S. subsalsus*, a DO foi analisada a 750 nm, em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. Já para a espécie *S. maxima*, a curva foi baseada no trabalho de dos Santos et al. (2016), que analisou a DO a 730 nm, no mesmo espectrofotômetro. Na Tabela 3.3 são apresentadas as equações que relacionam a concentração com a densidade óptica, bem como o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do ajuste dos dados.

O peso seco para todas as espécies foi obtido por meio de filtração à vácuo com membranas de fibra de vidro. As membranas foram previamente pesadas e, após filtração, secas em estufa a 100°C por duas horas. Após resfriamento em dessecador, as membranas foram novamente pesadas e o peso seco (C, em g/L) calculado pela diferença entre a massa final e inicial das membranas dividida pelo volume de suspensão filtrada.

**Tabela 3.3: Curvas de peso seco para quantificação das cianobactérias**

<b>Espécie</b>	<b>Curva de Peso Seco</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<i>Spirulina maxima</i>	$C = \frac{DO_{730nm}}{1,8158}$	0,995
<i>Anabaena variabilis</i>	$C = \frac{DO_{750nm} - 0,0125}{2,045}$	0,996
<i>Anabaena siamensis</i>	$C = \frac{DO_{750nm} - 0,0164}{2,0135}$	0,993
<i>Synechococcus subsalsus</i>	$C = \frac{DO_{750nm} - 0,0036}{2,1379}$	0,998

**Fonte: H2CIN; dos Santos et al. (2016).**

Na segunda etapa do estudo, a densidade óptica (DO) do cultivo de *Synechococcus subsalsus* foi analisada a 750 nm, em espectrofotômetro Hach (DR3900). O peso seco foi obtido por meio da metodologia de sólidos suspensos totais (SST). A equação 3.2 apresenta a curva de peso seco obtida para a cianobactéria, cujo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi 0,993 e o limite de linearidade de  $DO_{750nm} = 0,907$ .

$$C = \frac{DO_{750nm}}{1,8766} \quad (3.2)$$

Onde:

$DO_{750nm}$ : densidade óptica a 750 nm,

C: SST em g/L.

### 3.3 Experimentos preliminares de biofloculação com *Aspergillus niger*

Inicialmente, foram realizados experimentos para determinação do potencial de biofloculação de quatro espécies de cianobactérias com *pellets* de *A. niger*. A biomassa de cianobactérias utilizada nos experimentos preliminares foi cultivada e fornecida pelo Laboratório de Hidrorrefino, Engenharia de Processos e Termodinâmica Aplicada (H2CIN) da Escola de Química da UFRJ. O cultivo foi realizado em erlenmeyers de 250 mL, com 100 mL de meio BG-11 a 26°C e fotoperíodo de 12 h, com intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol}$  fótons/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$ , por cerca de 1 mês. O inóculo era feito por meio da transferência de 10% do volume de um cultivo mais antigo.

Utilizando curvas de peso seco dos cultivos de cianobactérias, apresentadas na Tabela 3.3, e a curva de crescimento determinada para o fungo (item 3.1.4), os volumes das suspensões a serem adicionados para obtenção da proporção fungo: cianobactéria desejada (1:1 g SST/ g SST) foram calculados. Essa proporção foi escolhida por ser um pouco maior do que a utilizada por Bhattacharya et al. (2017), que obteve melhor resultado com as proporções 1:3 e 1:5, de modo a garantir que a floculação ocorreria caso as espécies utilizadas fossem compatíveis.

O preparo do inóculo e do meio de cultivo do fungo filamentosos, assim como todas as operações que exigiam assepsia, foram realizados no Laboratório de Microbiologia Industrial, enquanto os demais procedimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LTA). Os laboratórios citados estão localizados nas dependências da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de volume útil, em duplicata (exceto para *Spirulina maxima*, devido a insuficiência de biomassa). Utilizando a câmara de fluxo laminar, os volumes das suspensões de cianobactérias e do fungo com 24 h de cultivo foram transferidos para erlenmeyers previamente autoclavados a 121 °C por 15 min, sendo retirada uma alíquota para a determinação da DO no tempo zero.

O cocultivo foi realizado por 24 ou 48 h em *shaker* com velocidade de

agitação de 100 rpm (BHATTACHARYA et al., 2017) e temperatura de 28°C. Alíquotas foram retiradas ao final dos cocultivos para determinação da eficiência de biofloculação. No caso de cocultivos de 48 h, também foi retirada uma alíquota com 24 h de cultivo.

A eficiência de biofloculação foi calculada utilizando a equação (3.3), que representa a diminuição da densidade óptica do sobrenadante durante o experimento. A densidade óptica foi analisada para cada espécie nos comprimentos de onda dispostos na Tabela 3.3 e na equação 3.2.

$$\text{Eficiência de Biofloculação (\%)} = \left( \frac{DO_i - DO_t}{DO_i} \right) * 100 \quad (3.3)$$

Onde:

DO<sub>i</sub>: Densidade óptica inicial do sobrenadante,

DO<sub>t</sub>: Densidade óptica do sobrenadante no tempo t.

### 3.4 Experimentos com a cianobactéria *Synechococcus subsalsus*

A cianobactéria que apresentou maior eficiência de biofloculação nos testes preliminares (*S. subsalsus*) foi empregada nos experimentos para estudo da influência de alguns fatores na biofloculação com *pellets* de *A. niger*.

O preparo do inóculo e dos meios de cultivo do fungo filamentosos e da cianobactéria empregados nesta segunda etapa do estudo também foram realizados no Laboratório de Microbiologia Industrial, enquanto os demais procedimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LTA).

Durante a realização dos experimentos, foi mantido um banco de células de *S. subsalsus* em erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de meio BG-11, sem agitação e com iluminação proveniente de uma lâmpada de LED de 17 W, que proporcionou uma intensidade luminosa média de 32 μmol fótons/m<sup>2</sup>.s. O fotoperíodo empregado foi de 12 h, mas não houve controle de temperatura, que manteve valor médio de 26 ± 2 °C. Esses cultivos foram utilizados para inoculação dos cultivos nos experimentos de floculação.

Para a realização dos experimentos, a biomassa foi cultivada durante cerca de 1 mês em erlenmeyers de 500 mL, com 300 mL de meio BG-11 em



*shaker* (Cientec - CT712RN), a 150 rpm com controle de temperatura e agitação e iluminação proveniente de uma lâmpada de LED de 15 W. A intensidade luminosa média dos cultivos foi de 43  $\mu\text{mol f\acute{o}tons/m}^2\cdot\text{s}$  (COSTA et al., 2018). A temperatura empregada foi de 23°C e o fotoperíodo de 12 h (LOURENÇO et al., 2002).

A quantificação da biomassa foi feita a partir de curva de peso seco elaborada para a espécie *S. subsalsus* (equação 3.2).

### 3.4.1 Determinação do crescimento microbiano

Para construção das curvas de crescimento da cianobactéria, foram retiradas alíquotas ao longo de cultivos realizados nas condições descritas no item 3.4. A DO inicial dos cultivos ( $0,065\pm 0,010$ ) e de cada alíquota retirada foi convertida em peso seco para determinar o perfil de crescimento da cianobactéria.

### 3.4.2 Biofloculação com *Aspergillus niger*

Os cultivos utilizados nos testes de biofloculação de *Synechococcus subsalsus* foram iniciados com a mesma DO utilizada na construção da curva de crescimento da cianobactéria ( $0,065\pm 0,010$ ). Utilizando curvas de peso seco dos cultivos de cianobactérias e curvas de crescimento determinadas para o cultivo fúngico, os volumes das suspensões a serem adicionados de acordo com a proporção fungo:cianobactéria desejada (1:1 g SST/ g SST) foram calculados. O fungo utilizado foi cultivado por 24 h.

Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de volume útil, em *shaker* com velocidade de agitação de 100 rpm e temperatura de 28°C, em duplicata. O cocultivo foi realizado por até 48 h, sendo retiradas alíquotas a cada 24 h para avaliação da eficiência de biofloculação, calculada utilizando a equação (3.3).

A eficiência de floculação foi avaliada quando a quantidade de fungo adicionada era relativamente menor, adotando-se uma menor proporção fungo:cianobactéria 1:5 (g SST/ g SST). Nesta mesma proporção, também foi avaliado o efeito da quantidade de matéria orgânica no cocultivo, mantendo-se

as demais condições, sem e com adição dos componentes do meio de cultivo do fungo (sacarose e extrato de levedura), conforme apresentado na Tabela 3.4. Nesta Tabela, a porcentagem de reposição se refere ao percentual da massa original do meio de cultivo adicionada ao cocultivo. Foi avaliada, além da DO do sobrenadante, a sua DQO solúvel e o diâmetro dos *pellets* durante o cocultivo.

**Tabela 3.4: Quantidades de sacarose e extrato de levedura adicionadas ao cocultivo (com 100 mL)**

Condição	Sacarose (g)	Extrato de levedura (g)	Porcentagem de reposição (%)
0	0	0	0
1	0,14	0,22	14
2	0,46	0,69	46
3	0,81	1,22	82
4	0,96	1,44	96

Fonte: Elaboração própria (2018)

O efeito do pH sobre a biofloculação também foi avaliado na condição com reposição dos nutrientes (condição 1), com ajuste do pH do cocultivo para valores entre 3,0 e 6,0, além do controle sem ajuste de pH (pH = 8,1).

Devido a uma suspeita de contaminação no cocultivo, foi realizada a preparação de lâminas a fresco e com coloração de Gram (MOREIRA; CARVALHO; FROTA, 2015) do cultivo estéril de *S. subsalsus* e do sobrenadante do cocultivo, observadas em microscópio óptico (Zeiss) sob aumento de 1000 vezes.

De modo a comparar os resultados obtidos com as diferentes condições estudadas, foi calculada a densificação das suspensões de cianobactérias. O cálculo do fator de concentração foi feito a partir da equação 3.4.

$$\text{Fator de Concentração} = \frac{(C_i - C_f) * 0,1}{C_i} * \frac{1000}{V_{\text{pellets}}} \quad (3.4)$$

Onde

$C_i$ : concentração inicial de cianobactérias no sobrenadante do cocultivo (g SST/L),

$C_f$ : concentração final de cianobactérias no sobrenadante do cocultivo (g

SST/L),

$V_{pellets}$ : Volume aproximado de *pellets* no cocultivo (mL).

As concentrações inicial e final de cianobactérias no cocultivo foram obtidas da conversão das respectivas densidades ópticas por meio da curva de peso seco. A diferença entre estas concentrações multiplicada pelo volume do sobrenadante do cocultivo (0,1 L) representa a quantidade de biomassa presente nos *pellets*. A divisão dessa massa pelo volume ocupado pelos *pellets* resulta na concentração de cianobactéria nos mesmos. O volume ocupado pelos *pellets* após o cocultivo foi calculado através da multiplicação do volume de um *pellet* (considerando a forma esférica e o diâmetro médio dos *pellets*) pela quantidade aproximada de *pellets* adicionados no cocultivo.

### 3.5 Métodos analíticos

#### 3.5.1 pH

O pH foi medido em potenciômetro digital (Quimis), previamente calibrado com soluções tampão (Quimis) de 4,01, 6,86 e 9,18.

#### 3.5.2 Sólidos Suspensos Totais

A análise de Sólidos Suspensos Totais (SST) foi realizada em triplicata para cada tempo de cultivo, seguindo metodologia padrão (APHA, 2005). Cadinhos de porcelana foram levados à mufla (Fornos Lavoisier) por 1 h, a 550°C. Filtros de fibra de vidro lavados com água destilada foram também levados à mufla por 15 minutos. Após resfriamento em dessecador foi obtida a massa inicial ( $P_0$ ) do conjunto cadinho e filtro. Alíquotas de um volume ( $V$ ) das amostras foram filtradas à vácuo e o material retido no filtro foi lavado com água destilada. Os cadinhos com os filtros utilizados foram levados à estufa (Ética) a 105°C para evaporação da água e, após resfriamento em dessecador, foi obtida a massa do conjunto ( $P_1$ ). A concentração de sólidos suspensos totais (em g/L) foi calculada a partir da equação (3.5).

$$SST (g/L) = \frac{(P_1 - P_0)}{V} \quad (3.5)$$

Onde:

$P_0$  = massa inicial do conjunto cadinho + filtro, em gramas;

$P_1$  = massa após evaporação da água do conjunto cadinho + filtro + amostra, em gramas;

$V$  = volume da alíquota, em litros.

### 3.5.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A análise foi realizada pelo método padrão colorimétrico de refluxo fechado (APHA, 2005). As leituras foram feitas em triplicata para as amostras e em duplicata para o branco. Em cada tubo de DQO foram adicionados 2 mL da amostra filtrada em membrana de 0,45  $\mu$ m (para o branco, 2 mL de água destilada), 1,2 mL da solução digestora ( $K_2Cr_2O_7$  em meio ácido) e 2,8 mL da solução catalítica ( $H_2SO_4$  com  $Ag_2SO_4$  como catalisador e  $HgSO_4$  para eliminar interferência de cloretos). As amostras foram colocadas por 2h a 150°C em digestor (Hach) e, após resfriamento sob ausência de luz, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. A absorbância foi convertida em DQO por meio de curva-padrão previamente preparada com biftalato de potássio.

### 3.5.4 Densidade Óptica

A densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 em cubetas com 10 mm de caminho óptico ou em espectrofotômetro Hach DR3900 em tubos com 13 mm de caminho óptico e no mesmo comprimento de onda utilizado nas curvas de peso seco da espécie de cianobactéria avaliada.

### 3.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

O preparo das amostras para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi feito no Laboratório de Ultraestrutura Celular Herta Meyer (Instituto de Biofísica / UFRJ). Os *pellets* foram lavados 2 vezes com *Phosphate Buffered*

*Saline* (PBS), transferidos para frascos *ependorf* e ressuspensos no fixador (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2). Os *pellets* foram lavados 2 vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e ressuspensos na mistura tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 1,25% e cloreto de cálcio 5 mM, preparada em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Seguiu-se a incubação por 30 minutos no escuro, após a qual os *pellets* foram lavados 3 vezes com cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida, ocorreu a desidratação com concentração crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), permanecendo por 10 minutos em cada concentração. Após a transferência para vidros de inclusão, as amostras foram levadas ao secador de ponto crítico (Leica Microsystems) e metalizadas com ouro no metalizador (Balzers). A observação das amostras foi feita em Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss Auriga 40) no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Imagem (CENABIO).

### **3.5.6 Diâmetro dos *pellets***

A medição do diâmetro dos *pellets* foi feita com o auxílio de uma régua graduada com precisão de 1 mm e incerteza de 0,5 mm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos a partir da aplicação da metodologia descrita no Capítulo 3, bem como uma discussão acerca da interpretação dos mesmos.

### 4.1 Cultivo do fungo *Aspergillus niger*

#### 4.1.1 Obtenção de *pellets* do fungo *Aspergillus niger*

Inicialmente, foi avaliada a influência da velocidade de agitação e do pH sobre o crescimento do fungo *Aspergillus niger* em 24 h de fermentação submersa, conforme descrito no item 3.1.3. O crescimento do fungo se deu na forma de pequenos *pellets* de coloração branca (Figura 4.1), morfologia favorecida pelas condições de cultivo e pelo inóculo com baixa concentração de esporos ((PAPAGIANNI; MATTEY, 2006).

Visualmente, o tamanho e aparência dos *pellets* eram muito similares nas diferentes condições avaliadas, como mostra a Figura 4.1. No entanto, análises de sólidos suspensos totais (SST) para as velocidades de 100 e 150 rpm, com pH inicial 5,7, resultaram em concentrações superiores às obtidas com pH inicial 4,0 (Tabela 4.1), indicando que o menor pH pode ter prejudicado o crescimento do fungo. Para as duas velocidades de agitação com pH 5,7, os valores obtidos não foram estatisticamente semelhantes, sendo selecionados para os demais experimentos uma agitação de 150 rpm e pH inicial 5,7 (sem ajuste).

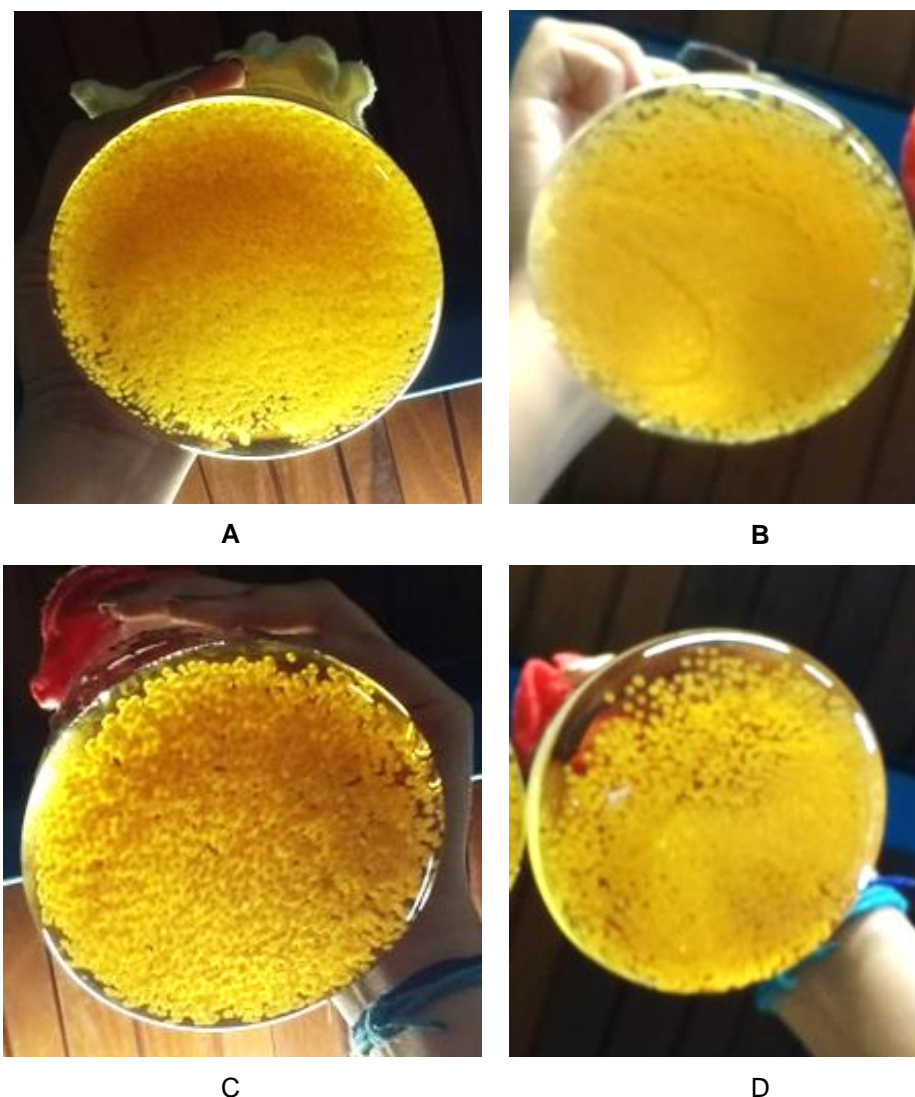
**Tabela 4.1: Valores médios de SST após 24 h de cultivo submerso de *A. niger* a 28°C sob diferentes condições de agitação e pH inicial.**

Condição	SST (g/L) <sup>1</sup>
pH 4,0; 150 rpm	1,990 ± 0,229
pH 5,7; 150 rpm	2,360 ± 0,193
pH 4,0; 100 rpm	1,585 ± 0,134
pH 5,7; 100 rpm	2,975 ± 0,711

<sup>1</sup> Valores de SST médios ± erro padrão da análise em triplicata

Fonte: Elaboração própria (2017).

Figura 4.1: Efeito da velocidade de agitação e pH nos *pellets* do fungo *Aspergillus niger*, cultivado a 28 °C: com pH inicial 5,7 e rotação de 150 rpm (A) e 100 rpm (B); e com pH inicial 4,0 e rotação de 150 rpm (C) e 100 rpm (D).



Fonte: Acervo Pessoal (2017).

Na Tabela 4.2 são apresentados os resultados de tamanho dos *pellets* obtidos, assim como a densidade óptica (DO) a 750 nm do sobrenadante, nos diferentes tempos de cultivo conduzido a 28°C, 150 rpm e pH 5,7. A medição do valor da DO foi feita para avaliar a interferência do meio fúngico na medição da DO do cocultivo, que é muito baixa, visto que os valores obtidos foram muito reduzidos. As variações observadas podem ser devido a pequenas mudanças na coloração do meio ou da interferência de pequenos pedaços de filamentos. Nas primeiras 24 h de cultivo ocorreu o crescimento do fungo na forma de *pellets* de pequeno diâmetro (2 mm). De 48 h a 72 h de cultivo, o diâmetro dos *pellets*

seguiu aumentando (aumento de 2,25 vezes, em relação ao diâmetro de 24 h, após 72 h). Portanto, o meio e as condições de cultivo selecionadas para a obtenção de *pellets* do fungo *A. niger* se mostraram adequados, sendo empregados nos demais experimentos do estudo.

**Tabela 4.2: Tamanho dos *pellets* e densidade óptica do sobrenadante na fermentação submersa com o fungo *A. niger* em meio à base de extrato de levedura e sacarose, a 28°C e 150 rpm.**

Tempo de cultivo (h)	Diâmetro dos <i>pellets</i> (mm)	DO <sub>750nm</sub> do sobrenadante
0	0	0,029
24	2,0	0,036
48	3,5	0,020
72	4,5	0,016

Fonte: Elaboração Própria (2018).

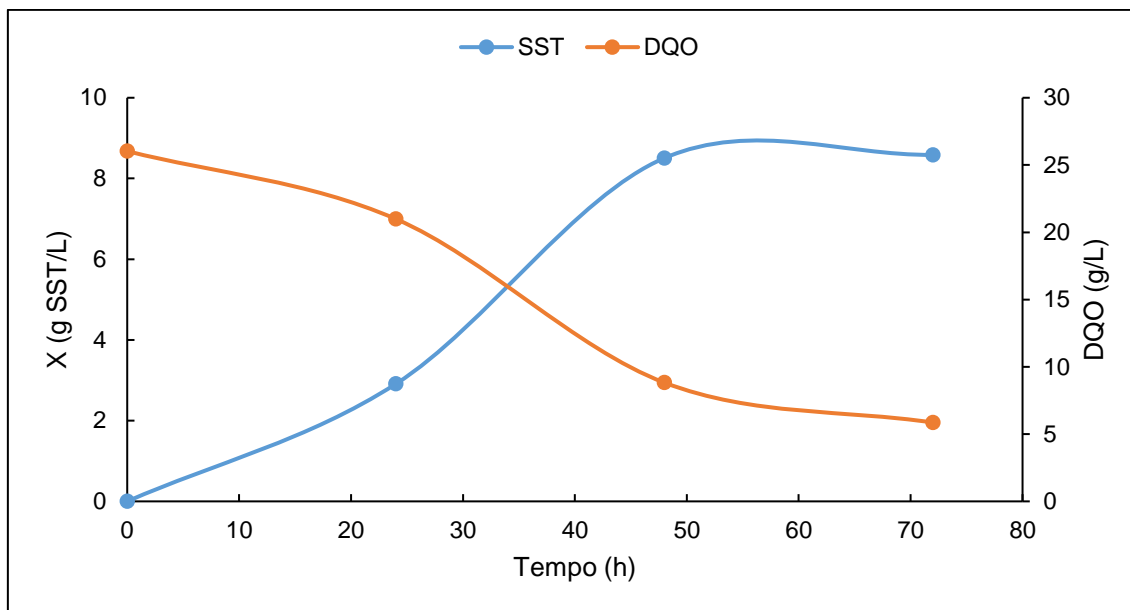
#### 4.1.2 Determinação da curva de crescimento do fungo *Aspergillus niger*

Tendo-se verificado a obtenção dos *pellets*, passou-se ao levantamento da curva de crescimento do fungo, a fim de identificar diferentes estágios de crescimento para os experimentos de biofloculação. Na Figura 4.2, são apresentadas curvas representativas de crescimento do fungo, do consumo de substrato e da variação do pH nas condições de cultivo descritas nos itens 3.1.3 e 3.1.4.

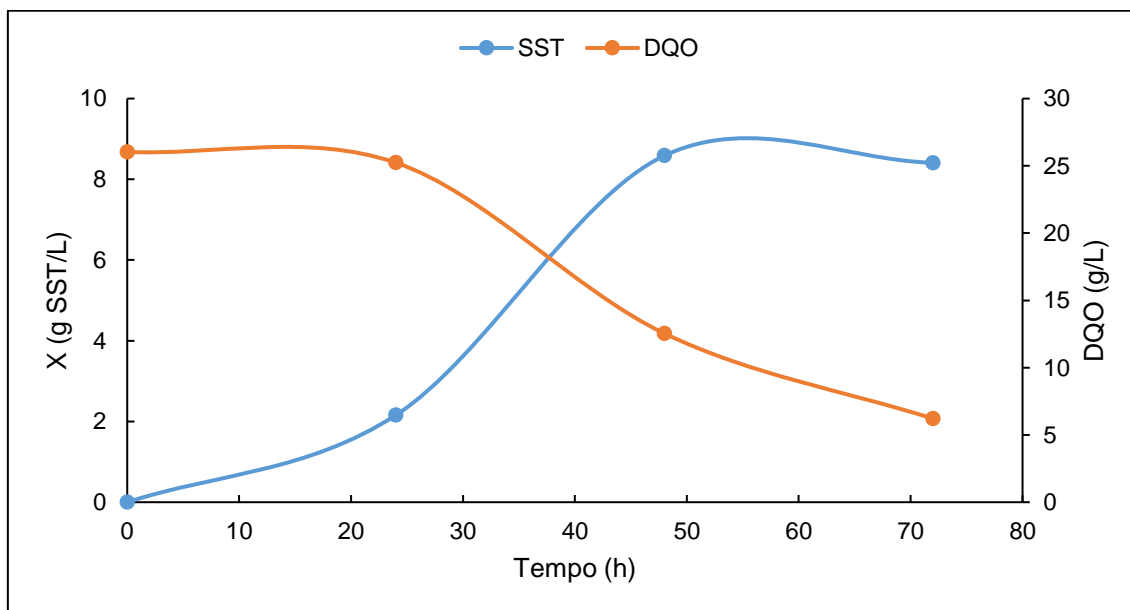
As curva de crescimento foram iniciadas no ponto zero de concentração de SST, porque no tempo zero não foi possível determinar os sólidos suspensos totais (SST), com apenas  $10^5$  esporos/mL de inóculo no meio. De acordo com a Figura 4.2, pode-se verificar um aumento da concentração de SST em função do tempo de cultivo até 48 h, indicando o crescimento da biomassa fúngica. Até 48 h ocorreu um aumento expressivo da concentração de biomassa (de zero para 8,6 g SST/L), indicando a ocorrência da fase exponencial do crescimento entre 24 h e 48 h. Após 48 h não houve mais crescimento da biomassa, indicando o início da fase estacionária.



Figura 4.2: Curvas de crescimento<sup>1</sup> do fungo *Aspergillus niger* em meio à base de extrato de levedura e sacarose, a 28°C e 150 rpm, com cultivos iniciados em dias diferentes (A e B).



A



B

<sup>1</sup> As linhas no gráfico foram adicionadas apenas para facilitar a visualização, não representando a tendência real das curvas.

Fonte: Elaboração Própria (2017).

Compatível com o crescimento do fungo, a concentração de substrato, quantificado como demanda química de oxigênio solúvel (DQO) sofreu redução média de 58% (de 26 g/L para 11 g/L) em 48 h de cultivo, indicando o consumo

do substrato para a manutenção e crescimento das células. No entanto, apesar de ainda se observar uma redução média de 45% na DQO (de 11 g/L para 6 g/L) de 48 para 72 h, não foi observado mais crescimento do fungo. Provavelmente, neste período, o consumo de substrato está relacionado com a produção de metabólitos secundários pelo fungo (NIELSEN et al., 2009).

O pH do meio de cultivo também foi acompanhado e variou entre 4,3 e 5,7, mas ainda permaneceu dentro de valores recomendados para cultivo do fungo - em torno de 5 – (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012) e para a formação de agregados -  $2 < \text{pH} < 8$  – (VECHT-LIFSHITZ; MAGDASSI; BRAUN, 1990; PRIEGNITZ et al., 2012).

Para o cálculo dos volumes de suspensão de biomassa fúngica a serem aplicados nos testes de biofloculação, foram utilizados os valores médios das concentrações de SST obtidas em 24, 48 e 72 h dos dois cultivos realizados (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3: Valores médios de SST para cada tempo de cultivo em meio à base de extrato de levedura e sacarose, a 28°C e 150 rpm.**

Tempo (h)	SST (g/L)
24	2,530
48	8,547
72	8,498

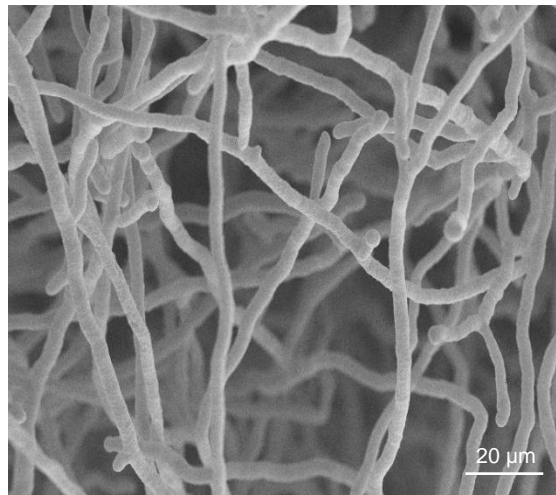
**Fonte: Elaboração Própria (2017).**

A obtenção de *pellets* mais eficientes na biofloculação de microalgas parece depender do tempo de cultivo e da fase de crescimento em que se encontra o fungo. Bhattacharya et al. (2017), a partir de testes com *pellets* do fungo *Aspergillus fumigatus*, cultivado por 24 h e 72 h, notaram que em tempos mais longos de cultivo havia menos células viáveis, provavelmente devido à dificuldade de transferência de nutrientes e oxigênio para o interior dos *pellets*. Além disso, os autores perceberam que a eficiência na biofloculação deste fungo com a microalga *Chlorella pyrenoidosa* era maior com células cultivadas por menos tempo, estabelecendo uma relação entre a atividade celular e a interação das hifas com as células algáceas.

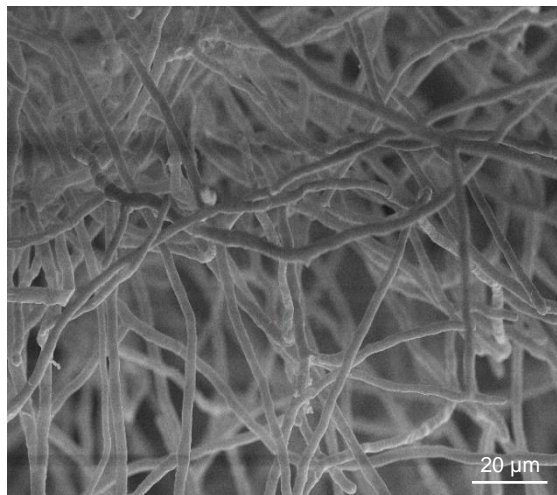
Contudo, há relatos de elevadas eficiências de biofloculação das microalgas *Chlorella protothecoides* e *Tetraselmis suecica* com *Aspergillus fumigatus* mesmo com tempos de cultivo do fungo mais longos, como 72 h (MURADOV et al., 2015). Dessa forma, pode-se concluir que as espécies envolvidas influenciam as condições a serem adotadas na biofloculação, visto que bons resultados são obtidos com diferentes características das hifas e tempos de cultivo.

Neste estudo, imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos *pellets* do fungo *A. niger* (Figura 4.3) revelaram que o aspecto das hifas nos três tempos de cultivo avaliados não variava muito e aparentemente não havia degradação das hifas mesmo no maior tempo de cultivo. Contudo, as imagens analisaram apenas a parte superficial dos *pellets*, não sendo possível avaliar a estrutura das hifas no interior dos mesmos, local onde é mais provável que haja degradação celular devido à dificuldade de transferência de massa.

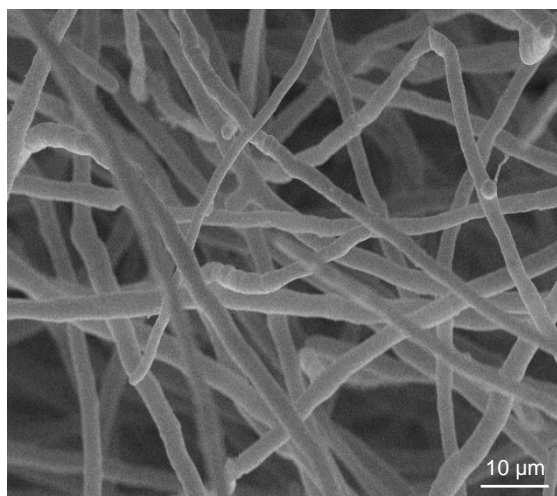
Figura 4.3: Imagens de MEV dos *pellets* de *A. niger* com tempos de cultivo de 24 h – aumento de 2120 x (A), 48 h – com aumento de 2040 x (B) e 72 h – com aumento de 3650 x (C).



A



B



C

Fonte: Acervo Pessoal (2018)

## 4.2 Experimentos preliminares de biofloculação com *Aspergillus niger*

Inicialmente, foram realizados experimentos para determinação do potencial de biofloculação de quatro espécies de cianobactérias com *pellets* de *A. niger* nas condições descritas no item 3.3.

### 4.2.1 Biofloculação de *Anabaena siamensis* com *A. niger*

Foi realizado apenas um experimento de biofloculação da espécie *A. siamensis* (suspensão obtida após cerca de 1 mês de cultivo em meio BG-11 a 26°C e fotoperíodo de 12 h) com o fungo *A. niger* (cultivo em meio à base de extrato de levedura e sacarose, por 24 h a 28°C e 150 rpm), em duplicata.

Após 24 h de cocultivo dos *pellets* de *A. niger* com a suspensão de *A. siamensis*, a 28°C, 100 rpm e na proporção 1:1 (g/g como SST), a densidade óptica (DO) aumentou em mais de 100% (Tabela 4.4), ao contrário do esperado. Visualmente, foi possível notar o aumento da turbidez no meio e o tamanho inalterado dos *pellets* fúngicos (Figura 4.4). Esses resultados indicam que a interação entre as células da cianobactéria e as hifas do fungo não foi significativa o suficiente para resultar em uma diminuição da concentração da cianobactéria em suspensão.

**Tabela 4.4: Resultado da biofloculação de *Anabaena siamensis* com *Aspergillus niger* na proporção 1:1 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm.**

Tempo (h)	DO (750 nm)*	
0	0,699	0,699
24	1,528	1,520

\* Médias de testes em duplicata.

**Fonte: Elaboração Própria (2017).**

Figura 4.4: Cocultivo da cianobactéria *A. siamensis* com o fungo *A. niger* (na proporção 1:1 g/g SST) no tempo 0 (A) e após 24 h a 28°C/100 rpm (B).



Fonte: Acervo Pessoal (2017).

O aumento da densidade óptica pode ser explicado pelo crescimento de *A. siamensis* durante o experimento, às custas de material orgânico residual proveniente do meio de crescimento do fungo, já que esta espécie é capaz de realizar metabolismo heterotrófico (KHETKORN; LINDBLAD; INCHAROENSAKDI, 2010). Li, T. et al. (2017) também relataram aumento no crescimento de cianobactérias cocultivadas com um organismo heterotrófico. Como não ocorreu a captura das células de cianobactéria do meio pelos *pellets* do fungo, a concentração de biomassa no sobrenadante não foi reduzida e houve aumento da densidade óptica.

Dessa forma, não foi possível calcular a eficiência real de biofloculação a partir da equação 3.3. Pode-se apenas inferir que o crescimento celular foi maior que a agregação das cianobactérias nas hifas fúngicas.

#### 4.2.2 Biofloculação de *Anabaena variabilis* com *A. niger*

Foi realizado apenas um experimento de biofloculação da espécie *Anabaena variabilis* (suspensão obtida após cerca de 1 mês de cultivo em meio BG-11 a 26°C e fotoperíodo de 12 h) com o fungo *A. niger* (cultivo em meio à base de extrato de levedura e sacarose, por 24 h a 28°C e 150 rpm), em duplicata.

Os resultados com a cianobactéria *A. variabilis* foram semelhantes aos obtidos com a espécie *A. siamensis*, descritos no item anterior, apresentando

aumento da DO com o tempo de cultivo (Tabela 4.5). Neste caso, a biofloculação foi acompanhada durante 48 h.

**Tabela 4.5: Resultado da biofloculação de *Anabaena variabilis* com *A. niger* na proporção 1:1 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm.**

Tempo (h)	DO (750nm)	
0	0,688	0,650
24	1,216	1,104
48	1,121	1,041

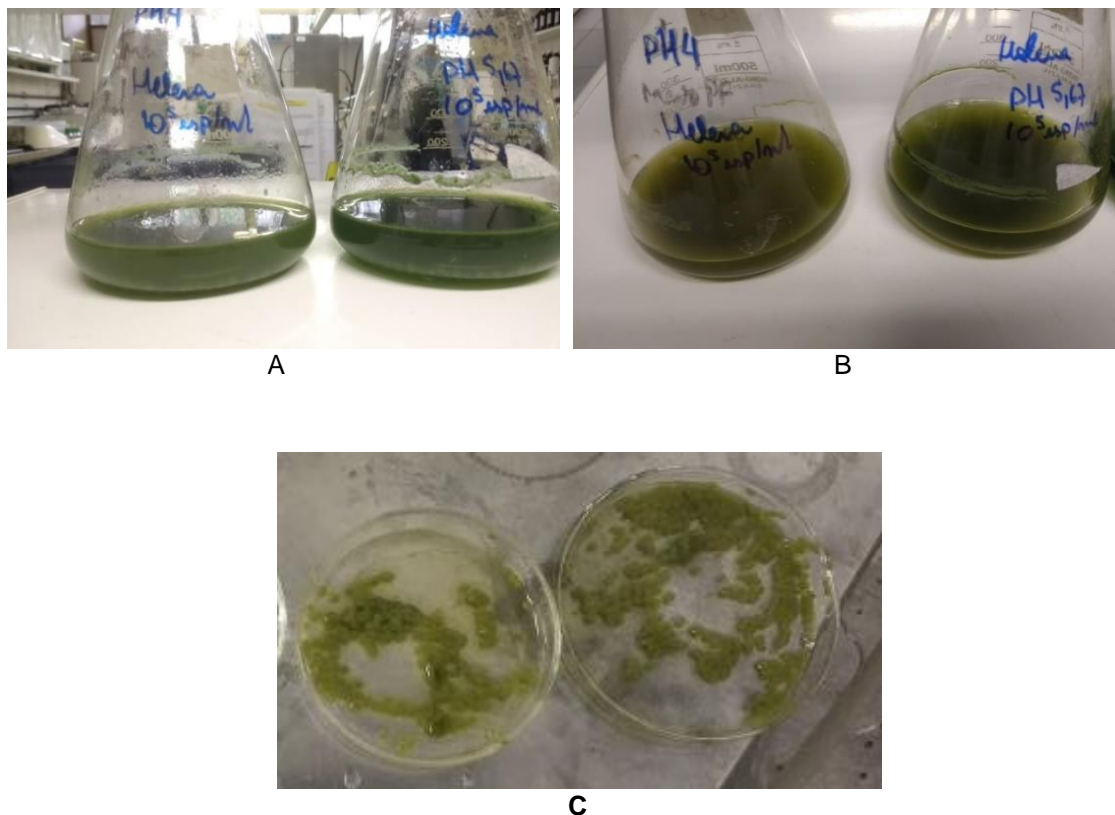
\* Médias de testes em duplicata.

**Fonte: Elaboração própria (2017).**

Nas primeiras 24 h do cocultivo, a densidade óptica aumentou em 73% e entre 24 h e 48 h, houve uma diminuição da DO, mas esta, ainda assim, continuou superior ao valor inicial. O aumento inicial pode ser explicado, assim como no item 4.2.1, pelo crescimento da cianobactéria às custas de material orgânico residual do meio de crescimento do fungo, já que esta espécie pode apresentar crescimento heterotrófico (PARK et al., 2013). Da mesma forma, também não foi possível calcular a eficiência de biofloculação a partir da equação 3.3.

A posterior queda da DO (entre 24 e 48 h) pode ser devido a uma redução do crescimento das cianobactérias, combinada a uma pequena agregação das células às hifas fúngicas, tendo em vista que após 48 h de cocultivo foi possível observar uma coloração esverdeada nos *pellets* (Figura 4.5). Com um tempo de cocultivo mais longo, a matéria orgânica no meio se torna mais escassa, diminuindo o crescimento da cianobactéria e permitindo que uma redução na quantidade de biomassa no sobrenadante seja observada.

Figura 4.5: Cocultivo de *Anabaena variabilis* com *Aspergillus niger* (na proporção 1:1 g/g SST) no tempo 0 (A) e após 24 h (B) a 28°C e 100 rpm, e aparência dos *pellets* após 48 h (C).



Fonte: Acervo Pessoal (2017).

#### 4.2.3 Biofloculação de *Synechococcus subsalsus* com *A. niger*

Foram realizados dois testes de biofloculação com a espécie *Synechococcus subsalsus*. No primeiro teste, a concentração de biomassa na suspensão final do cultivo foi de 0,738 g/L ( $DO_{750nm}=1,575$ ), enquanto no segundo, esta concentração foi de 0,345 g/L ( $DO_{750nm}=0,734$ ). As concentrações de biomassa nas suspensões diferiram em função dos cultivos terem sido realizados em períodos distintos. Como a proporção 1:1 de biomassa de cianobactérias e fungo era ajustada com base na concentração da suspensão das primeiras, suspensões mais concentradas resultavam em maior massa e, portanto, maior concentração inicial nos cocultivos para o mesmo volume inicial de 100 mL.

Foi possível observar eficiências de biofloculação bem diferentes nos dois



testes realizados (Tabela 4.6). Essa diferença pode ser explicada pela concentração de biomassa de cianobactéria nos testes. No teste com a suspensão com maior concentração de biomassa, a eficiência de biofloculação foi inferior a 20%. Gultom et al. (2014), que utilizaram o método de inoculação *fungus spore-algae* (FSA), perceberam que, quando a concentração de biomassa algácea inicial era maior, o crescimento do fungo era prejudicado e a biofloculação ocorria em menor grau. No segundo teste, com uma concentração menor de biomassa, o desenvolvimento dos *pellets* foi melhor, resultando em uma eficiência de quase 94% em apenas 24 h.

**Tabela 4.6: Resultados da biofloculação de *Synechococcus subsalsus* com *Aspergillus niger* na proporção 1:1 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm.**

Tempo (h)	DO (750 nm)*		Eficiência média de Biofloculação (%)
<b>Teste com concentração da suspensão = 0,738 g/L</b>			
0	1,029	1,058	0,0
24	0,882	0,799	19,4
<b>Teste com concentração da suspensão = 0,345 g/L</b>			
0	0,470	0,463	0,0
24	0,027	0,030	93,9

\* Médias de testes em duplicata.

**Fonte: Elaboração própria (2017).**

Uma explicação possível para o ocorrido é a idade celular. Ao utilizar uma suspensão de cianobactérias com maior concentração celular, cultivada por um período de tempo mais longo e, portanto, com maior idade celular, pode ocorrer uma menor interação das células com as hifas fúngicas e uma menor redução da densidade óptica do sobrenadante. Cohen et al. (2014) relataram a produção de compostos tóxicos em cultivos de *Synechococcus elongatus* com elevados tempos de retenção celular, que prejudicaram a fotossíntese e causaram morte celular.

Além disso, com o aumento do tempo de cultivo, também há o aumento da quantidade de matéria orgânica algácea (AOM, do inglês *algal organic matter*) no meio, a qual pode interagir com as células, reduzindo a eficiência de

biofloculação e aumentando a concentração requerida do flocculante (MIKULEC; POLAKOVIČOVÁ; CVENGROŠ, 2015; VANDAMME et al., 2016).

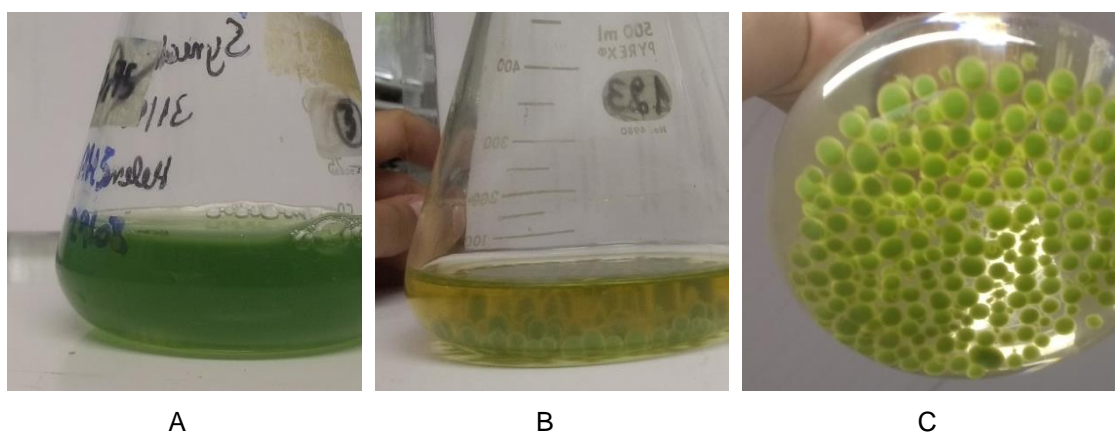
Visualmente, foi possível perceber *pellets* menores e esverdeados ao final do primeiro teste (Figura 4.6), enquanto no segundo teste, foi notável a diminuição da coloração do sobrenadante e a presença de *pellets* esverdeados de tamanho maior (Figura 4.7).

**Figura 4.6:** Cocultivo de *Synechococcus subsalsus* e *A. niger* (na proporção 1:1 g/g SST) no primeiro teste (concentração inicial = 0,738 g/L) no tempo 0 (A) e após 24 h a 28°C e 100 rpm (B).



Fonte: Acervo pessoal (2017).

**Figura 4.7:** Cocultivo de *Synechococcus subsalsus* e *A. niger* (na proporção 1:1 g/g SST) no segundo teste (concentração inicial = 0,345 g/L) no tempo 0 (A) e após 24 h (B e C) a 28°C e 100 rpm.



Fonte: Acervo pessoal (2017).

#### 4.2.4 Biofloculação de *Spirulina máxima* com *A. niger*

Foi realizado apenas um experimento de biofloculação da espécie *Spirulina maxima* (suspensão obtida após cerca de 1 mês de cultivo em meio BG-11 a 26°C e fotoperíodo de 12 h) com o fungo *A. niger* (cultivo em meio à base de extrato de levedura e sacarose, por 24 h a 28°C e 150 rpm). Os experimentos foram realizados, assim como os de *Anabaena variabilis*, em dois tempos de cocultivo, como apresentado na Tabela 4.7.

Houve uma significativa redução da DO, tanto em 24 h (77%) como em 48 h (92%) de cocultivo. Visualmente, foi notável a redução de turbidez e coloração do sobrenadante ao longo do tempo de cocultivo, bem como a existência de *pellets* maiores e de coloração esverdeada, evidenciando o fenômeno de biofloculação (Figura 4.8).

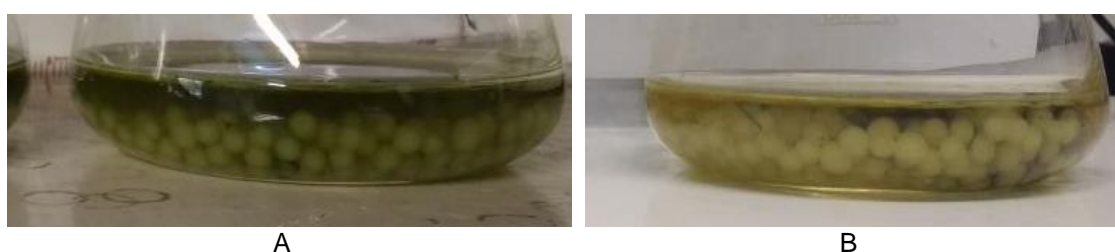
O aumento da eficiência de biofloculação com o aumento do tempo de contato das cianobactérias com os *pellets* fúngicos ficou evidente nesse experimento, como já foi observado em outros estudos (CHOI et al., 2016; LI, Y et al., 2017).

**Tabela 4.7: Resultados da biofloculação de *Spirulina maxima* com *Aspergillus niger* na proporção 1:1 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm.**

Tempo (h)	DO (730 nm)	Eficiência de biofloculação (%)
0	1,073	0,0
24	0,242	77,4
48	0,086	92,0

Fonte: Elaboração Própria (2017).

**Figura 4.8: Cocultivo de *Spirulina maxima* e *Aspergillus niger* (na proporção 1:1 g/g SST) após 24 h (A) e 48 h (B) a 28°C e 100 rpm.**



Fonte: Acervo pessoal (2017).

#### 4.2.5 Comparação da biofloculação de diferentes espécies de cianobactérias com o fungo *Aspergillus niger*

Observando os resultados obtidos na biofloculação das quatro espécies de cianobactérias com *Aspergillus niger*, percebeu-se que o tempo de cocultivo influencia a eficiência de biofloculação. Maiores eficiências foram obtidas após 48 h de cocultivo, em comparação com eficiências com 24 h de cocultivo. Além disso, o tempo de cultivo da cianobactéria e sua concentração antes do início do cocultivo são fatores que também influenciam a biofloculação.

Na Tabela 4.8 são reunidas as principais características dos gêneros de cianobactérias utilizados nos testes de biofloculação. Cianobactérias possuem paredes celulares tipicamente semelhantes a de bactérias Gram-negativas (HOICZYK; HANSEL, 2000). Espécies dos gêneros *Anabaena* e *Spirulina* apresentam morfologia filamentosa, enquanto as do gênero *Synechococcus* apresentam morfologia cocoide (LEE, 2008). Como as espécies *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina maxima* apresentaram resultados positivos na biofloculação com *pellets* de *A. niger*, a morfologia celular não parece ser um fator com participação efetiva no mecanismo de biofloculação.

Os gêneros *Synechococcus* e *Anabaena* já foram identificados em líquens (KUMAR et al., 2013). Na formação de líquens, a célula fúngica é capaz de identificar microalgas compatíveis a partir da afinidade com glicoproteínas superficiais (DIAZ et al., 2016). Além disso, proteínas superficiais foram importantes durante o processo de floculação de microalgas com *Aspergillus niger* (LI, Y. et al., 2017). Um potencial motivo para as diferenças encontradas, portanto, pode ser em função de diferentes proteínas superficiais. A presença de proteínas formadoras de poros também pode ser um fator na interação entre as células de cianobactérias e fungos. Foi reportada a ausência de poros em espécies *Anabaena* (PALINSKA; KRUMBEIN, 2000), enquanto a presença de proteínas formadoras de poros é notada em espécies *Synechococcus* e *Spirulina* (HANSEL; TADROS, 1998; PALINSKA; KRUMBEIN, 2000).

**Tabela 4.8: Características dos gêneros de cianobactérias utilizados nos testes de biofloculação com *Aspergillus niger*.**

<b>Gênero da cianobactéria</b>	<b>Parede Celular</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Características</b>	<b>Eficiência de biofloculação (24 h)*</b>
<i>Anabaena</i>	Gram-negativa	Filamentosa	3-5 µm (THIEL et al., 2014); presença de celulose na bainha mucilaginosa (NOBLES; ROMANOVICZ; BROWN, 2001); bainha mucilaginosa densa (TIEN; SIGEE; WHITE, 2005); parede celular 25 nm; ausência de poros (PALINSKA; KRUMBEIN, 2000)	não ocorreu
<i>Synechococcus</i>	Gram-negativa	Cocoide	2 µm (AKTAS et al., 2012); ausência de celulose (NOBLES; ROMANOVICZ; BROWN, 2001); presença de poros (HANSEL; TADROS, 1998); proteínas superficiais que formam trímeros (HANSEL; TADROS, 1998)	93,9%
<i>Spirulina</i>	Gram-negativa	Filamentosa	Bainha mucilaginosa fina (MUTHULAKSHMI et al., 2012); ausência de celulose na parede celular (KUHN; WINSTON, 2007); presença de poros (PALINSKA; KRUMBEIN, 2000)	77,4%

\* Obtida no presente estudo, com proporção fungo: cianobactéria de 1:1 (g/g SST), após 24 h de cocultivo a 28°C e 100 rpm

Uma característica marcante que diferencia os gêneros estudados é a presença de celulose nas estruturas superficiais das células. Enquanto o gênero *Anabaena* é marcado pela presença expressiva de uma bainha mucilaginosa que contém celulose (NOBLES; ROMANOVICZ; BROWN, 2001; TIEN; SIGEE; WHITE, 2005), espécies dos outros dois gêneros não possuem celulose e apresentam uma bainha mais discreta (KUHN; WINSTON, 2007; MUTHULAKSHMI et al., 2012; NOBLES; ROMANOVICZ; BROWN, 2001). A presença de uma bainha espessa contendo celulose pode ser determinante para prejudicar a interação das superfícies das células e hifas fúngicas, o que explicaria as baixas eficiências de biofloculação nas espécies do gênero *Anabaena*. Um estudo de biofloculação de biomassas algáceas utilizando *pellets* de *Aspergillus niger* conseguiu boas eficiências com a microalga *Chlorella vulgaris* (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014), que também não possui celulose em suas estruturas mais externas (GERKEN; DONOHOE; KNOSHAUG, 2013).

Em resumo, a ocorrência ou não da biofloculação depende da espécie de cianobactéria avaliada. Considerando apenas as espécies de cianobactérias e o fungo utilizados neste estudo, há indícios de que a eficiência de biofloculação pode estar relacionada à ausência de celulose na parede celular, à presença de poros e a uma bainha mucilaginosa fina. Contudo, não foram encontrados estudos que relacionem as estruturas e composição celulares dos microorganismos fotossintetizantes à eficiência de biofloculação com fungos filamentosos alcançada.

### **4.3 Experimentos com *Synechococcus subsalsus***

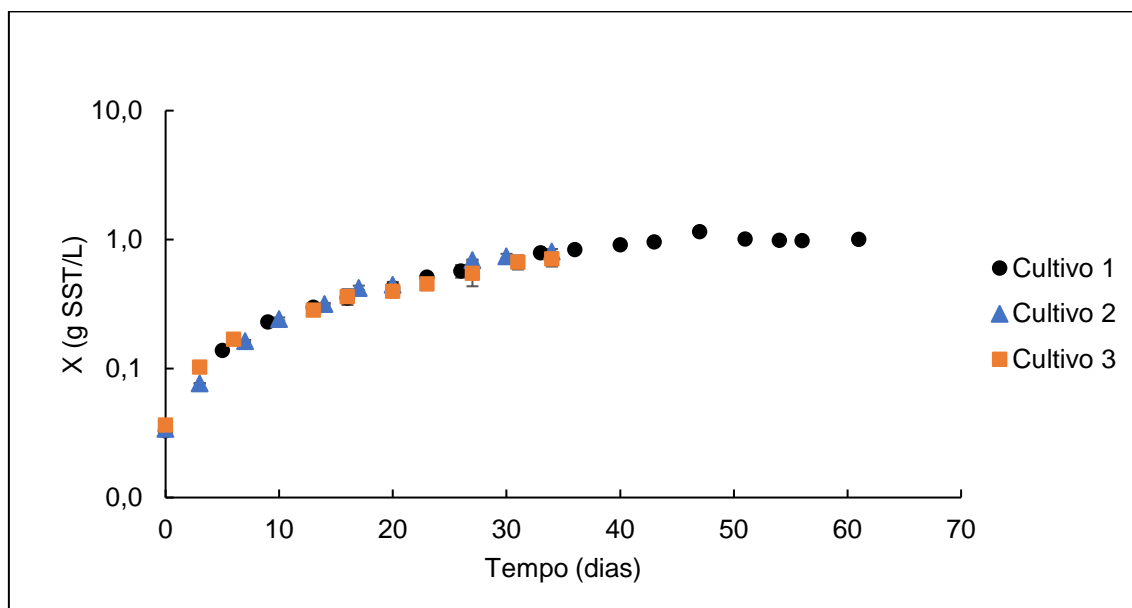
A cianobactéria com maior eficiência de biofloculação nos experimentos preliminares, *Synechococcus subsalsus*, foi escolhida para o prosseguimento deste estudo.

#### **4.3.1 Crescimento de *Synechococcus subsalsus***

O crescimento de *S. subsalsus* em meio BG-11 a 23°C e 150 rpm foi acompanhado ao longo do tempo (Figura 4.9), verificando-se que a

concentração de biomassa aumentou até o 47º dia do cultivo, mantendo-se a partir de então praticamente constante (em torno de 1 g SST/L) até o final das medições, com 61 dias de cultivo. Costa et al. (2018) alcançaram pouco mais que 0,5 g/L de biomassa em 20 dias de cultivo, valor superior à concentração alcançada no mesmo tempo deste estudo (0,398 g/L), mas com cultivo realizado em fotobiorreatores de 20 L com concentração inicial de 0,2 g/L e a 28°C.

**Figura 4.9: Crescimento da cianobactéria *Synechococcus subsalsus* em diferentes cultivos em meio BG-11 a 23°C e 150 rpm e fotoperíodo de 12 h (43  $\mu\text{mol}$  fótons/m<sup>2</sup>.s).**



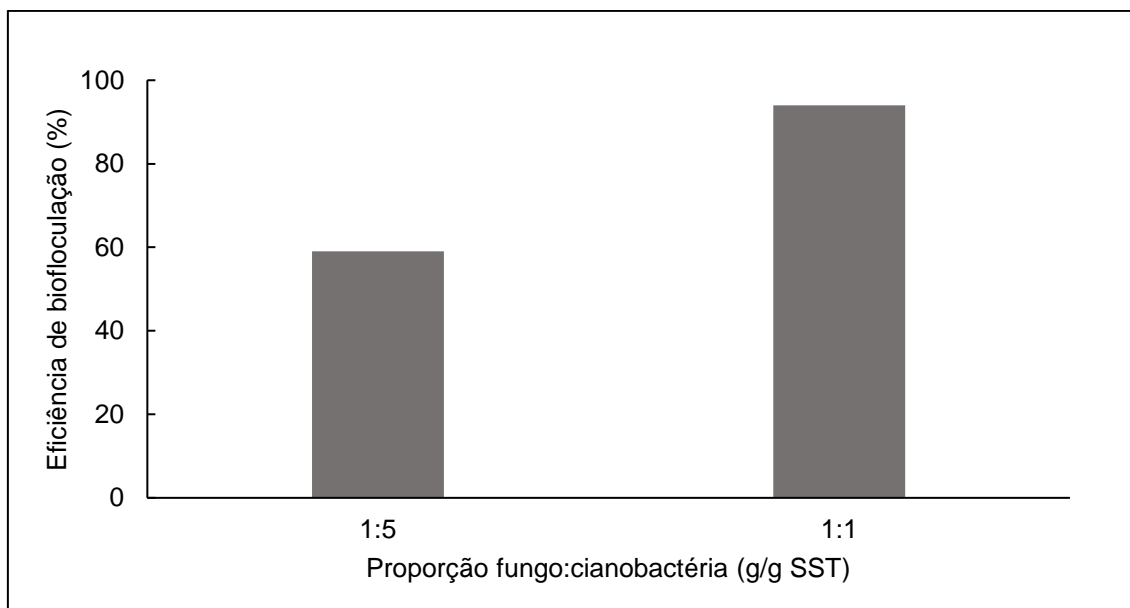
Fonte: Elaboração própria (2018)

#### 4.3.2 Experimentos de biofloculação com *A. niger*

##### 4.3.2.1 Efeito de diferentes proporções fungo: cianobactéria

Foram realizados testes com uma proporção fungo:cianobactéria menor (de 1:5) do que a avaliada anteriormente, mantendo-se as demais condições (28 °C e 100 rpm), para avaliar se seria possível a utilização de uma quantidade menor de fungo na biofloculação, o que diminuiria os custos do processo. Na menor proporção, a eficiência de biofloculação alcançada foi 37% inferior àquela obtida na proporção 1:1 (Figura 4.10).

**Figura 4.10: Biofloculação de *S. subsalsus* com *pellets* de *A. niger*, com proporção fungo:cianobactéria 1:1 e 1:5 (g/g SST) a 28 °C e 100 rpm após 24 h.**



**Fonte: Elaboração própria (2018)**

Esse resultado concorda com outros estudos que apontam o aumento da eficiência com a quantidade de *pellets* adicionados no cocultivo (BHATTACHARYA et al., 2017; CHEN et al., 2018; CHOI et al., 2016).

Ao modificar a proporção fungo: cianobactéria de 1:1 para 1:5, adicionou-se um menor número de *pellets* fúngicos em relação ao número de cianobactérias, o que também levou a uma menor quantidade de matéria orgânica residual transferida do cultivo fúngico para o cocultivo. Dessa forma, foi levantada a hipótese de que a quantidade reduzida de matéria orgânica no meio poderia influenciar na redução da eficiência alcançada, não sendo esse efeito somente devido a menor proporção de fungo presente. Alguns estudos apontam que menores concentrações de matéria orgânica ou a sua ausência no cocultivo prejudicam a floculação com *pellets* pré-cultivados (CHEN et al., 2018; CHOI et al., 2016).

#### **4.3.2.2 Efeito da reposição de nutrientes**

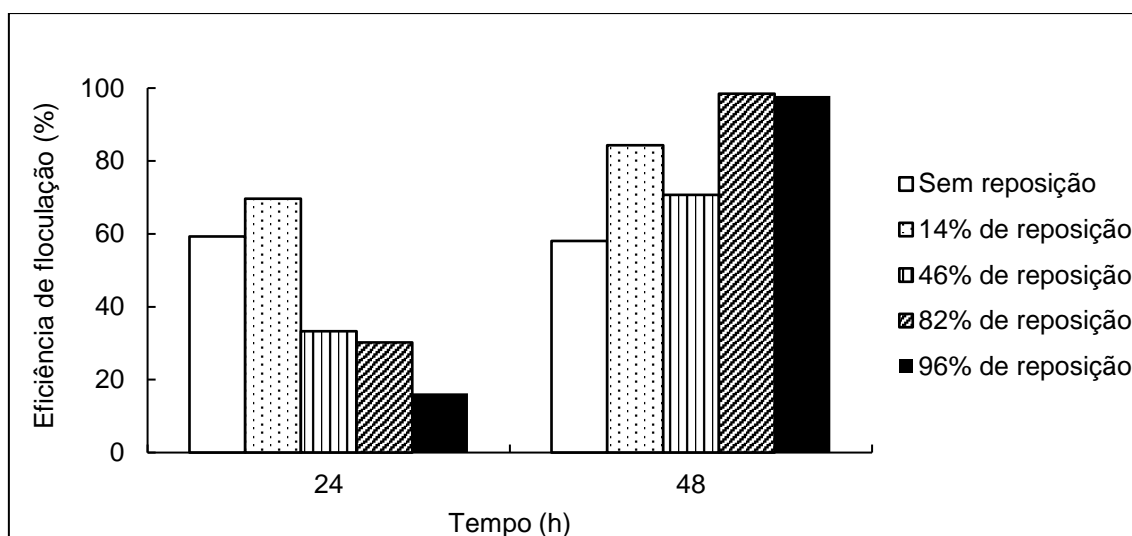
A fim de avaliar se a concentração de matéria orgânica teria efeito sobre a biofloculação de *S. subsalsus* com *A. niger*, a reposição de diferentes



proporções de extrato de levedura e sacarose no cocultivo foi estudada.

Os testes foram conduzidos na proporção fungo: cianobactéria de 1:5 (g/g SST), condição na qual um menor volume do meio de cultivo residual do fungo foi adicionado ao cocultivo. Os resultados da eficiência de floculação do primeiro teste com diferentes reposições de extrato de levedura e sacarose estão dispostos na Figura 4.11.

**Figura 4.11: Biofloculação de *S. subsalsus* com *pellets* de *A. niger*, com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST) a 28°C e 100 rpm, sem e com diferentes percentuais de reposição de fontes de carbono.**

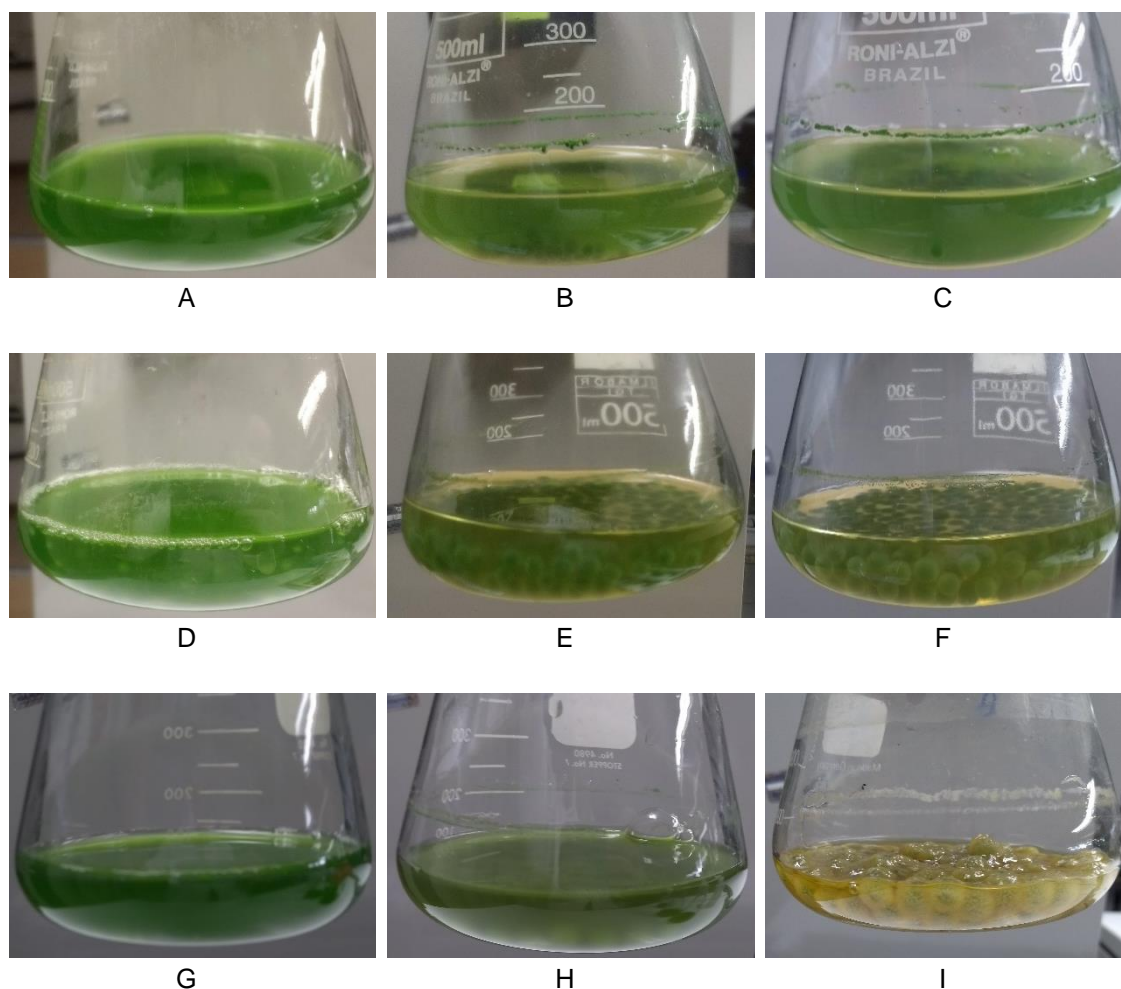


Fonte: Elaboração própria (2018)

A eficiência de biofloculação na condição sem reposição foi menor que 60% com 24 e 48 h de cocultivo. Já com a reposição de 14% das quantidades de extrato de levedura e sacarose do meio, a eficiência foi de 70% com 24 h e de 84% em 48 h de cocultivo. Somente a menor condição de reposição (14%) alcançou eficiência de biofloculação maior que a obtida na condição sem reposição em 24 h. Contudo, após 48 h, todas as condições alcançaram maiores eficiências, atingindo até 98% (com 82% e 96% de reposição), enquanto a condição sem reposição permaneceu com eficiência de 58%. Esses resultados parecem indicar que o fungo utiliza a matéria orgânica residual do meio de cultivo para crescimento e aumento dos *pellets* nas primeiras 24 h, e posteriormente realiza a agregação das cianobactérias. A Figura 4.12 mostra imagens do cocultivo com 0%, 14% e 96% de reposição, nas quais é possível perceber uma

maior mudança entre 0 e 24 h nas duas primeiras condições e uma maior redução da coloração do sobrenadante entre 24 h e 48 h na terceira condição.

**Figura 4.12: Cocultivo de *S. subsalsus* com *A. niger*, com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST) a 28 °C e 100 rpm, nas condições sem reposição (0h, 24 h e 48 h, respectivamente A, B e C), com 14% de reposição (0h, 24 h e 48 h, respectivamente C, D e E) e com 96% de reposição (0h, 24 h e 48 h, respectivamente F, G e H).**



Fonte: Acervo Pessoal (2018)

Nos testes com diferentes reposições, a DQO solúvel e o tamanho dos *pellets* foram medidos em 0, 24 e 48 h de cocultivo. A Tabela 4.9 apresenta os valores de DQO nas diferentes condições.

**Tabela 4.9: Variação da DQO no cocultivo de *S. subsalsus* com *A. niger*, na proporção fungo: cianobactéria de 1:5, a 28°C e 100 rpm, nas diferentes condições de reposição de extrato de levedura e sacarose.**

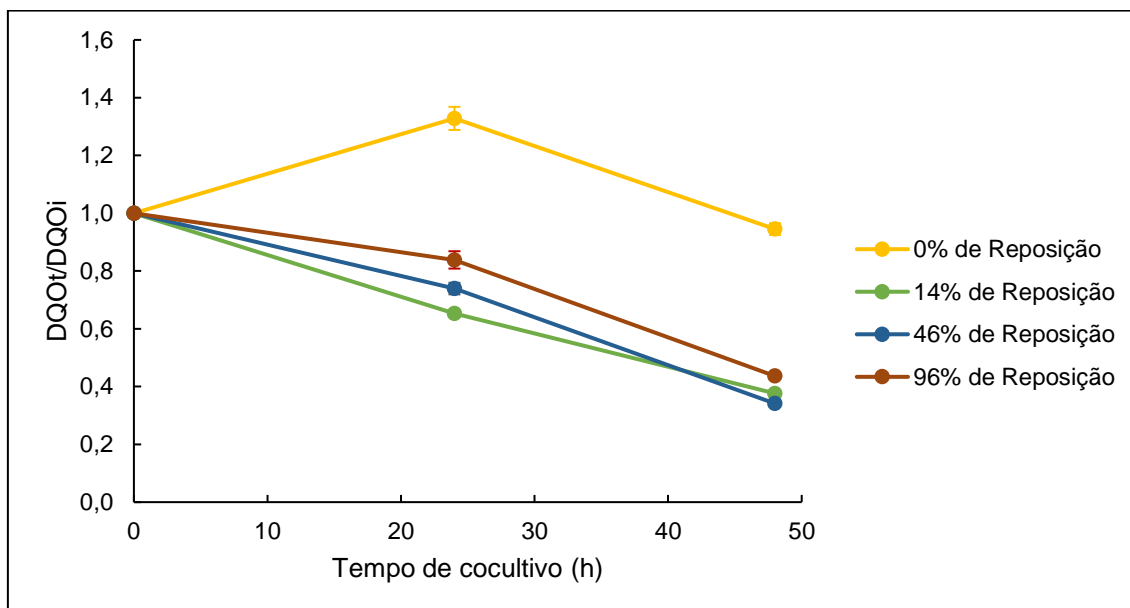
Tempo (h)	DQO solúvel (mg/L) para diferentes reposições			
	0%	14%	46%	96%
0	101 ± 4	2428 ± 72	6625 ± 42	16450 ± 371
24	134 ± 1	1587 ± 45	4898 ± 89	13793 ± 234
48	95 ± 1	914 ± 13	2262 ± 8	7180 ± 80

**Fonte: Elaboração própria (2018)**

Para facilitar a comparação entre as diferentes condições estudadas, foi calculada a razão entre os valores de DQO ao longo do cocultivo e a DQO inicial (tempo = 0). Na Figura 4.13 é possível perceber que há uma redução no valor inicial da DQO solúvel do sobrenadante, exceto na condição sem reposição (0%). Nesta condição, os valores de DQO foram muito baixos e próximos entre si e ao limite de detecção do método analítico. Nas demais condições, em 24 h, o maior consumo de DQO (35%) se deu na condição com 14% de reposição, seguido de 26% e 16% com 46% e 96% de reposição. Entre 24 e 48 h, o consumo de DQO foi de 42%, 54% e 48% com 14%, 46% e 96% de reposição, respectivamente. Com 14%, a taxa de consumo da DQO é praticamente a mesma nas 48 h de cocultivo. Contudo, nas condições de maior reposição (46% e 96%), a taxa de consumo é maior após o tempo de 24 h, indicando um consumo mais rápido da matéria orgânica neste período.

Essa variação pode indicar uma relação entre o consumo de matéria orgânica e a agregação das cianobactérias. Se for avaliada a diferença nas eficiências de biofloculação em 24 h e 48 h, para as diferentes reposições, as maiores variações nas eficiências de biofloculação se dão nos períodos em que a DQO é consumida mais rapidamente. Nas condições de maior reposição (46% e 96%), nas quais a eficiência de biofloculação foi baixa após 24 h e elevada após 48 h, o consumo de DQO foi mais rápido (2 a 3 vezes) após as primeiras 24 h do cocultivo, enquanto na condição de menor reposição (14%), a eficiência de biofloculação já foi relativamente alta com 24 h, não aumentando após 48 h, observando-se a manutenção do consumo de DQO no segundo intervalo.

Figura 4.13: Variação da razão  $DQO_t/DQO_i$ \* no cocultivo de *S. subsalsus* com *A. niger*, na proporção fungo: cianobactéria de 1:5, a 28°C e 100 rpm, nas diferentes condições de reposição de extrato de levedura e sacarose.



\*  $DQO_t$  é a DQO solúvel do cocultivo no tempo  $t$  e  $DQO_i$  é a DQO solúvel inicial do cocultivo.

Fonte: Elaboração própria (2018)

Os diâmetros dos *pellets* nos cocultivos sem e com diferentes percentuais de reposição de carbono são apresentados na Tabela 4.10, constatando-se em todas as condições o aumento de tamanho dos mesmos com o tempo de cocultivo. O maior tamanho foi alcançado na condição de maior reposição após 48 h.

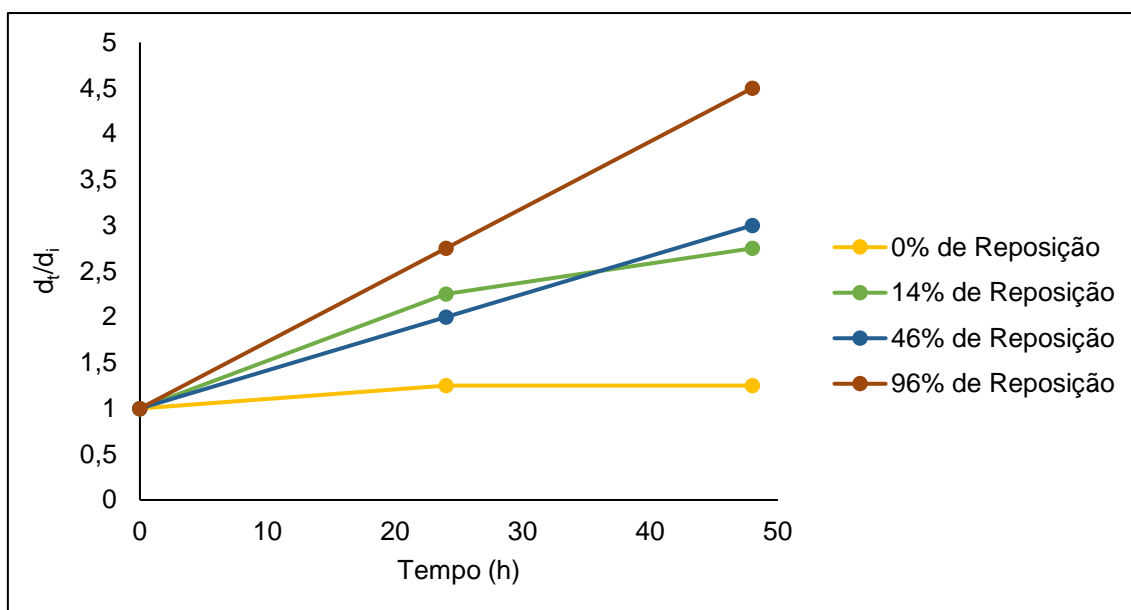
Tabela 4.10: Tamanho dos *pellets* no cocultivo de *S. subsalsus* com *A. niger*, com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST), a 28°C e 100 rpm, nas diferentes condições de reposição.

Tempo (h)	Diâmetro do <i>pellet</i> (mm) para diferentes reposições			
	0%	14%	46%	96%
0	2,0	2,0	2,0	2,0
24	2,5	4,5	4,0	5,5
48	2,5	5,5	6,0	9,0

Fonte: Elaboração própria (2018)

A razão entre o diâmetro dos *pellets* ao longo do cocultivo e o diâmetro inicial se encontra na Figura 4.14. Na condição sem reposição, quase não há aumento do tamanho dos *pellets*, porém a cor verde assumida pelos mesmos durante o cocultivo era visível (Figura 4.15). Já nas demais condições, os *pellets* aumentaram consideravelmente de tamanho. Com 46% e 96% de reposição, o aumento foi linear durante o cocultivo. Já na condição de menor reposição (14%), o aumento do diâmetro foi menor entre 24 h e 48 h.

**Figura 4.14: Razão  $d_t/d_i$  \* no cocultivo de *S. subsalsus* com *A. niger* com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST), nas diferentes condições de reposição.**



\*  $d_t$  é o diâmetro dos *pellets* no tempo  $t$  do cocultivo e  $d_i$  é o diâmetro inicial dos *pellets*.

Fonte: Elaboração própria (2018)

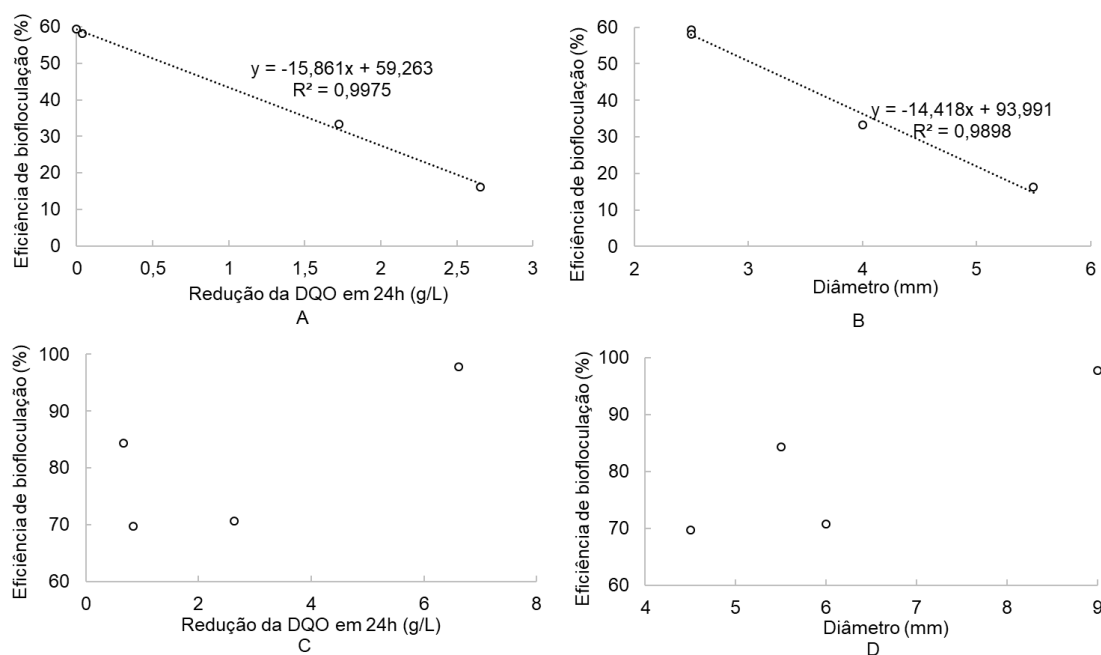
**Figura 4.15: Pellet após o cocultivo de *S. subsalsus* e *A. niger* na proporção fungo:cianobactéria 1:5 (g/g SST) e sem reposição.**



Fonte: Acervo Pessoal (2018)

Na Figura 4.16 os dados de redução da DQO e diâmetro dos *pellets* nos dois períodos avaliados (24 h e 48 h) foram plotados com a eficiência de biofloculação, separando os dados em que a eficiência foi baixa (até 60% - Figura 4.16 A e B) dos dados em que a eficiência foi elevada (> 60% - Figura 4.16 C e D). As linhas de tendência obtidas indicam que tanto a redução da DQO como o diâmetro dos *pellets* são inversamente proporcionais à eficiência quando a eficiência foi inferior a 60%. Ou seja, ambos estão mais relacionados com o crescimento do fungo do que com a agregação das cianobactérias aos *pellets* fúngicos. Enquanto que com eficiências de biofloculação elevadas, não foi possível obter uma linha de tendência, mas é percebida uma relação direta da eficiência com a redução da DQO e o diâmetro dos *pellets*.

**Figura 4.16: Relação entre eficiências de biofloculação, consumo de DQO e diâmetro dos *pellets* no cocultivo de *S. subsalsus* e *A. niger* na proporção 1:5 (g/g SST) sem e com reposição: eficiências até 60% (A e B) e eficiências acima de 60% (C e D).**



**Fonte: Elaboração própria (2018)**

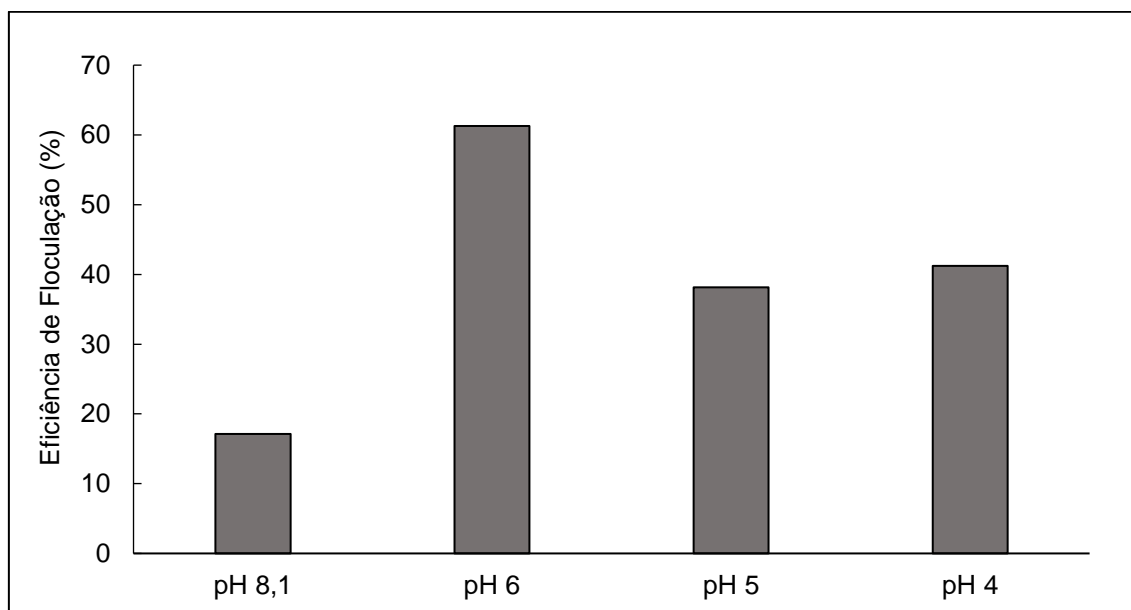
Na literatura, também foi relatado o aumento da eficiência de biofloculação e a formação mais rápida de *pellets* no cocultivo (CHEN et al., 2018; GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014; ZHOU et al., 2013). Choi et al. (2016), que utilizaram *pellets* pré-cultivados de *Aspergillus oryzae* para concentrar a cianobactéria *Synechocystis sp.*, relataram a necessidade de adição de fontes

de carbono para a obtenção de elevadas eficiências de biofloculação, assim como foi verificado no presente estudo. Além disso, ao estudar a adição de fontes de carbono alternativas à glicose (xilose, glicerol e acetato de sódio), os autores apontaram que a eficiência de biofloculação inicial (com 1 dia de cocultivo) era maior com as fontes alternativas, enquanto que após 2 dias de cocultivo o experimento no qual a glicose foi utilizada como fonte de carbono alcançou eficiências superiores. Segundo os autores, a explicação provável para este fenômeno seria a de maior crescimento heterotrófico da cianobactéria no meio com glicose no período inicial do cocultivo. Este fator também pode ter sido a razão pela qual no início do cocultivo as condições com maior reposição alcançaram eficiência inferior às condições com menor reposição de matéria orgânica.

#### **4.3.2.3 Efeito da variação do pH**

Foi realizado um teste da biofloculação com a reposição que obteve melhor resultado em 24 h de cocultivo (14%) em diferentes valores de pH, a fim de avaliar o efeito dessa variável na eficiência de biofloculação (Figura 4.17). Valores intermediários de pH (4 e 5) resultaram em eficiências de biofloculação também intermediárias (41% e 38%, respectivamente), enquanto a condição que atingiu a maior eficiência foi a com pH igual a 6 (61%). O controle (sem ajuste de pH), cujo valor de pH inicial do cocultivo foi de 8,1, atingiu uma eficiência de biofloculação inferior a todas as outras condições estudadas (17%), exceto a de pH igual a 3, na qual a eficiência não foi calculada a partir da equação 3.3 em função do aumento da DO (não mostrada no gráfico).

**Figura 4.17: Eficiência de biofloculação de *S. subsalsus* com *A. niger* em diferentes valores de pH do cocultivo com proporção fungo: cianobactéria 1:5 (g/g SST), a 28 °C e 150 rpm, com 14% de reposição, após 24 h.**



**Fonte: Elaboração própria (2018)**

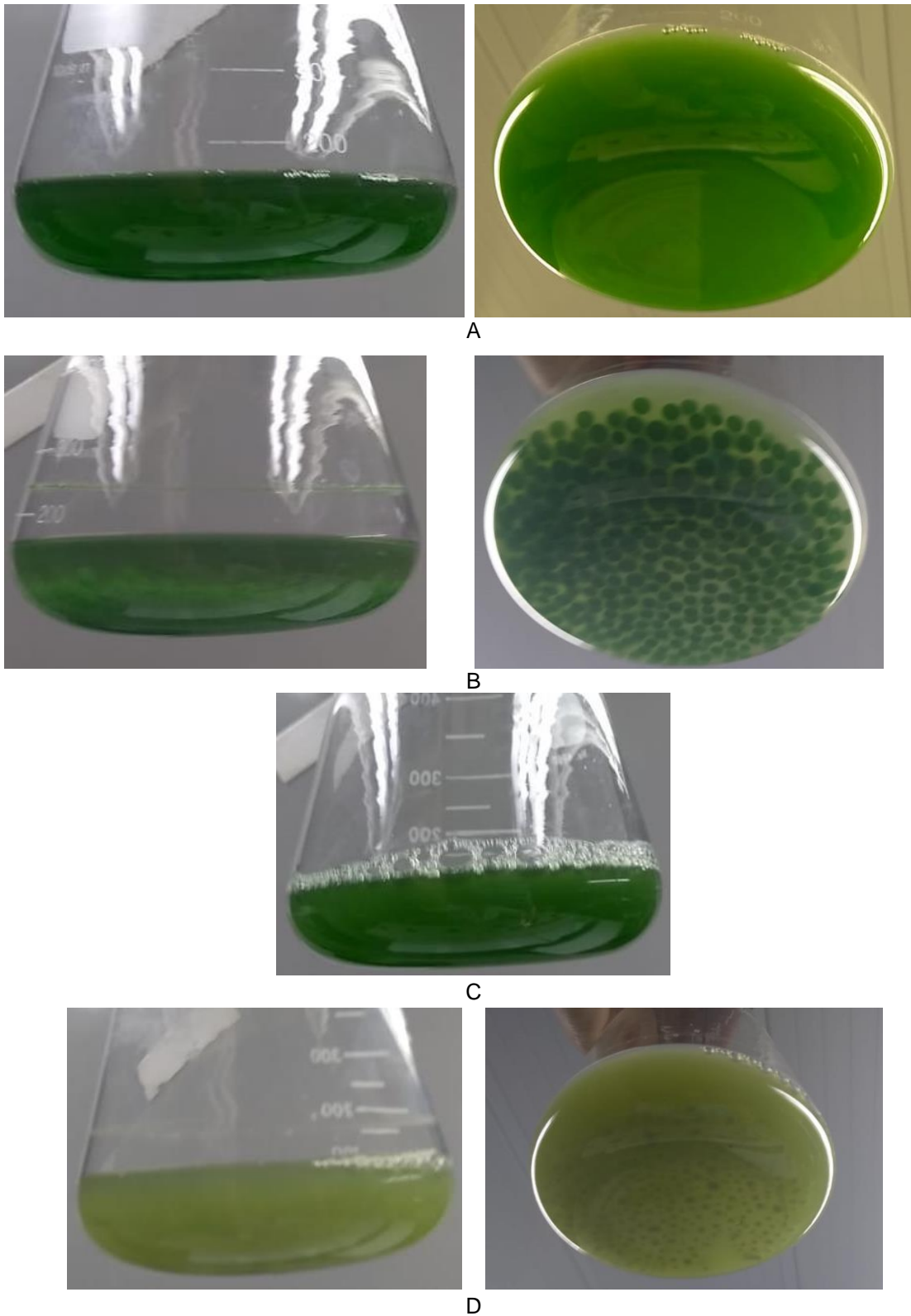
A Figura 4.18 mostra as imagens dos cocultivos com maior eficiência de biofloculação (pH 6) e em pH 3. Em pH 6, observou-se sobrenadante mais claro e *pellets* esverdeados após 24 h. Enquanto que com pH 3, o sobrenadante assumiu uma coloração amarelada e turva, e os *pellets* não apresentaram crescimento.

O pH 6 é mais próximo ao pH do cocultivo sem ajuste (8,1), sendo o que necessitou de menor adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A adição de maiores quantidades de ácido pode ter afetado o mecanismo de agregação das células de cianobactérias, diminuindo a eficiência alcançada.

Contudo, os resultados encontrados diferem de estudos realizados anteriormente. Chen et al. (2018) relataram eficiências superiores a 80% mesmo em valores de pH baixos (3, 3,5 e 4) na biofloculação de *Chlorella sp.* com *Penicillium sp.*. Estudos em faixas de pH mais altas (5,4 - 7,4) também não apontaram a influência do pH na eficiência de biofloculação de *Synechocystis sp.* com *Aspergillus oryzae*.



Figura 4.18: Cocultivo de *S. subsalsus* e *A. niger* com proporção fungo:cianobactéria 1:5 (g/g SST), a 28 °C e 150 rpm, com pH ajustado para 6 em 0h (A) e 24 h (B), e com pH ajustado para 3, em 0h (C) e 24 h (D).

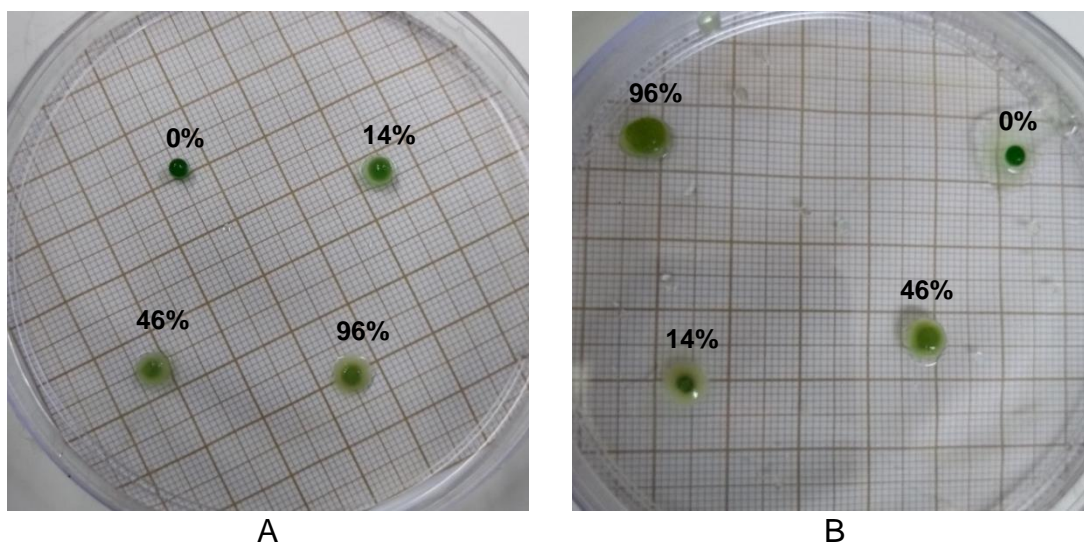


Fonte: Acervo pessoal (2018)

#### 4.3.2.4 Dificuldade de quantificação da eficiência de biofloculação

Em testes posteriores, passou-se a observar um aumento da densidade óptica (DO) em todas as condições avaliadas (com diferentes reposições e valores de pH), impossibilitando o cálculo da eficiência de biofloculação. No entanto, a coloração esverdeada dos *pellets* após o cocultivo ainda era observada (Figura 4.19), indicando que a biofloculação ocorria.

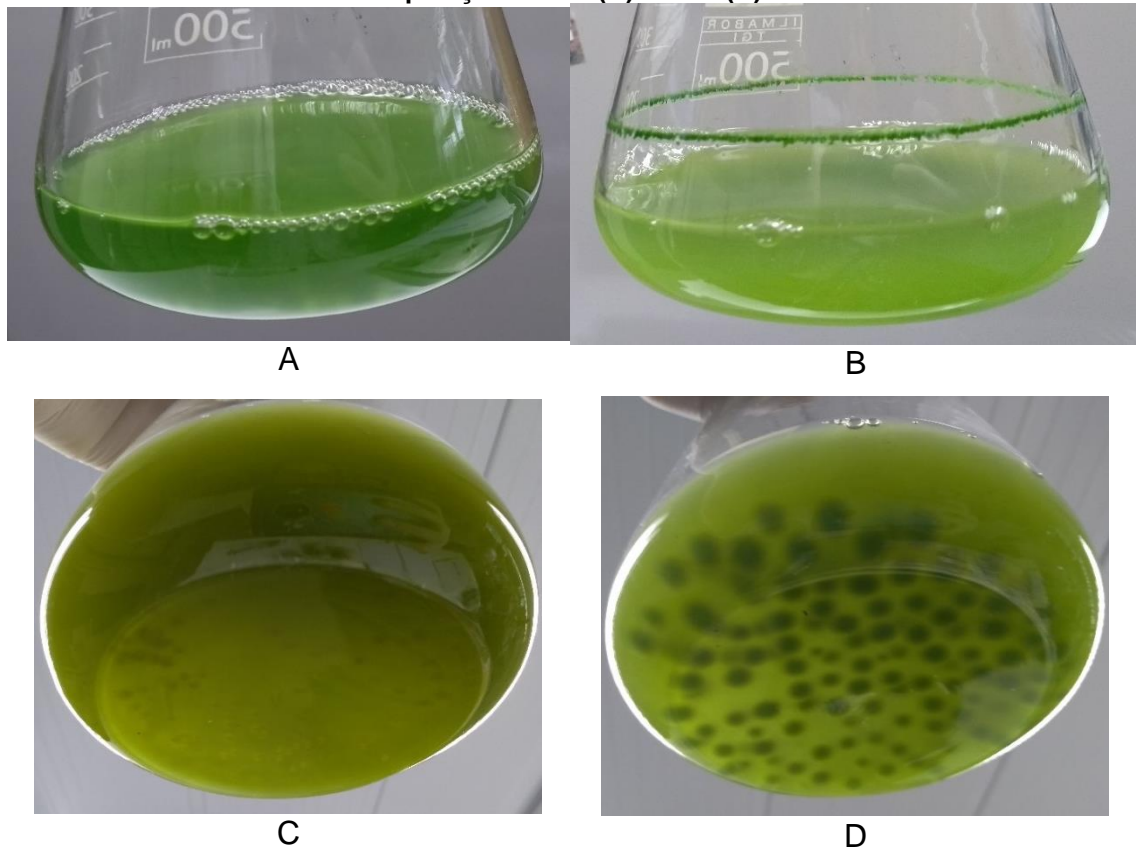
**Figura 4.19: Pellets após o cocultivo de *S. subsalsus* e *A. niger* após 24 h (A) e 48 h (B), com proporção fungo:cianobactéria 1:5 (g/g SST), a 28°C e 150 rpm, com reposições de 0%, 14%, 46% e 96%.**



Fonte: Acervo pessoal (2018)

Como o sobrenadante muitas vezes assumia uma coloração menos esverdeada, porém turva (Figura 4.20), suspeitou-se de uma contaminação no cocultivo. Culturas de *Synechococcus* dificilmente são mantidas puras devido à associação com outros micro-organismos heterotróficos, que podem aderir à superfície das células (ZHENG et al., 2018).

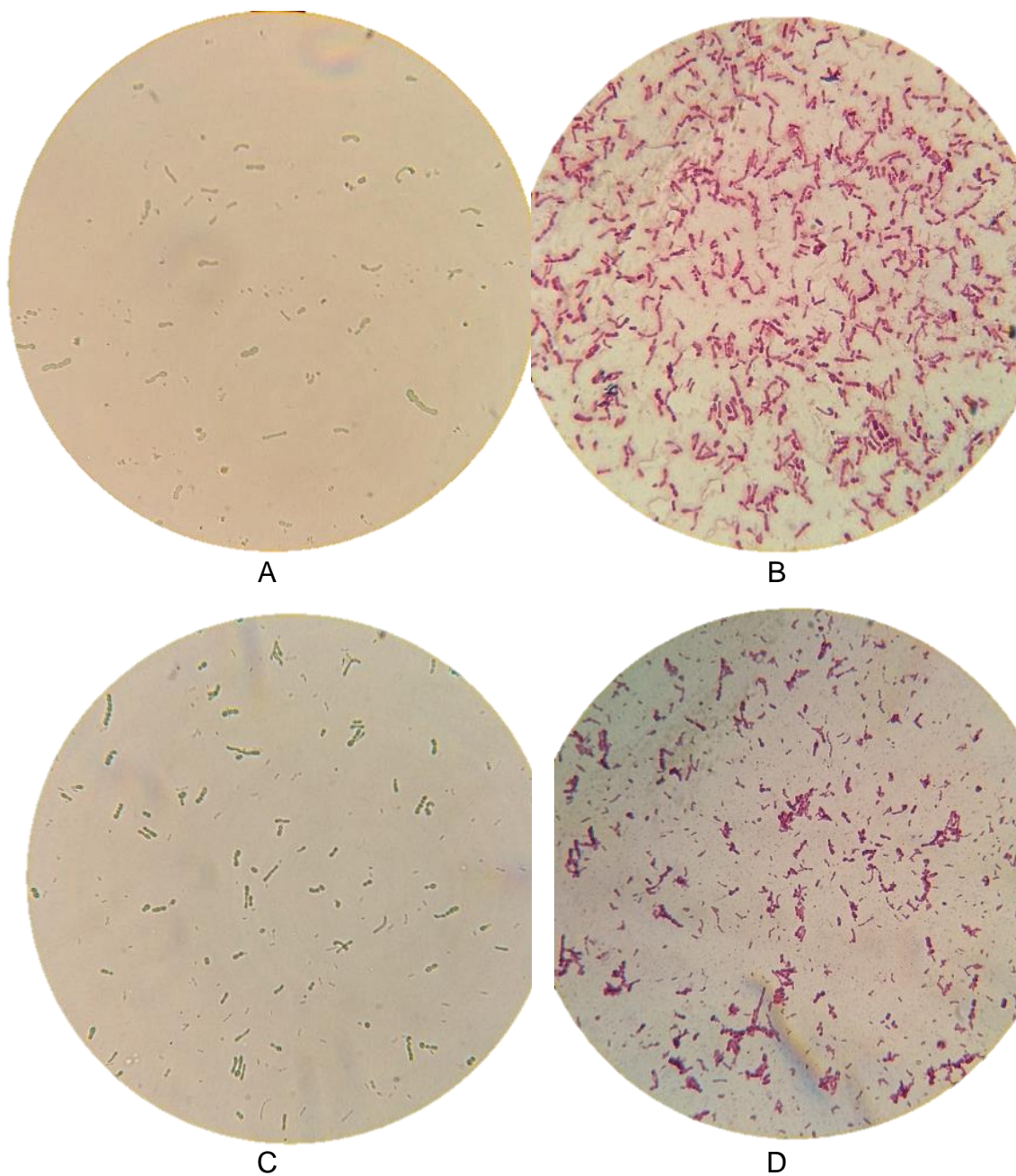
Figura 4.20: Cocultivo de *S. subsalsus* e *A.niger* com proporção fungo:cianobactéria de 1:5 (g/g SST), a 28°C e 150 rpm, com 14% de reposição em 0h (A) e 24 h (B) e com 96% de reposição em 0h (C) e 24 h (D).



Fonte: Acervo pessoal (2018)

Para investigar esta possibilidade, foi feita uma lâmina com amostras do sobrenadante da cultura pura e do cocultivo para avaliar a presença de outros micro-organismos (Figura 4.21). Contudo, não foi possível perceber a presença de micro-organismos contaminantes na cultura pura e no cocultivo.

**Figura 4.21: Observação ao microscópio com aumento de 4000 X da cultura de *S. subsalsus* a fresco (A) e com coloração de Gram (B) e do cocultivo a fresco (C) e com coloração de Gram (D).**



**Fonte: Acervo pessoal (2018)**

Outra hipótese para explicar a turvação do sobrenadante no cocultivo seria a de crescimento heterotrófico da cianobactéria devido à matéria orgânica presente no meio, visto que o aumento da densidade óptica se dava de forma mais expressiva nas condições com mais matéria orgânica no meio. Na literatura, já foi reportado metabolismo mixotrófico e heterotrófico (na presença de glicerol, glicose e ácido acético) em algumas linhagens do gênero



*Synechococcus* (HENDRY et al., 2016; KANG et al., 2004; YAN et al., 2012).

A turvação do meio dificultou o acompanhamento da eficiência de biofloculação em um planejamento experimental em que se pretendia avaliar o efeito de variáveis como razão fungo:cianobactéria, pH, tempo de cultivo do fungo e temperatura. No entanto, a contaminação com outros micro-organismos ou o crescimento heterotrófico da cianobactéria não seriam prejudiciais para o fim a que se destina a biomassa concentrada na forma de *pellets*: a digestão anaeróbia para produção de metano, a qual será investigada em trabalhos futuros.

De qualquer modo, a turvação observada deve ser evitada, pois dificultaria o aproveitamento do sobrenadante em novos cultivos de cianobactérias, como já vem sendo avaliado em alguns trabalhos da literatura (UMMALYMA et al., 2016; VANDAMME et al., 2014; ZHOU et al., 2012). Mais estudos seriam necessários para elucidar a causa da turvação do meio e para propor soluções para este problema.

#### 4.3.2.5 Densificação das suspensões de *S. subsalsus*

A Tabela 4.11 apresenta a comparação entre os melhores resultados da biofloculação de *S. subsalsus* com *A. niger* em termos de eficiência de biofloculação alcançada ou de fator de concentração obtido.

**Tabela 4.11: Comparação dos melhores resultados da biofloculação de *S. subsalsus* com *A. niger*.**

Proporção fungo:cianobactéria	Reposição (%)	Eficiência de Floculação (%)	Tempo de cocultivo (h)	Fator de Concentração
1:1	0	94	24	10,3
1:5	96	98	48	3,2
1:5	0	59	24	62,3

Fonte: Elaboração Própria (2019)

O nível de densificação de suspensões da cianobactéria *S. subsalsus* foi

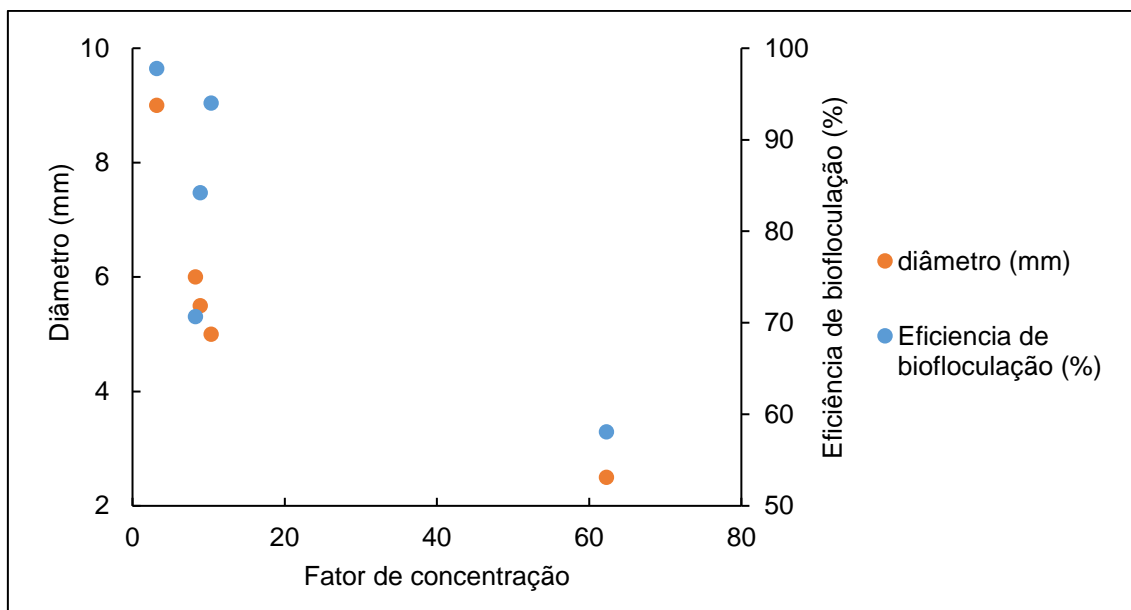
calculado nas duas melhores condições de biofloculação, obtidas nas proporções fungo: cianobactéria 1:1 e 1:5. No caso da primeira proporção (a 28°C e 100 rpm), a suspensão de cianobactéria foi concentrada 10,3 vezes, de 0,216 g SST/L na suspensão para 2,236 g/L na forma de *pellets* fúngicos. Já na segunda proporção (a 28°C, 100 rpm e com 96% de reposição), a concentração foi de 3,2 vezes, de 0,907 g SST/L na suspensão para 2,904 g/L nos *pellets* fúngicos.

Quando comparada com outros métodos de densificação de biomassas, a concentração obtida foi inferior à alcançada por métodos mais tradicionais. Com a flotação pode-se concentrar a biomassa algácea em até 10 vezes (GARG et al., 2012), com a floculação com quitosana em até 44 vezes, e com a floculação química com FeCl<sub>3</sub> até 50 vezes (LAMA et al., 2016). Já com a centrifugação, podem ser alcançados fatores de concentração bastante superiores, de até 150. No entanto, todos estes métodos envolvem a adição de químicos, que contaminam a biomassa, dificultando sua utilização posterior e/ou apresentam elevados custos.

Apesar da condição com proporção 1:5 ter alcançado uma eficiência de biofloculação maior, a concentração da cianobactéria nos *pellets* foi menor. Isso se deve ao tamanho dos *pellets* ter sido maior nesta condição, fazendo com que o volume ocupado pelos mesmos também fosse maior. Além disso, o crescimento da cianobactéria durante o cocultivo não pôde ser quantificado, havendo a possibilidade de uma massa maior de cianobactéria nos *pellets* do que apenas a que foi removida do sobrenadante.

Os resultados de densificação também indicam que *pellets* de menor diâmetro, com maior área superficial, seriam muito mais eficientes para a densificação. Na comparação de outras condições, incluindo eficiências de biofloculação mais baixas, se verificaram concentrações de até 62 vezes para *pellets* com diâmetros de 2,5 mm (Figura 4.22), na condição de proporção 1:5 sem reposição em 24 h, atingindo uma concentração de *Synechococcus subsalsus* de 56,5 g/L. Portanto, deve-se priorizar condições de cocultivo que resultem em altas eficiências de biofloculação com menor crescimento dos *pellets*.

Figura 4.22: Comparação de densificação de *S. subsalsus* com *A. niger* sob diferentes diâmetros e eficiências de biofloculação.



Fonte: Elaboração própria (2019)

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 Conclusões

Neste estudo, obteve-se *pellets* do fungo filamentoso *Aspergillus niger* por fermentação submersa, a 28°C e 150 rpm, em meio de cultivo com extrato de levedura e sacarose (pH 5,7). Nesta condição, curvas de crescimento do fungo indicaram um tempo de cultivo de 24 h para obtenção de células em provável fase exponencial e suspensões com concentração de  $2,530 \pm 0,424$  g SST/L.

Na densificação de biomassas de quatro espécies de cianobactérias a partir do cocultivo com *pellets* do fungo filamentoso, na proporção fungo: cianobactéria 1:1 (g SST/ g SST), foram verificadas diferentes eficiências de biofloculação. Para *Anabaena variabilis* e *Anabaena siamensis*, a biofloculação não ocorreu, pois após 24 h de cocultivo houve aumento da densidade óptica. Enquanto que com *Spirulina maxima* e *Synechococcus subsalsus*, foram obtidas eficiências de biofloculação de 92% (em 48 h) e de 94% (em 24 h), respectivamente, sendo esta última selecionada para estudos posteriores.

A concentração inicial da espécie *Synechococcus subsalsus* no cocultivo com o fungo teve influência sobre as eficiências de biofloculação obtidas. Após 24 h de floculação com 0,738 g/L de biomassa a eficiência de biofloculação foi inferior a 20%, enquanto que com 0,345 g/L de biomassa a eficiência foi 94%, indicando que concentrações mais elevadas de biomassa ou cultivos mais antigos podem prejudicar a biofloculação.

A proporção fungo:cianobactéria também influenciou a eficiência de biofloculação. Na biofloculação de *S. subsalsus* com *A. niger*, quando a proporção foi alterada de 1:1 para 1:5, a eficiência de biofloculação em 24 h foi reduzida de 94% para 59%.

Quantidades reduzidas de matéria orgânica no cocultivo influenciaram negativamente a biofloculação, sendo necessária a suplementação do meio para que fossem alcançadas eficiências mais altas. Na condição de menor reposição de matéria orgânica (14%), a eficiência alcançada em 24 h de cocultivo aumentou de 59% (sem reposição) para 70%, enquanto que com as reposições com maiores concentrações de matéria orgânica (82% e 96%), a eficiência foi menor (16 a 33%). Contudo, após 48 h de cocultivo, nas duas condições com



maior reposição (82% e 96%), as eficiências obtidas superaram as das reposições menores, atingindo-se uma eficiência de biofloculação de 98%. Esses resultados indicam que pode haver um maior crescimento heterotrófico da cianobactéria quando a matéria orgânica é mais abundante ou ainda que o fungo utiliza a matéria orgânica disponível para crescimento, havendo menor agregação das células da cianobactéria no período inicial do cocultivo.

O pH do cocultivo apresentou influência sobre a eficiência obtida na biofloculação de *S. subsalsus* com *A. niger*. Valores muito baixos de pH (pH 3) resultaram no aumento da densidade óptica, sem ser notado o aumento do tamanho dos *pellets*. Por outro lado, o pH ajustado para 6 mostrou ser mais favorável para biofloculação na proporção 1:5 com reposição de 14% de extrato de levedura e sacarose.

Neste estudo foi possível atingir fatores de concentração das suspensões da cianobactéria *S. subsalsus* entre 3,2 e 62,3. Enquanto a condição de proporção 1:5 com 96% de reposição em 48 h, que alcançou uma maior eficiência de floculação (98%), obteve um fator de concentração de 3,2, a condição de proporção 1:5 sem reposição em 24 h (eficiência de 59%) obteve o maior fator de concentração, de 62,3. A condição de proporção 1:1, que alcançou uma elevada eficiência em apenas 24 h (94%) com menor crescimento dos *pellets*, obteve um fator de concentração de 10,3. Percebe-se que maiores concentrações foram atingidas com *pellets* de menor tamanho, indicando que devem ser priorizadas condições de cocultivo que atinjam elevadas eficiências de biofloculação e menor crescimento dos *pellets*.

O método de densificação estudado neste trabalho mostrou-se efetivo para o aumento da concentração de suspensões de cianobactérias, podendo ser promissor na redução dos custos envolvidos na digestão anaeróbia para obtenção de biogás a partir destes micro-organismos.

## 5.2 Sugestões

Apesar de terem sido obtidas eficiências de até 98%, ainda é necessário o estudo de outros fatores para que a floculação com fungos filamentosos seja técnica e economicamente viável, sendo sugerido o seguinte:

- estudar causas e soluções da turvação do sobrenadante, de forma que esta

não prejudique a reutilização do meio de cocultivo na produção de mais biomassa;

- otimizar as condições utilizadas no cocultivo. Para tal, seria recomendada a realização de um planejamento experimental, para avaliar a influência das principais variáveis do processo, como tempo de cultivo dos *pellets* fúngicos, temperatura, pH e velocidade de agitação, sobre as eficiências obtidas;
- avaliar os efeitos da etapa de densificação nos processos de aplicação da biomassa, como por exemplo no tratamento de efluentes e na produção de biogás a partir da digestão anaeróbia dos pellets obtidos ao final do cocultivo;
- avaliar a formação de *pellets* fúngicos em meios de cultivo mais econômicos como os constituídos de resíduos ou águas residuárias e seu efeito na densificação de biomassas.

## REFERÊNCIAS

- ACIÉN, F. G. et al. Photobioreactors for the production of microalgae. In: **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products**. Woodhead Publishing, 2017. p. 1–44.
- AKTAS, T. S. et al. A comparison of zeta potentials and coagulation behaviors of cyanobacteria and algae. **Desalination and Water Treatment**, v. 48, n. 1–3, p. 294–301, 2012.
- ALAM, A. et al. Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 1, p. 29–33, 2014.
- ALAM, A. et al. Bioflocculation as an innovative harvesting strategy for microalgae. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 573–583, 2016.
- ANAHAS, A. M. P.; MURALITHARAN, G. Isolation and screening of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production by evaluating the fuel properties from fatty acid methyl ester (FAME) profiles. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 9–17, 2015.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington: 2005.
- AVILAN, L. et al. Phototrophic hydrogen production from a clostridial [FeFe] hydrogenase expressed in the heterocysts of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5775–5783, 2018.
- BARROS, A. I. et al. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1489–1500, 2015.
- BHATTACHARYA, A. et al. A rapid method for fungal assisted algal flocculation: Critical parameters & mechanism insights. **Algal Research**, v. 21, p. 42–51, 2017.
- BILAD, M. R. et al. Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 343–352, 2012.
- BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 41–54, 2010.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- CHEN, C.-L.; CHANG, J.-S.; LEE, D.-J. Dewatering and Drying Methods for Microalgae. **Drying Technology**, v. 33, n. 4, p. 443–454, 2015.
- CHEN, J. et al. A comparative study between fungal pellet- and spore-assisted

microalgae harvesting methods for algae bioflocculation. **Bioresource Technology**, v. 259, n. January, p. 181–190, 2018.

CHEN, L. et al. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. Cultivated in an open-pond system. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 9–15, 2013.

CHOI, Y. N. et al. Efficient harvesting of *Synechocystis* sp. PCC 6803 with filamentous fungal pellets. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 4, p. 2225–2231, 2016.

COHEN, A. et al. Collapsing aged culture of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* produces compound(s) toxic to photosynthetic organisms. **PLOS One**, v. 9, n. 6, p. 1–7, 2014.

COSTA, S. S. et al. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552–562, 2018.

CYANOSITE. **BG-11 Medium for Blue Green Algae**. Disponível em: <<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/media/table/BG11.html>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

DASSEY, A. J.; THEEGALA, C. S. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 241–245, 2013.

DAVIES, F. K. et al. Engineering Limonene and Bisabolene Production in Wild Type and a Glycogen-Deficient Mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, p. 1–11, 2014.

DIAZ, E. M. et al. Algal-Fungal Mutualism: Cell Recognition and Maintenance of the Symbiotic Status of Lichens. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, v. 3, n. 3, p. 1052, 2016.

DOE, **National Algal Biofuels Technology Review**. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Bioenergy Technologies Office. Disponível em: <[https://energy.gov/sites/prod/files/2016/06/f33/national\\_algal\\_biofuels\\_technology\\_review.pdf](https://energy.gov/sites/prod/files/2016/06/f33/national_algal_biofuels_technology_review.pdf)>.

DOS SANTOS, R. R. et al. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresource Technology*, v. 204, p. 38–48, 2016.

ELDRIDGE, R. J.; HILL, D. R. A.; GLADMAN, B. R. A comparative study of the coagulation behavior of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, n. 6, p. 1667–1679, 2012.

FEOFILOVA, E. P. The fungal cell wall: Modern concepts of its composition and biological function. **Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 711–720, 2010.

FERREIRA, A. F. et al. Biological hydrogen production by *Anabaena* sp. - Yield, energy and CO<sub>2</sub> analysis including fermentative biomass recovery. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 179–190, 2012.

GAO, Z. et al. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. **Energy & Environmental Science**, v.

5, p. 9857–9865, 2012.

GARG, S. et al. Flotation of marine microalgae: Effect of algal hydrophobicity. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 471–474, 2012.

GARG, S.; WANG, L.; SCHENK, P. M. Flotation separation of marine microalgae from aqueous medium. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 636–641, 2015.

GERARDO, M. L. et al. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. **Algal Research**, v. 11, p. 248–262, 2015.

GERKEN, H. G.; DONOHOE, B.; KNOSHAUG, E. P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. **Planta**, v. 237, n. 1, p. 239–253, 2013.

GÓMEZ, S.; FERNÁNDEZ, F. J.; VEGA, M. C. Heterologous Expression of Proteins in *Aspergillus*. In: GUPTA, V. K. (Ed.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2016. p. 55–68.

GULTOM, S. O.; ZAMALLOA, C.; HU, B. Microalgae harvest through fungal pelletization - Co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Aspergillus niger*. **Energies**, v. 7, n. 7, p. 4417–4429, 2014.

GUO, S. et al. Characterization of flocculating agent from the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1 for efficient biomass harvest. **Bioresource Technology**, p. 1–5, 2013.

HANSEL, A.; TADROS, M. H. Characterization of two pore-forming proteins isolated from the outer membrane of *Synechococcus* PCC 6301. **Current Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 321–326, 1998.

HAO, W. et al. Surface characteristics of microalgae and their effects on harvesting performance by air flotation. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 10, n. 1, p. 125–133, 2017.

HENDRY, J. I. et al. Metabolic model of *Synechococcus* sp. PCC 7002: Prediction of flux distribution and network modification for enhanced biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 190–197, 2016.

HOICZYK, E.; HANSEL, A. Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1191–1199, 2000.

HORGAN, K.; MURPHY, R. Pharmaceutical and Chemical Commodities from Fungi. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi biology and applications**. Third ed. Wiley-Blackwell, 2018. p. 169–198.

KANCHANATIP, E. et al. Fouling characterization and control for harvesting microalgae *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* using a submerged, disc-type ultrafiltration membrane. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 23–30, 2016.

KANG, R. et al. Interactions between organic and inorganic carbon sources during mixotrophic cultivation of *Synechococcus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 18, p. 1429–1432, 2004.

- KELLY, S. et al. Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2113–2117, 2006.
- KHETKORN, W.; LINDBLAD, P.; INCHAROENSAKDI, A. Enhanced biohydrogen production by the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 23, p. 12767–12776, 2010.
- KIM, D. et al. Bioresource Technology Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3163–3168, 2011.
- KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 112–123, 2013.
- KUHN, A. M.; WINSTON, D. **Winston & Kuhn's Herbal Therapy and Supplements: A Scientific and Traditional Approach**. 2. ed. Nova Iorque: Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- KUMAR, R. S. et al. Distribution of Epiphytic Cyanobacteria on Lichens from Eastern Ghats of Tamil Nadu. **Journal of pure and applied microbiology**, v. 7, n. March, p. 515–522, 2013.
- LAMA, S. et al. Bioresource Technology Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 464–470, 2016.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **Journal of Applied Phycology**, p. 559–567, 2009.
- LEE, R. E. **Phycology**. 4. ed. Cambridge: University of Cambridge Press, 2008.
- LI, T. et al. Mimicking lichens: Incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017.
- LI, Y. et al. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10861–10867, 2011.
- LI, Y. et al. Flocculation mechanism of *Aspergillus niger* on harvesting of *Chlorella vulgaris* biomass. **Algal Research**, v. 25, n. January, p. 402–412, 2017.
- LI, Y. et al. Amino acids in cell wall of Gram-positive bacterium *Micrococcus* sp. hsn08 with flocculation activity on *Chlorella vulgaris* biomass. **Bioresource Technology**, v. 249, n. October 2017, p. 417–424, 2018.
- LIU, Y. et al. Cell surface reactivity of *Synechococcus* sp. PCC 7002: Implications for metal sorption from seawater. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 169, p. 30–44, 2015.
- LIU, Y.; LIAO, W.; CHEN, S. Study of pellet formation of filamentous fungi

Rhizopus oryzae using a multiple logistic regression model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 1, p. 117–128, 2008.

LOURENÇO, S. O. et al. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. **Phycologia**, v. 41, n. 2, p. 158–168, 2002.

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.

MCKELVEY, S. M.; MURPHY, R. A. Biotechnological Use of Fungal Enzymes. In: **Fungi biology and applications**. 1. ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2018. p. 201–225.

MENDEZ, L. et al. Comparison of Chlorella vulgaris and cyanobacterial biomass: cultivation in urban wastewater and methane production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 5, p. 703–712, 2016.

MIKULEC, J.; POLAKOVIČOVÁ, G.; CVENGROŠ, J. Flocculation Using Polyacrylamide Polymers for Fresh Microalgae. **Chemical Engineering and Technology**, v. 38, n. 4, p. 595–601, 2015.

MÖLLERS, K. B. et al. Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

MOREIRA, J. L. B.; CARVALHO, C. B. M. DE; FROTA, C. C. **Visualização bacteriana e colorações**. Fortaleza: UFC, 2015.

MURADOV, N. et al. Fungal-assisted algal flocculation: Application in wastewater treatment and biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, 2015.

MUTHULAKSHMI, M. et al. Extraction , partial purification , and antibacterial activity of phycocyanin from Spirulina isolated from fresh water body against various human pathogens. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 3, p. 7–11, 2012.

NATIONAL ALLIANCE FOR ADVANCED BIOFUELS AND BIO-PRODUCTS (NAABB). **National Alliance for Advanced Biofuels and Bioproducts Final Report**. 2014. Disponível em: <<http://energy.gov/eere/bioenergy/downloads/national-alliance-advanced-biofuels-and-bioproducts-synopsis-naabb-final>>.

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

NOBLES, D. R.; ROMANOVICZ, D. K.; BROWN, R. M. Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase. **Plant physiology**, v. 127, p. 529–542, 2001.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 459–466, 2003.

PALINSKA, K. A.; KRUMBEIN, W. E. Perforation patterns in the peptidoglycan

wall of filamentous cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 1, p. 139–145, 2000.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 3, 2006.

PARK, J. J. et al. Cell-specific gene expression in *Anabaena variabilis* grown phototrophically, mixotrophically, and heterotrophically. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.

PARMAR, A. et al. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10163–10172, 2011.

PEREIRA JR., N.; PINTO DA SILVA BON, E.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de Bioprocessos**. 1. ed. Rio de Janeiro: 2008

PÉREZ, L. et al. An effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. **Biomass and Bioenergy**, v. 97, p. 20–26, 2017.

PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 24, p. 159–171, 2013.

PRAJAPATI, S. K. et al. A method for simultaneous bioflocculation and pretreatment of algal biomass targeting improved methane production. **Green Chem.**, v. 18, n. 19, p. 5230–5238, 2016.

PRIEGNITZ, B. E. et al. The role of initial spore adhesion in pellet and biofilm formation in *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 1, p. 30–38, 2012.

RIOS, S. D. et al. Dynamic Microfiltration in microalgae harvesting for biodiesel Production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 4, p. 2455–2460, 2011.

ROSSIGNOL, N. et al. Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: Compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. **Aquacultural Engineering**, v. 20, n. 3, p. 191–208, 1999.

ROY, S. et al. Thermophilic biohydrogen production using pre-treated algal biomass as substrate. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 157–166, 2014.

RUFFING, A. M. Engineered cyanobacteria: Teaching an old bug new tricks. **Bioengineered Bugs**, v. 2, n. 3, p. 136–149, 2011.

SALIM, S. et al. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 849–855, 2011.

SALIM, S. et al. Mechanism behind autoflocculation of unicellular green microalgae *Ettlia texensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 174, p. 34–38, 2014.

SALIM, S.; VERMUE, M. H.; WIJFFELS, R. H. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-



- flocculation. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 49–55, 2012.
- SHARMA, N. K.; STAL, L. J. The economics of cyanobacteria-based biofuel production: challenges and opportunities. In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. (Eds.). **Cyanobacteria: An Economic Perspective**. 1. ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. p. 167–180.
- SRINUANPAN, S. et al. A rapid method for harvesting and immobilization of oleaginous microalgae using pellet-forming filamentous fungi and the application in phytoremediation of secondary effluent. **International Journal Of Phytoremediation**, v. 20, n. 10, p. 1017–1024, 2018.
- SVANSTRÖM, Å. **Trehalose Metabolism and Stress Resistance in Aspergillus niger**. Swedish University of Agricultural Sciences, 2013.
- THIEL, T. et al. Complete genome sequence of *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **Standards in Genomic Sciences**, v. 9, n. 2, p. 562–573, 2014.
- TIEN, C. J.; SIGEE, D. C.; WHITE, K. N. Copper adsorption kinetics of cultured algal cells and freshwater phytoplankton with emphasis on cell surface characteristics. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 5, p. 379–389, 2005.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012.
- UDUMAN, N. et al. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, n. 1, 2010.
- UMMALYMA, S. B. et al. Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 216–221, 2016.
- UMMALYMA, S. B. et al. Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 227–235, 2017.
- VANDAMME, D. et al. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 114–119, 2012.
- VANDAMME, D. et al. Reversible Flocculation of Microalgae using Magnesium Hydroxide. **Bioenergy Research**, 2014.
- VANDAMME, D. et al. Inhibition of alkaline flocculation by algal organic matter for *Chlorella vulgaris*. **Water Research**, v. 88, p. 301–307, 2016.
- VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 233–239, 2013.
- VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 77–93, 2004.
- VECHT-LIFSHITZ, S. E.; MAGDASSI, S.; BRAUN, S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 9, p. 890–896, 1990.

WALKER, G.; WHITE, N. Introduction to Fungal Physiology. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi biology and applications**. 3. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2018. p. 1–34.

WAN, C. et al. Bioresource Technology Bioflocculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 207–212, 2013.

WAN, C. et al. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 251–257, 2015.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. Introduction to the Cyanobacteria. In: WHITTON, B. A. (Ed.). **Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**. Chichester: Wiley Blackwell, 2014 . p. 1–14.

WILEY, P. E.; BRENNEMAN, K. J.; JACOBSON, A. E. Improved Algal Harvesting Using Suspended Air Flotation. **Water Environment Research**, v. 81, n. 7, p. 702–708, 2009.

WREDE, D. et al. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PLOS One**, v. 9, n. 11, 2014.

YAN, R. et al. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp. PCC 7942 under mixotrophic conditions: Comparison with photoautotrophic condition. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 657–668, 2012.

ZAMALLOA, C. et al. Ionic effects on microalgae harvest via microalgae-fungi co-pelletization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, n. September 2016, p. 145–155, 2017.

ZHANG, J.; HU, B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 529–535, 2012.

ZHENG, Q. et al. Dynamics of Heterotrophic Bacterial Assemblages within *Synechococcus* cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 1–16, 2018.

ZHOU, W. et al. Novel fungal pelletization-assisted technology for algae harvesting and wastewater treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 214–228, 2012.

ZHOU, W. et al. Filamentous fungi assisted bio-flocculation: A novel alternative technique for harvesting heterotrophic and autotrophic microalgal cells. **Separation and Purification Technology**, v. 107, p. 158–165, 2013.

## APÊNDICE – Artigo a ser submetido na Water Science & Technology

### Bioflocculation of Cyanobacteria with Pellets of *Aspergillus niger*

Helena Rodrigues Oliveira - [helenaro3110@gmail.com](mailto:helenaro3110@gmail.com)

Isabelli Dias Bassin - [isabelli@eq.ufri.br](mailto:isabelli@eq.ufri.br)

Magali Christe Cammarota – [christe@eq.ufri.br](mailto:christe@eq.ufri.br)

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Bloco E, Sala 203, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: +55213938-7568 Fax: ++55213938-7567

#### Abstract

Bioflocculation of four species of cyanobacteria (*Anabaena variabilis*, *Anabaena siamensis*, *Spirulina maxima*, and *Synechococcus subsalsus*) with pellets of *Aspergillus niger* was studied. Cocultures with fungal:cyanobacterial ratio of 1:1 (g/g TSS) resulted in bioflocculation efficiencies of 92% in 48 h with *S. maxima* and 94% in 24 h with *S. subsalsus*. With *A. variabilis* and *A. siamensis* bioflocculation did not occur. The influence of some factors on bioflocculation efficiency was studied with *S. subsalsus*. It was found that when cyanobacteria concentration was twice smaller, efficiency increased from 19% to 94%. A higher fungal:cyanobacterial ratio (1:1) resulted in a higher efficiency (94% vs. 59% for 1:5 ratio). Organic matter concentration (yeast extract and sucrose) in coculture increased efficiencies from 59% to 98% in 48 h. Coculture carried out at pH 6 resulted in a higher efficiency, whereas at pH 3 no bioflocculation occurred. Biomass concentrations of 3.2 to 62.3 times were obtained, with the highest values being attained with smaller pellets (2.5 mm). Bioflocculation method is feasible, but more studies are necessary to establish coculture conditions that allow high bioflocculation efficiencies with lower pellet growth.

**Keywords:** *Aspergillus niger*; Bioflocculation; Cyanobacteria.

#### Introduction

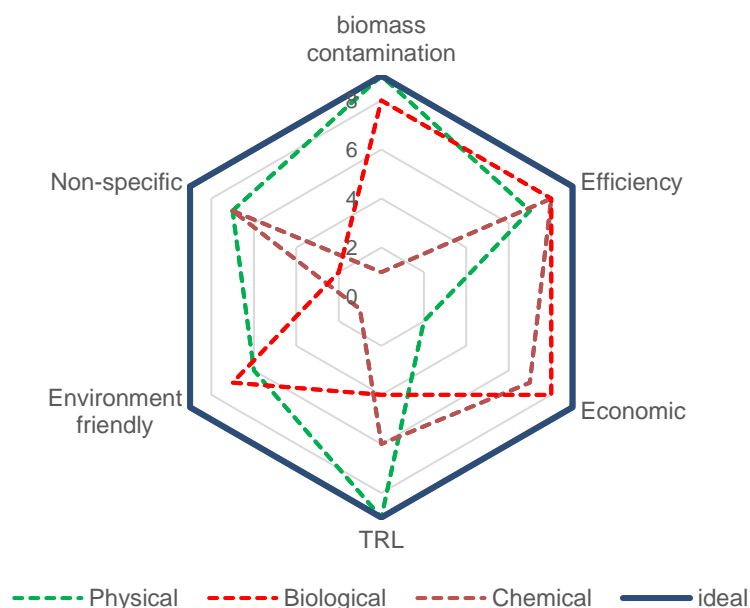
Photosynthetic microorganisms such as cyanobacteria and microalgae have been made important due to carbon fixation, mitigating the effects of carbon dioxide build up in the atmosphere. These organisms have promising applications owing to their high biomass productivity and simple nutritional requirements. In addition, there is no need for agricultural lands nor for clean water, which helps increase the interest in these biomasses. Furthermore, cyanobacteria can be used for renewable energy production, such as biodiesel, bioethanol, biohydrogen, and biogas (Shuba and Kifle, 2018).

However, one of the main hurdles of industrial processes based in microalgal and cyanobacterial biomass is the difficulty of downstream processing of the culture, especially due to the high quantity of water. Cultures have low biomass concentration (about 0.5 g/L, achieving 5 g/L in photobioreactors) (Vandamme, Foubert and Muylaert, 2013). The optimization of harvesting technologies is essential to large scale production of biofuels and biogas (Prajapati *et al.*, 2016). Harvesting is difficult because of colloidal stability of cell suspension, due to highly negative surface charge and reduced size of cells (2-20  $\mu\text{m}$ ) (Vandamme, Foubert and Muylaert, 2013). Thus, biomass harvesting is one of the main obstacles of cyanobacteria and microalgae based processes, adding up to 20 to 30% of total production costs (Pragya, Pandey and Sahoo, 2013).

Many separation processes have been used to remove water from algae biomass. These processes may be physical (sedimentation, flotation, filtration, centrifugation and physical

flocculation), chemical (chemical flocculation), or biological (microbial bioflocculants-associated bioflocculation, microorganism-associated bioflocculation and self-flocculation). Figure 1 shows a comparison between densification methods with respect to key parameters, such as efficiency, operating costs, environmental impacts, strain specificity, biomass contamination and technology readiness level (TRL). This image show that biological methods come close to an ideal method in terms of efficiency, costs, impacts and biomass contamination, but are usually strain specific and are still on bench scale phase (Li *et al.*, 2017). Physical methods such as centrifugation and filtration have elevated costs (Mata, Martins and Caetano, 2010; DOE, 2016) whereas methods as sedimentation and flotation have low efficiencies without previous flocculation (Barros *et al.*, 2015; DOE, 2016). Chemical methods cause environmental impacts and biomass contamination (Wan *et al.*, 2015).

**Figure 1** Comparison of biomass densification methods.



The use of filamentous fungus for bioflocculation can be an effective method for biomass harvesting, significantly reducing costs associated with this step and allowing for economically viable renewable energy production (Choi *et al.*, 2016; Prajapati *et al.*, 2016; Bhattacharya *et al.*, 2017; Y. Li *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). However, mechanisms of this bioflocculation method are still uncertain (Bhattacharya *et al.*, 2017). In this study, the bioflocculation potential of four species of cyanobacteria was assessed, along with factors that may influence flocculation.

## Materials and Methods

### Microorganisms

*Aspergillus niger* was provided by Laboratório de Microbiologia do Petróleo, at Escola de Química (UFRJ). *A. niger* culture was maintained on PDA slants at 28°C. Fungal spore suspension ( $10^5$  spores/L) was inoculated into 100 mL liquid media (10 g/L sucrose, 15 g/L yeast extract), in an orbital shaker, at 28°C and 150 rpm for 24 h for pellets production.

Bioflocculation of four cyanobacteria species with *A. niger* pellets was assessed: *Anabaena siamensis*, *Anabaena variabilis*, *Spirulina maxima*, supplied by Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF), at Instituto de Química (UFRJ); and *Synechococcus subsalsus*, supplied by Banco de Microalgas Aidar & Kutner (BMA&K), at Instituto Oceanográfico (USP).

## Preliminary Bioflocculation Tests

For preliminary bioflocculation tests, the cyanobacteria were cultivated in 250 mL flasks, with 150 mL of BG-11 media, at 26 °C under a 12:12 h light-dark cycle. Flocculation tests were conducted by adding pre-cultivated *A. niger* pellets in cyanobacteria culture, at 1:1 fungal:cyanobacteria ratio (g /g total suspended solids - TSS), totaling 100 mL in conic flasks, which were agitated at 100 rpm in an orbital shaker at 28°C for 24 h (Choi *et al.*, 2016; Bhattacharya *et al.*, 2017).

Bioflocculation efficiency (%) was determined by the equation  $\frac{(OD_0 - OD_t)}{OD_0} * 100$ , where  $OD_0$

is the initial optical density and  $OD_t$  is final optical density, both at 750 nm (except for *S. maxima*, at 730 nm).

## Experiments with *Synechococcus subsalsus*

Further experiments were conducted with *S. subsalsus*. For these experiments, cyanobacteria cells were grown in 500 mL flasks, with 300 mL of BG-11 media at 23 °C under a 12:12 h light-dark cycle. Flocculation tests were conducted by adding pre-cultivated *A. niger* pellets in cyanobacteria culture, totaling 100 mL in conic flasks, which were agitated at 100 rpm in an orbital shaker at 28°C for 24 to 48 h. Bioflocculation efficiency was determined by the equation 1, and OD was measured at 750 nm. The influence of a lower fungal:cyanobacteria ratio of 1:5 was evaluated. Also using this ratio, organic matter concentration in coculture was assessed, maintaining the remaining conditions with and without adding fungal media components, according to Table 1. In this table, supplementation percentage refers to the original fungal media percentage added to coculture. In these experiments, Chemical Oxygen Demand (COD) and pellet diameter were also evaluated.

**Table 1** Sucrose and yeast extract supplementation.

Condition	Sucrose (g)	Yeast extract (g)	Supplementation percentage (%)
0	0	0	0
1	0.14	0.22	14
2	0.46	0.69	46
3	0.81	1.22	82
4	0.96	1.44	96

Effect of pH on bioflocculation of *S. subsalsus* was also assessed with 14% supplementation (condition 1), with adjustment of pH between 3.0 and 6.0, in addition to the same condition without pH adjustment (initial pH = 8.1). pH was adjusted with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

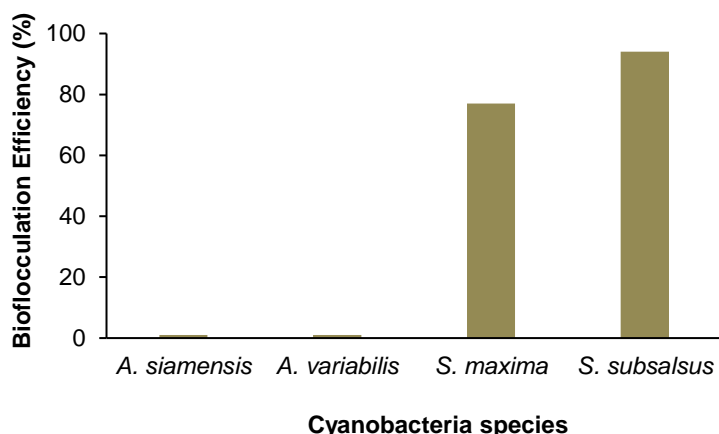
## Results and Discussion

### Preliminary Bioflocculation Tests

The bioflocculation efficiency depends on the cyanobacteria species. Figure 2 shows efficiencies for bioflocculation of *Anabaena siamensis*, *Anabaena variabilis*, *Spirulina maxima* and *Synechococcus subsalsus* with pre-cultivated pellets of *A. niger* for 24 h.

**Figure 2** Bioflocculation of *A. siamensis*, *A. variabilis*, *S. maxima* and *S. subsalsus* with *A. niger* pellets in

at fungal:cyanobacteria ratio 1:1 for 24 h.



*A. siamensis* and *A. variabilis* had final OD higher than initial OD, and their biofloculation efficiencies were represented as 0%. Interaction of cyanobacteria cells and fungal hyphae wasn't enough to cause a reduction in cyanobacterial concentration in the coculture. The increase in OD was probably due to cyanobacteria growth from fungal medium residual organic matter, as both species are capable of heterotrophic growth (Khetkorn, Lindblad and Incharoensakdi, 2010; Park *et al.*, 2013). Li *et al.* (2017) also reported increased cyanobacterial growth when cultured with heterotrophic organisms. For *S. maxima* and *S. subsalsus*, supernatant was clearer in 24 h, reaching biofloculation efficiencies of 77% and 94%, respectively.

With cyanobacteria *S. subsalsus*, another experiment was conducted, varying cyanobacteria initial concentration, by adjusting their time of growth. More concentrated biomass (0.738 g TSS/L) resulted in much lower biofloculation efficiency (19%), while almost all of less concentrated biomass (0.345 g TSS/L) was attached to fungal pellets (94%). These results indicate that either cyanobacteria initial concentration (Gultom, Zamalloa and Hu, 2014) or their growth time (Mikulec, Polakovičová and Cvengroš, 2015) may have an important role in its attachment to fungal hyphae.

It's possible that differences between studied species are responsible for the different results obtained. In lichen formation, fungi cells are capable of identifying compatible microalgae from affinity with surface glycoproteins (Diaz *et al.*, 2016). Moreover, surface proteins were reported to play an important role in biofloculation of microalgae with *Aspergillus niger* (Y. Li *et al.*, 2017).

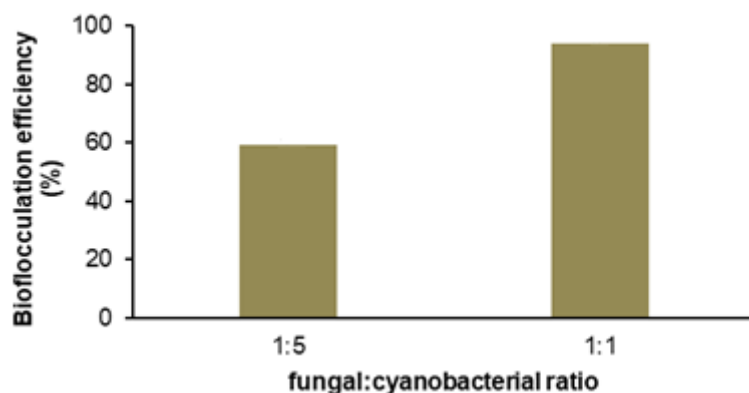
A striking feature that differentiates the studied genera is the presence of cellulose in the superficial structures of the cells. While the genus *Anabaena* is marked by the expressive presence of a mucilaginous sheath containing cellulose (Nobles, Romanovicz and Brown, 2001; Tien, Sigee and White, 2005), species of the other two genera do not have cellulose and have a more discreet sheath (Nobles, Romanovicz and Brown, 2001; Kuhn and Winston, 2007; Muthulakshmi *et al.*, 2012). The presence of a thick sheath containing cellulose can be determinant to impair the interaction of the surfaces of fungal cells and hyphae, which would explain the low biofloculation efficiencies in the *Anabaena* species. Biofloculation of algal biomass using *Aspergillus niger* pellets has been shown to have good efficiencies with *Chlorella vulgaris* (Gultom, Zamalloa and Hu, 2014), which also does not have cellulose in its outer structures (Gerken, Donohoe and Knoshaug, 2013).

### Experiments with *Synechococcus subsalsus*

When experiments with *S. subsalsus* were conducted maintaining the same conditions but reducing fungal:cyanobacterial ratio to 1:5, flocculation efficiency was 37% lower than with 1:1 ratio (Figure 3). This result is in accordance with other studies, which show that efficiency

increases with number of pellets added to coculture (Choi *et al.*, 2016; Bhattacharya *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018).

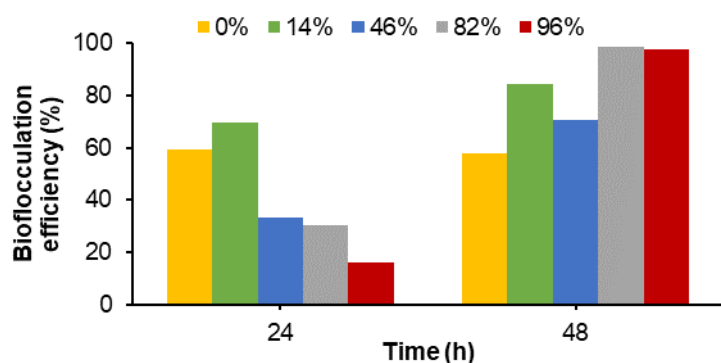
**Figure 3** Bioflocculation efficiency of *S. subsalsus* with *A. niger* pellets with fungal:cyanobacterial ratio of 1:1 and 1:5.



By lowering fungal:cyanobacterial ratio, a smaller quantity of pellets was added to coculture, which also led to less organic matter being taken from fungal culture to coculture. Thus, the reduced organic matter might have influenced in efficiency reduction. Studies suggest that lower carbon concentration or its absence in coculture impair flocculation with premade pellets (Choi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018).

In order to evaluate if the concentration of organic matter would have an effect on the bioflocculation of *S. subsalsus* with *A. niger*, the replacement of different proportions of yeast extract and sucrose in the cocultivation was studied. The tests were conducted in a fungal:cyanobacterial ratio of 1:5 (g / g TSS), a condition in which a smaller volume of the fungus residual culture medium was added to the coculture. In a first test performed it was noticeable the increase in efficiency when yeast extract and sucrose were added (Figure 4).

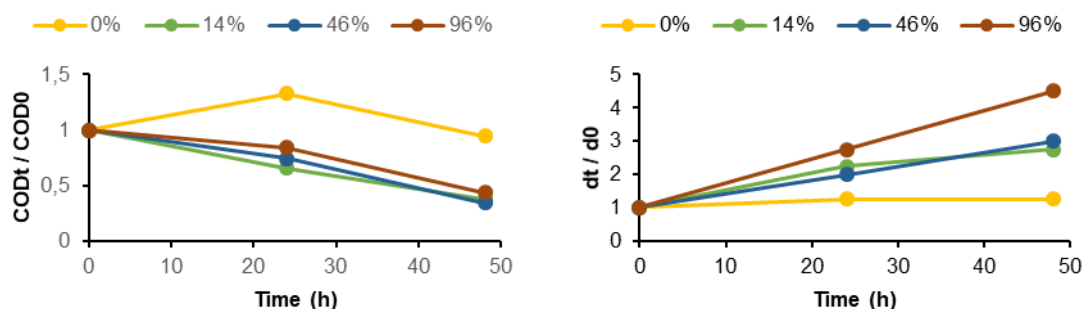
**Figure 4** Bioflocculation of *S. subsalsus* with *A. niger* pellets, at fungal:cyanobacterial ratio of 1:5 with and without organic supplementation.



Only with the lowest supplementation condition (14%) bioflocculation efficiency (70% with 24 h and 84% in 48 h) was higher than the obtained in the condition without supplementation in 24 h (< 60%). However, after 48 h of coculture, all conditions reached greater efficiencies, achieving 98% (with 82% and 96% supplementation), while the condition without replacement remained at an efficiency of 58%. These results seem to indicate that the fungus uses residual organic matter of the culture medium for growth and increase of the pellets in the first 24 hours, and later aggregation of cyanobacteria occurs. In cocultures with 0%, 14% and 96% of replacement, it is possible to perceive a greater variation between 0 and 24 h in the first two conditions and a greater reduction of the supernatant coloring between 24 h and 48 h in condition 3 (Figure S1 on Supplementary Material).

Figure 5 shows coculture media's COD reduction and pellet growth. There was a decrease in COD in all conditions, except in condition 1, in which there was a slight increase in COD. However, in this condition COD values were low and close the method detection limit. Considering remaining conditions, the highest COD intake (35%) occurred with 14% supplementation, followed by 26% and 16% with 46% and 96% supplementation. Between 24 and 48 h, COD consumption was 42%, 54% and 48% with 14%, 46% and 96% supplementation, respectively. At 14%, the COD consumption rate is practically the same in 48 h of coculture. However, under conditions of higher supplementation (46% and 96%), the consumption rate is higher after 24 h, indicating a faster consumption of organic matter in this period.

**Figure 5** COD reduction (A) and pellet growth (B) during coculture with and without carbon supplementation.



This variation may indicate a relationship between the consumption of organic matter and aggregation of cyanobacteria. If the difference in bioflocculation efficiencies in 24 h and 48 h is evaluated for the different supplementation conditions, the greatest variations in bioflocculation efficiencies occur in periods when COD is consumed more rapidly. Under the conditions of higher supplementation (46% and 96%), in which bioflocculation efficiency was low after 24 h and elevated after 48 h, COD consumption was faster (2 to 3 times) after the first 24 h of coculture, while in the condition of lower supplementation (14%), bioflocculation efficiency was already relatively high with 24 h, not increasing at the same rate after 48 h, observing the maintenance of COD consumption in the  $\Delta$  interval.

Pellet diameter in cocultures increased in all conditions. The largest pellet size was achieved in the highest supplementation condition after 48 h. In condition 1, there is almost no increase in pellet size, but the green color assumed by the pellets during coculture was visible. In the remaining conditions, pellet size was considerably increased. In conditions 3 and 4, the increase was linear during coculture. However, in condition 2, pellet increase was smaller between 24 h and 48 h.

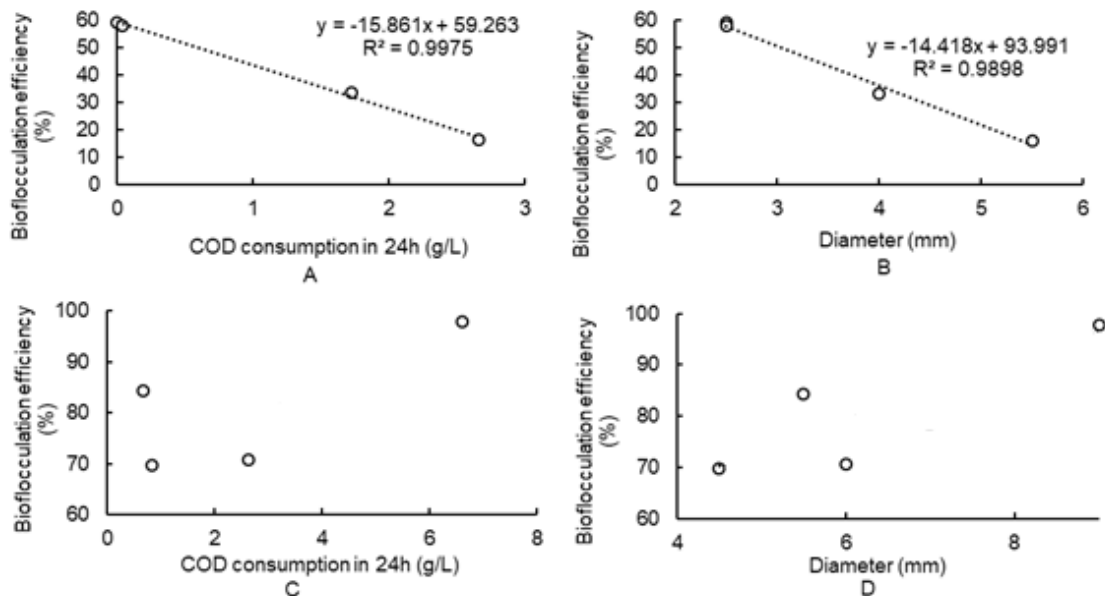
In Figure 6, COD consumption and pellet diameter data in the two evaluated periods (24 h and 48 h) were plotted with the bioflocculation efficiency, separating the data in which the efficiency was low (up to 60% - Figure 6 A and B) of data in which efficiency was high (> 60% - Figure 6 C and D). The trend lines indicate that both COD consumption and pellet diameter are inversely proportional to the efficiency in the first 24 hours of coculture. That is, both are more related to fungus growth than to cyanobacterial aggregation to fungal pellets. While with high bioflocculation efficiencies, it is perceived a direct relationship of efficiency with COD consumption and pellet diameter.

In the literature, it was also reported the increase of bioflocculation efficiency and faster formation of pellets in coculture (Zhou *et al.*, 2013; Gultom, Zamalloa and Hu, 2014; Chen *et al.*, 2018). Choi *et al.* (2016), who used pre-cultivated *Aspergillus oryzae* pellets to assist *Synechocystis sp.* flocculation, reported the need for addition of carbon sources to obtain high bioflocculation efficiencies, as was verified in the present study. Furthermore, in studying the addition of alternative carbon sources to glucose (xylose, glycerol and sodium acetate), authors pointed out that the initial bioflocculation efficiency (1 day of coculture) was higher with alternative sources, whereas after 2 days of coculture the experiment in which glucose was used as carbon source achieved higher efficiencies. According to the authors, the probable explanation for this



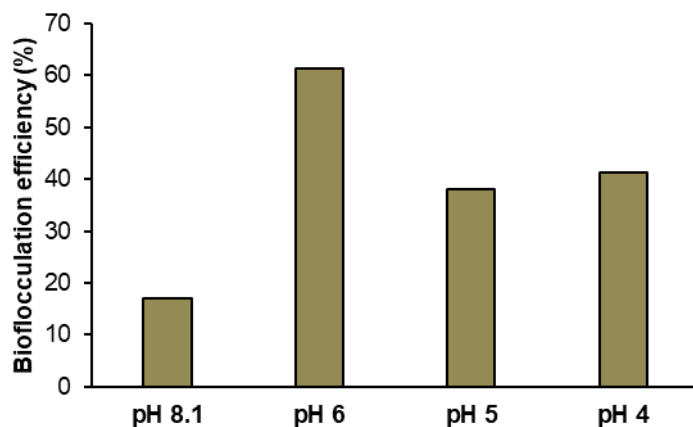
phenomenon would be the one of greater heterotrophic growth of the cyanobacteria in the medium with glucose in the initial period of the co-cultivation. This factor may also have been the reason why at the beginning of the coculture higher supplementation conditions reached lower efficiency than the conditions with less organic matter.

**Figure 6** Relation of flocculation efficiency, COD consumption and pellet diameter in coculture of *S. subsalsus* and *A. niger* with 1:5 ratio with and without supplementation: Efficiencies lower than 60% (A and B) and efficiencies higher than 60% (C and D).



A bioflocculation test was performed with the best result in 24 h (condition 2) at different pH values, in order to evaluate the effect of this variable on bioflocculation efficiency (Figure 7). Intermediate pH values (4 and 5) resulted in also intermediate bioflocculation efficiencies (41% and 38%, respectively), while the condition that reached the highest efficiency was at pH 6 (61%). The control (without pH adjustment), in which initial pH was 8.1, reached a bioflocculation efficiency lower than all other studied conditions (17%), except that of pH 3, in which the efficiency could not be calculated due to the increase in OD (data not shown).

**Figure 7** Bioflocculation efficiency of *S. subsalsus* with *A. niger* pellets in 24 h with 14% carbon supplementation in different pH values.



pH 6 is closer to the pH of coculture without adjustment (8.1), which required less  $H_2SO_4$  addition. The addition of larger amounts of acid may have affected the aggregation mechanism of cyanobacteria cells, decreasing the efficiency achieved.

However, these results differ from previous studies. Chen *et al.* (2018) reported efficiencies above 80% even at low pH values (3, 3.5 and 4) in the bioflocculation of *Chlorella* sp. with *Penicillium* sp. Studies in higher pH ranges (5.4 - 7.4) also did not indicate the influence of pH on the bioflocculation efficiency of *Synechocystis* sp. with *Aspergillus oryzae* (Choi *et al.*, 2016).

Concentration factor of cyanobacterium *S. subsalsus* was calculated in the two conditions with higher bioflocculation efficiency with fungal:cyanobacterial ratio of 1:1 and 1:5. In the case of the first ratio (at 28 °C and 100 rpm), the cyanobacteria suspension was concentrated 10.3 times, from 0.216 g/L in the suspension to 2.236 g/L in the fungal pellets. In the second ratio (at 28 °C, 100 rpm and with 96% supplementation), the concentration factor was 3.2, from 0.907 g/L in the suspension to 2.904 g/L in the fungal pellets.

When compared to other biomass densification methods, the concentration obtained was lower than that achieved by more traditional methods. Algae biomass can be concentrated in up to 10 times with flotation (Garg *et al.*, 2012), with flocculation with chitosan up to 44 times and with chemical flocculation with FeCl<sub>3</sub>, up to 50 times (Lama *et al.*, 2016). With centrifugation, much higher concentration factors of up to 150 can be achieved (Grima *et al.*, 2003). However, all these methods involve the addition of chemicals (except for centrifugation, which involves high energy costs), which contaminate the biomass, limiting its posterior application.

Although the condition with 1:5 ratio achieved a higher bioflocculation efficiency, the concentration of cyanobacteria in the pellets was lower, because pellet size was larger in this condition, making their volume also larger. However, the growth of cyanobacteria during coculture could not be quantified, with the possibility of a larger mass of cyanobacteria in the pellets than the removed from the supernatant.

The concentration factors also indicate that smaller pellets with greater surface area would be much more efficient for densification. In comparison to other conditions, including the ones with lower bioflocculation efficiencies, concentration of up to 62 times were found for pellets with diameters of 2.5 mm. Therefore, we should prioritize coculture conditions that result in high bioflocculation efficiencies with lower pellet growth.

## Conclusions

Bioflocculation of four species of cyanobacteria with pellets of *A. niger* resulted different bioflocculation efficiencies, and the best results (efficiencies of up to 98%) were obtained by *Synechococcus subsalsus*, which was selected for further studies.

Some factors contributed for higher bioflocculation efficiencies of *S. subsalsus* in the cocultivation with the fungus: lower initial concentration of *S. subsalsus*, lower fungal:cyanobacterial ratio, more amount of organic matter in the cocultivation (supplementation), and pH 6.

The highest concentration factors (62.3) were obtained with smaller pellets, indicating the need to seek for coculture conditions that lead to high efficiencies with lower pellet growth.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq), Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. We would also like to thank Laboratório de Hidrorrefino, Engenharia de Processos e Termodinâmica Aplicada, at Escola de Química (UFRJ) for providing cultures used in the preliminary bioflocculation tests.

## References

- Barros, A. I. et al. (2015) 'Harvesting techniques applied to microalgae: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, pp. 1489–1500. doi: 10.1016/j.rser.2014.09.037.
- Bhattacharya, A. et al. (2017) 'A rapid method for fungal assisted algal flocculation: Critical parameters & mechanism insights', *Algal Research*. Elsevier B.V., 21, pp. 42–51. doi: 10.1016/j.algal.2016.10.022.
- Chen, J. et al. (2018) 'A comparative study between fungal pellet- and spore-assisted microalgae harvesting methods for algae bioflocculation', *Bioresource Technology*. Elsevier, 259(January), pp. 181–190. doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.040.
- Choi, Y. N. et al. (2016) 'Efficient harvesting of *Synechocystis* sp. PCC 6803 with filamentous fungal pellets', *Journal of Applied Phycology*. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), pp. 2225–2231. doi: 10.1007/s10811-015-0787-y.
- Diaz, E. M. et al. (2016) 'Algal-Fungal Mutualism: Cell Recognition and Maintenance of the Symbiotic Status of Lichens', *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 3(3), p. 1052. Available at: [https://www.researchgate.net/profile/Rocio\\_Santiago/publication/308688702\\_Algal-Fungal\\_Mutualism\\_Cell\\_Recognition\\_and\\_Maintenance\\_of\\_the\\_Symbiotic\\_Status\\_of\\_Lichens/inks/57eadd7c08ae91a0c8d3f148/Algal-Fungal-Mutualism-Cell-Recognition-and-Maintenance-of-](https://www.researchgate.net/profile/Rocio_Santiago/publication/308688702_Algal-Fungal_Mutualism_Cell_Recognition_and_Maintenance_of_the_Symbiotic_Status_of_Lichens/inks/57eadd7c08ae91a0c8d3f148/Algal-Fungal-Mutualism-Cell-Recognition-and-Maintenance-of-)
- DOE (2016) National Algal Biofuels Technology Review, U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Bioenergy Technologies Office. doi: 10.2172/1259407.
- Garg, S. et al. (2012) 'Flotation of marine microalgae: Effect of algal hydrophobicity', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 121, pp. 471–474. doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.111.
- Gerken, H. G., Donohoe, B. and Knoshaug, E. P. (2013) 'Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production', *Planta*, 237(1), pp. 239–253. doi: 10.1007/s00425-012-1765-0.
- Grima, E. M. et al. (2003) 'Recovery of microalgal biomass and metabolites : process options and economics', 20, pp. 491–515.
- Gultom, S. O., Zamalloa, C. and Hu, B. (2014) 'Microalgae harvest through fungal pelletization - Co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Aspergillus niger*', *Energies*, 7(7), pp. 4417–4429. doi: 10.3390/en7074417.
- Khetkorn, W., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2010) 'Enhanced biohydrogen production by the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012', *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, 35(23), pp. 12767–12776. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.08.135.
- Kuhn, A. M. and Winston, D. (2007) *Winston & Kuhn's Herbal Therapy and Supplements: A Scientific and Traditional Approach*. 2nd edn. Nova Iorque: Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins.
- Lama, S. et al. (2016) 'Bioresource Technology Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride , chitosan and alkaline flocculation', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 220, pp. 464–470. doi: 10.1016/j.biortech.2016.08.080.
- Li, T. et al. (2017) 'Mimicking lichens: Incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform', *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 10(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13068-017-0736-x.
- Li, Y. et al. (2017) 'Flocculation mechanism of *Aspergillus niger* on harvesting of *Chlorella vulgaris* biomass', *Algal Research*, 25(January), pp. 402–412. doi: 10.1016/j.algal.2017.06.001.
- Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S. (2010) 'Microalgae for biodiesel production and other applications: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), pp. 217–232. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020.

- Mikulec, J., Polakovičová, G. and Cvengroš, J. (2015) 'Flocculation Using Polyacrylamide Polymers for Fresh Microalgae', *Chemical Engineering and Technology*, 38(4), pp. 595–601. doi: 10.1002/ceat.201400639.
- Muthulakshmi, M. et al. (2012) 'Extraction , partial purification , and antibacterial activity of phycocyanin from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens', *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(3), pp. 7–11.
- Nobles, D. R., Romanovicz, D. K. and Brown, R. M. (2001) 'Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase?', *Plant physiology*, 127, pp. 529–542. doi: 10.1104/pp.010557.
- Park, J. J. et al. (2013) 'Cell-specific gene expression in *Anabaena variabilis* grown phototrophically, mixotrophically, and heterotrophically', *BMC Genomics*, 14(1). doi: 10.1186/1471-2164-14-759.
- Pragya, N., Pandey, K. K. and Sahoo, P. K. (2013) 'A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier, 24, pp. 159–171. doi: 10.1016/j.rser.2013.03.034.
- Prajapati, S. K. et al. (2016) 'A method for simultaneous bioflocculation and pretreatment of algal biomass targeting improved methane production', *Green Chem. Royal Society of Chemistry*, 18(19), pp. 5230–5238. doi: 10.1039/C6GC01483F.
- Shuba, E. S. and Kifle, D. (2018) 'Microalgae to biofuels: "Promising" alternative and renewable energy, review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81(April 2016), pp. 743–755. doi: 10.1016/j.rser.2017.08.042.
- Tien, C. J., Sigee, D. C. and White, K. N. (2005) 'Copper adsorption kinetics of cultured algal cells and freshwater phytoplankton with emphasis on cell surface characteristics', *Journal of Applied Phycology*, 17(5), pp. 379–389. doi: 10.1007/s10811-005-5555-y.
- Vandamme, D., Foubert, I. and Muylaert, K. (2013) 'Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 31(4), pp. 233–239. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.005.
- Wan, C. et al. (2015) 'Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 184, pp. 251–257. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.081.
- Zhou, W. et al. (2013) 'Filamentous fungi assisted bio-flocculation: A novel alternative technique for harvesting heterotrophic and autotrophic microalgal cells', *Separation and Purification Technology*, 107, pp. 158–165. doi: 10.1016/j.seppur.2013.01.030.

Supplementary Material

## Bioflocculation of Cyanobacteria with Pellets of *Aspergillus niger*

Helena Rodrigues Oliveira - [helenaro3110@gmail.com](mailto:helenaro3110@gmail.com) (corresponding author)

Isabelli Dias Bassin - [isabelli@eq.ufrj.br](mailto:isabelli@eq.ufrj.br)

Magali Christe Cammarota – [christe@eq.ufrj.br](mailto:christe@eq.ufrj.br)

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Bloco E, Sala 203, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: +55213938-7568 Fax: ++55213938-7567

**Figure S1** Coculture of *S. subsalsus* with *A. niger*, at fungal:cyanobacteria ratio 1:5 (g/g TSS), 28 °C and 100 rpm, in the conditions without supplementation (0h, 24 h, and 48 h, respectively A, B, and C), with 14% supplementation (0h, 24 h, and 48 h, respectively C, D, and E) and with 96% supplementation (0h, 24 h, and 48 h, respectively F, G, and H).

