



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral



Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida
Silvestre

**Cianobactérias isoladas de lagos naturais do Parque
Estadual do Rio Doce-MG potencialmente produtoras
de biocombustível**

Raquel da Silva Cordeiro

Belo Horizonte- MG

Abril- 2015

RAQUEL DA SILVA CORDEIRO

**Cianobactérias isoladas de lagos naturais do Parque
Estadual do Rio Doce potencialmente produtoras de
biocombustível**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor pelo
Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação
e Manejo da Vida Silvestre.

Belo Horizonte- MG

Abril- 2015

Esta tese foi realizada no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA)- Departamento de Biologia Geral- Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Águas- Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Francisco Antônio Rodrigues Barbosa (ICB- UFMG)

CO-ORIENTADORA:

Prof. Dra. Sérgia Maria Starling Magalhães (FAR- UFMG)

APOIO FINANCEIRO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq- número do processo 141752/2012-2 e 471757/2013-6);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG- número do processo CRA- APQ 01389-13);
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT-Acqua);
- Programa Brasileiro de Pesquisas Ecológicas de longa duração (PELD/CNPq).

Dedico

*Aos meus pais, Vanderli Cordeiro Gois e Clisonilda da Silva Gois, por todo o amor e sacrifícios devotados a mim, com o intuito de me oferecer a melhor herança:
A EDUCAÇÃO!*

Ao Álvaro Silva por todo amor e paciência!

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Esses quatro anos de doutorado foram do início ao fim de muito aprendizado. Foram várias as perguntas, algumas com respostas, outras sem. Foram vários experimentos desastrosos e outros muito bons. Foram muitos resultados péssimos e outros excelentes. E foram esses excelentes que me motivaram e que me motivam a continuar trilhando esse caminho. Ao final, esta Tese de doutorado resume todas essas experiências que tive ao longo desses anos por meio de erros e acertos. Desta maneira eu quero agradecer a todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para concretização desse trabalho.

Em especial...

Ao professor Francisco Barbosa, por toda confiança a mim depositada e por sempre acreditar em meu potencial e por ter acreditado em mim. Pelos valiosos ensinamentos na minha carreira profissional e pessoal.

À professora Sérgio Magalhães, por todas as discussões teóricas desde o início do desenvolvimento do projeto. Pelos conselhos, os incentivos e pela amizade, compreensão e apoio. Sua presença em minha vida foi fundamental nesses 4 anos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao CNPq e a FAPEMIG pelo suporte financeiro por meio dos projetos Universais.

Ao Programa de pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre (ECMVS). Aos docentes por colaborarem na minha formação.

Aos secretários Cris, Fred e Noeli sempre solícitos em resolver minhas pendências e pela amizade ao longo desses 4 anos. A D. Nailda pelos cafezinhos!

Ao Centro Brasil-Argentina de Biotecnologia coordenado pela professora Dra. Iracema de Oliveira Moraes por toda a bagagem inicial sobre produção de biocombustíveis de terceira geração a partir de cianobactérias, micro e macroalgas.

A prof. Dra. Vanya Pasa pelo suporte laboratorial nas análises dos óleos. As técnicas Nilva e a Mirra pelas análises de cromatografia gasosa dos óleos.

Aos professores Dr. Ronaldo Nagem (ICB) e Dr. Ricardo (FAR) pelo suporte laboratorial.

Aos professores Dr. José Fernandes, Dra. Paulina Maia, Dr. Luiz Henrique Rosa, Dra. Arnola C. Rietzler e Dr. Cleber Cunha Figueiredo pelas contribuições nas fases de avaliação do projeto e da qualificação da Tese.

A banca avaliadora desta Tese composta pelo Dr. Bruno Brasil, Dra. Sandra Azevedo, Dr. Carlos Rosa e Dr. Ary Correa Júnior pelas valiosas contribuições fornecidas para melhoria do trabalho.

Aos professores Dr. José Etham Barbosa, Dra. Luciana Gomes e Dra. Joseline Mollozi, Dr. Marcos Callisto e Dra. Célia Sant'anna pelos valiosos ensinamentos compartilhados comigo na construção do meu pensamento científico bem como profissionais.

A Izabela, Duda e Dirce por toda dedicação ao projeto como apoio técnico. Pela amizade e pelos vários momentos de alegrias.

Ao Marcelo, Thaís, Geraldo, Fernanda, Simone, Alice, Marlene e Nazaré pelo suporte laboratorial e pelos momentos de descontração e amizade.

A Graça por toda ajuda, paciência, suporte e amizade.

A todos os meus familiares da Paraíba e do Rio de Janeiro.

A toda minha família “de casa”, aos meus pais pelo amor e dedicação, aos meus irmãos: Alexandro Luís e Fernando pela força. As minhas cunhadas, Mônica e Rose, pelos momentos de risadas e aos meus sobrinhos Pedro Henrique, Vivi e Jamille pelos momentos de descontração.

Ao meu amado noivo, Álvaro Manassés, por ser minha fortaleza em todos os momentos. Por cada sorriso colocado no meu rosto quando as coisas não davam certas, pelo jeito gentil, carinhoso e prestativo. Por aguentar minhas lamentações, frustrações e minhas ausências. Meu amor, eu só tenho a agradecer a Deus por ter colocado um anjo como você em minha vida, que me protege e me enche de alegrias e muito amor.

A D. Fátima, Sr. Bosco, Tininha, Marília, Heiko e os pepecos pelas palavras de apoio e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do LIMNEA pelos momentos de descontração no laboratório e fora dele. Em especial à Thécia, Izabela, Duda, Marcelão, Maione, Claudineia, Dirce, Júnia, Paula docinhos, Beatrice, Dani, Carlos, Lucas, Matheus, Karen, Lorena, Liss, Paula, Natália, Fernanda, Mariana, Diego, Nelsão, Laura, Daniel, Ludmila e Luciana.

A Thécia pela amizade, conversas e caronas! E pelos encontros regados a cidra!

Aos ex-LEAq que não saem do meu coração e que nunca vão sair, pois com eles vivi momentos inesquecíveis, regados a muita risada, cervejas e muita amizade, à Dani, Shakira, Evaldo, Klivia, Paty, Tutu, Gil, Daniel, Ronaldo, Eline, Gaby, Rosa e Alessandra.

A todos os amigos do curso de pós-graduação ECMVS que tive muito prazer de conhecer, pelas trocas de conhecimento, convívio, amizade e risos.

Aos meus grandes amigos que guardarei para sempre em meu coração Shakira, Neto, Dani, Klivia, Gaby, Deborah, Alessandra, Hérica, Iria, Elineide, Jordanny, Agelise e Allana, por torcerem sempre, pelos momentos de conversas, cinemas, cervejas, festinhas, risadas na labuta diária, músicas, estatísticas, por tudo. Tenho certeza que sem vocês seria tudo mais difícil.

Ao meu grande e fiel amigo, que está sempre ao meu lado em todos os momentos, aquele que nunca me deixa na mão e que me inspira a mais profunda confiança. Sem a sua ajuda tenho certeza que nada disso seria possível... DEUS!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
APRESENTAÇÃO.....	11
INTRODUÇÃO GERAL.....	14
Referências.....	18
REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
Referências.....	50
PATENTE.....	57
Manuscrito 1 - Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria.....	61
Abstract.....	63
Introduction.....	64
Materials and Methods.....	66
Results.....	69
Discussion.....	74
Conclusions.....	78
Acknowledgements.....	79
Resumo.....	80
References.....	81
Manuscrito 2- Co-culture of cyanobacteria and microalgae: enhancing biomass productivity, lipid content and biofuel quality.....	86
Abstract.....	88
Introduction.....	89
Methods.....	91
Results and Discussion.....	96
Conclusion.....	109
Acknowledgements.....	109
References.....	109

Manuscrito 3- Two-stage cultivation of <i>Microcystis</i>: a strategy to enhance biodiesel production.....	113
Abstract.....	115
Introduction	116
Materials and Methods.....	117
Results.....	119
Discussion.....	123
Conclusion.....	128
Acknowledgements	128
References.....	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132

RESUMO

O interesse em biocombustíveis tem aumentado devido à busca por recursos de energia com menor impacto ambiental, que venham garantir a segurança energética no futuro. Cianobactérias podem ser consideradas fontes promissoras como matéria-prima para produção de biocombustíveis, devido principalmente a suas vantagens que incluem simplicidade de cultivo, maior eficiência fotossintética e taxa de crescimento, maior produção de biomassa e maiores produtividades lipídicas em comparação as sementes oleaginosas terrestres, e maiores taxas de fixação de CO₂ e liberação de O₂. No entanto, o desafio atual prende-se ainda à necessidade de reduzir os custos de produção para que esta fonte energética se torne economicamente viável. O objetivo principal deste trabalho foi investigar o potencial das cianobactérias como matéria-prima na produção de biodiesel em condições laboratoriais controladas e avaliar perfil do extrato graxo. Foram selecionadas quatro espécies cianobactérias do gênero *Microcystis* para o estudo. Estas espécies foram cultivadas em três meios de cultura com diferentes composições e disponibilidade de nitrogênio e fósforo. Foi avaliado o crescimento, a produtividade de biomassa e a produção de lipídios. Os resultados indicaram que um meio de cultivo mais pobre em nutrientes pode favorecer o crescimento celular e estimular a acumulação de lipídios. Todas as espécies demonstraram potencial como fonte de biomassa para produção de biodiesel, entre as espécies *M. protocystis* aquela que apresentou a maior produção lipídica. Investigou-se o uso da estratégia de cocultura entre cinco espécies de cianobactérias e duas espécies de microalgas. Os resultados mostraram um significativo aumento na produtividade e no teor de lipídios. Adicionalmente, o óleo obtido da maioria das cianobactérias e microalgas em mono e cocultura de acordo com equações empíricas calculadas para qualificar o biodiesel mostraram bom potencial para a produção de biodiesel. Em um terceiro momento avaliou-se o uso da estratégia de cultivo em duas fases utilizando quatro espécies de *Microcystis*. Na primeira fase as espécies foram cultivadas em condição de produtividade de biomassa máxima e na segunda fase foram colocadas em estresse por privação de nutrientes. Esta abordagem de cultivo levou ao aumento do conteúdo de lipídios de todas as *Microcystis* testadas e verificou-se que a composição dos ácidos graxos dessas espécies não é afetada pelo estresse induzido, sugerindo que esta estratégia por ser aplicada na produção de biodiesel uma vez que a composição do extrato graxo não foi modificada. Os resultados obtidos neste estudo por meios de várias abordagens demonstram que as cianobactérias podem ser um potencial recurso para produção de biodiesel. Destaca-se que a plasticidade das espécies lhes permite ser cultivada em condições mais limitadas de nutrientes, sem afetar a produção de lipídios. Esta característica pode ser uma alternativa à redução de custos e uma possível solução para um problema ambiental crescente. Além disso, as abordagens aqui estudadas devem ser melhoradas para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: Privação de nitrogênio e fósforo, estratégia de cocultura, cultivo em duas fases, *Microcystis*, biodiesel.

ABSTRACT

The interest in biofuels has increased due to search for energy resources with less environmental impact that would ensure energy security in the future. Recently, microalgae and cyanobacteria have been considered as a promising source for biofuels and chemical feedstocks. This interest in the cyanobacteria it is due mostly to their main advantages that include simplicity of culture, higher photosynthetic efficiency and growth rates, higher biomass production and oil productivities compared to typical terrestrial oil-seed, and higher rates of CO₂ fixation and O₂ release. However, the current challenge is still arrested in the need of reducing the production costs so that this energy source becomes economically viable compared to the traditional fuels. This main objective this work was to investigate the potential of the cyanobacteria as raw material in the biofuel production in controlled laboratorial conditions and to evaluate the productive potential of those oils. First, we performed studies to choose the cyanobacteria species and the best cultivation conditions. Then, we selected four species of *Microcystis*. Initially, we evaluated the effects of the culturing media and the levels of nitrogen and phosphorus on the growth, biomass productivity and lipid production. These results indicate that a culture media poorer in nutrients can favour the cellular growth and to stimulate the accumulation of lipids. This result affects directly the costs in the production of the cultivation reducing the consumption of nutrients in the cultivation systems. All of the species demonstrated potential as biomass source for biodiesel production, among the species *M. protocystis* presented the largest lipid production. We also investigate the use of the strategy of co-culture among five cyanobacteria and two microalgae species. The results indicate that the co-culture strategy resulted in significant increase in the productivity and lipid content. Additionally, the oil obtained from most cyanobacteria and microalgae in mono- and co-culture was excellent for biodiesel production according to estimated empirical equations to qualify the biodiesel. We also evaluated the use of the strategy of two-stage cultivation in four *Microcystis*. This cultivation approach showed to be an effective strategy to increase the lipid content for biodiesel production from all *Microcystis* species tested. Moreover, it also revealed not affected the fatty acid composition in these species thus suggesting this strategy of cultivation can be applied for biodiesel production since the basic properties of biodiesel will not be modified. Finally, all the results obtained in this study by several approaches demonstrate that the cyanobacteria can be a potential resource for biodiesel production. It is highlighted that the plasticity of the species allows them to be grown in more limited conditions of nutrients without affecting lipid production. This characteristic may be an alternative to reduce costs and a possible solution for a growing environmental problem. Besides, the approaches studied here should be improved for the production of biodiesel

Keywords: Nitrogen and phosphorus deprivation, strategy of co-culture, two-stage cultivation, *Microcystis*, biodiesel.

APRESENTAÇÃO

Essa tese teve como objetivo principal investigar o potencial de cianobactérias como matéria-prima na produção de biocombustível em condições laboratoriais controladas e avaliar a composição de ácidos graxos dos óleos obtidos.

De acordo a Resolução nº 29 do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) está dispensando de autorização ao Patrimônio Genético (PG) pesquisas que visem à elaboração de óleos fixos, de óleos essenciais ou de extratos quando esses resultarem de isolamento, extração ou purificação, nos quais as características do produto final sejam substancialmente equivalentes à matéria prima original. Desta maneira, o CGEN analisou nossa pesquisa, e nos dispensou de solicitar acesso ao PG nos termos desta resolução.

Durante os primeiros anos do doutorado foram realizados diversos experimentos preliminares visando escolher as cianobactérias mais satisfatórias para responder ao objetivo geral da Tese. Neste sentido, nós testamos diferentes espécies de cianobactérias e clorofíceas do Banco de culturas de Algas e Cianobactérias do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA). Foram realizados experimentos preliminares em 12 cianobactérias (*Microcystis viridis*, *M. panniformis*, *M. novacekii*, *M. aeruginosa*, *M. protocystis*, *Pseudanabaena* sp., *Phormidium* sp, *Merismopedia* sp., *Synechococcus* sp, *Synechococcus nidulans*, *Synechocystis* sp. e *Nostoc* sp.) e duas clorofíceas (*Chlorella vulgaris* e *Kirchneriella obesa*). Como o objetivo estava focado em cianobactérias os esforços foram centrados na obtenção da melhor condição de cultivo desses micro-organismos. Inicialmente, foi otimizada a produção de biomassa para realizar as extrações. Logo, foram avaliados diferentes meios de cultura e de concentrações de nutrientes em diferentes condições físicas para obter a melhor condição de cultivo. Dentre as espécies avaliadas o gênero *Microcystis*

se destacou tanto pelo seu rápido crescimento e acúmulo de biomassa em um período relativamente curto quanto pela versatilidade em se adequar as condições impostas. Desta maneira, quatro espécies de *Microcystis* foram escolhidas para dá continuidade as pesquisas.

Estas espécies foram isoladas de Lagoas Naturais do Parque Estadual do Rio Doce localizado no trecho médio da Bacia do Rio Doce no estado de Minas Gerais. O número de registro de coleta é 057/2015 emitida em 8/9/2015 e com validade até 8/9/2016. As espécies *Microcystis panniformis* J. Komárek, J. Komárková-Legnerová, C.L. Sant'Anna, M.T.P. Azevedo, & P.A.C. Senna, (2002) e *Microcystis novacekii* (Komárek) Compère (1974) são provenientes da Lagoa Dom Helvécio, enquanto *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (1846) e *Microcystis protocystis* Crow (1923) foram coletadas, identificadas e isoladas da Lagoa Jacaré.

Após escolhidas às espécies de cianobactérias e as condições mais adequadas para obtenção de biomassa, foram realizados diversos tipos de experimentos, alternando o método de extração e tipo de solvente empregado. Foi testado extração à frio e à quente com os seguintes solventes: n-hexano, clorofórmio, éter de petróleo, metanol e diclorometano. No entanto, os resultados mais satisfatórios foram obtidos utilizando extração à quente no aparelho de Soxhlet com diclorometano. Com posse nesses resultados conseguimos aperfeiçoar o método de extração de lipídios a partir das cianobactérias testadas. Então a partir desses experimentos iniciais foi possível realizar um depósito de Patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Além disso, os resultados desses experimentos fazem parte do primeiro manuscrito da Tese. Este teve como objetivos avaliar o efeito do meio de cultura e das concentrações de nitrogênio e fósforo no crescimento, produtividade de biomassa e produção lipídica de 4 espécies do gênero *Microcystis* (*M. novacekii*, *M. aeruginosa*, *M. panniformis* e *M.*

protocystis) cultivadas nos meios líquidos ASM-1, BG-11 e BBM. Este manuscrito foi aceito para a publicação na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

Cianobactérias, e em especial *Microcystis*, são comumente conhecidas em todo mundo por formar florações gerando um grande aporte de biomassa em ecossistemas aquáticos com sérias consequências ecológicas aos ecossistemas e a quem dependa destes. Com base nisso, foi pensado que essa biomassa poderia ser aproveitada como fonte de matéria-prima para a produção de biocombustível. No entanto, essa biomassa poderia ter em sua composição outros micro-organismos. Para isso, foram realizados experimentos em que espécies de *Microcystis* interagem entre si e com outras microalgas. Nesse caso, utilizamos duas clorofíceas que são bastante comuns em ambientes aquáticos (*Chlorella vulgaris* e *Kirchneriella obesa*). Então, foi avaliado o uso da estratégia de cocultura entre cianobactérias e microalgas em relação ao crescimento, a produtividade de biomassa, teor lipídico e composição de ácidos graxos. Os resultados desses experimentos estão apresentados no manuscrito 2.

Por fim, foi pensado que se for possível retirar essas espécies de ambientes impactados e cultivá-las em condições de cocultura seria possível reduzir o uso de nutrientes nos sistemas de cultivo por meio da técnica de cultivo em duas fases. Na primeira fase as espécies crescem em biomassa e em seguida são transferidas para sistemas de cultivo livre de nutrientes. Desta forma, ocasionaria um estresse nesses micro-organismos que resultaria em um aumento do acúmulo de lipídios intracelular. Foi observado que esta técnica tem muitas vantagens, no entanto, tem sido pouca explorada. Diante disso, os resultados desses experimentos geraram o manuscrito 3.

Como resultado de todo esse esforço foi possível obter um depósito de Patente, um artigo aceito e dois manuscritos redigidos que serão apresentados no decorrer da Tese. Por fim muitas ideias e perguntas para as próximas pesquisas.

INTRODUÇÃO GERAL

A busca por recursos energéticos de menor impacto ambiental que permitam assegurar as necessidades futuras de energia tem sido um dos maiores desafios da atualidade. Nesta conjuntura, a biomassa vegetal destaca-se como uma fonte de energia alternativa ao uso dos combustíveis fósseis. Além de ser um recurso renovável, possui importante papel ecológico na fixação do CO₂ da atmosfera por meio da fotossíntese (HOSSAIN et al., 2008).

A atual produção de biocombustíveis é proveniente principalmente da biomassa vegetal, o que requer energia significativa para irrigação, plantação, fertilização e colheita (VASUDEVAN e BRIGGS, 2008), além de exigir extensas áreas para cultivo. Outra desvantagem do uso de biomassa vegetal para produção de biocombustível é o comprometimento da produção de alimentos, o que afeta diretamente o custo dos mesmos. Todos esses fatores tornam o uso da biomassa vegetal um recurso limitado.

Na busca por alternativas para substituir a biomassa vegetal terrestre há uma grande expectativa em relação à utilização de microalgas e cianobactérias, devido ao seu elevado potencial como fonte produtiva de biocombustível (BERLA et al., 2013).

Espécies fitoplanctônicas são reconhecidas fontes de importantes insumos industriais, sendo a maioria das classes Chlorophyceae, Chrysophyceae e Bacillariophyceae (VIMALARASAN et al., 2011). Cianobactérias vem se destacando como promissoras na produção de novos produtos naturais (SINGH et al., 2005) e, particularmente, na geração de bioprodutos energeticamente importantes como bioetanol, biogás, biohidrogênio, bioquerosene e o biodiesel (CHRISTI, 2007). Por ser ainda uma área incipiente, a produção de biodiesel por cianobactérias ainda é pouco explorada. Estudos sobre produtividade de biomassa, conteúdo lipídico e perfil de

ácidos graxos pela biomassa desses organismos são escassos na literatura (MIAO e WU, 2006).

As cianobactérias possuem diversas vantagens para os processos de produção de biodiesel, destacando-se o fato de possuírem quantidades consideráveis de lipídios, presentes nas membranas dos tilacóides. Possuem baixas exigências de crescimento, principalmente água, luz solar, CO₂ e nutrientes e minerais. Além disso, apresentam outras vantagens competitivas em relação às plantas superiores e às outras microalgas, como maior taxa de crescimento e capacidade de fixação de CO₂, alta eficiência fotossintética e maior produtividade, tornando os cultivos relativamente simples e, por conseguinte, mais baratos (QUINTANA et al., 2011; SARSEKEYEVA et al., 2015). Cianobactérias ainda apresentam outras características atraentes como redução de custos associados à colheita, transporte e ausência de terra arável para seu cultivo (CAMPBELL, 2008).

Tais propriedades incentivam a realização de estudos com esse grupo de organismos para identificação de espécies e estabelecimento de processos mais eficientes para a produção de biocombustíveis. Verifica-se na literatura que o rendimento lipídico de cianobactérias pode variar entre 7 a 45% dependendo da espécie testada, do sistema de cultivo aplicado e do método de extração utilizado (KARATAY e DÖNMEZ, 2011; SHARATHCHANDRA e RAJASHEKHAR, 2011; KAIWAN-ARPORN et al., 2012; DA RÓS et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Apesar do combustível obtido a partir das cianobactérias representar uma alternativa promissora os custos de produção ainda são elevados necessitando de métodos que otimizem a produção e reduzam o custo para viabilizar esta fonte energética (QUINTANA et al., 2011; SARSEKEYEVA et al., 2015). Nesse contexto, novas pesquisas visando à identificação de espécies e a aplicação de novas abordagens para o

estabelecimento de condições de produtividade de biomassa máxima e de produção lipídicas são contribuições fundamentais para a produção de energia sustentável.

Considerando o exposto, essa tese foi proposta a partir da seguinte **hipótese**:

- **Cianobactérias em condições adequadas de cultivo aumentam o teor de lipídios que podem ser utilizados na síntese de biodiesel.**

Predição: A produção lipídica proveniente de cianobactérias pode ser otimizada pela seleção de espécies e manipulação das condições de cultivo.

O **objetivo principal** deste trabalho foi investigar o potencial das cianobactérias como matéria-prima na produção de biocombustível em condições laboratoriais controladas e avaliar o perfil do extrato graxo produzido.

Os **objetivos específicos**:

- Selecionar, dentre as espécies de cianobactérias mantidas em cultura no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática do ICB/UFMG, as que possuem potencial para a produção de lipídios visando à síntese de biodiesel;
- Otimizar as condições de cultivo das cianobactérias selecionadas para maior produção de biomassa e da fração lipídica;
- Extrair e caracterizar a fração lipídica das espécies de cianobactérias selecionadas;
- Investigar o potencial da estratégia de cocultura entre cianobactérias e microalgas para obtenção de maior rendimento lipídico e qualidade da fração lipídica extraída;

- Averiguar o potencial do cultivo de duas fases para aumento da biomassa e produção de lipídica.

Esta tese está estruturada no seguinte formato: a primeira parte traz os embasamentos teóricos que nortearam o desenvolvimento desta Tese. Em seguida, é apresentado o número do depósito de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial referente ao método de extração lipídica que foi desenvolvido durante o trabalho. Ressalta-se que não somos autorizados a divulgar o relatório descritivo da Patente. Na terceira parte são apresentados os três manuscritos desenvolvidos ao longo do trabalho de Tese. Seguem-se as considerações finais sobre os resultados obtidos.

Referências

BERLA, B. M.; SAHA, R.; IMMETHUN, C. M.; MARANAS, C. D.; MOON, T. S.; PAKRASI, H. B. Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 246, p. 10.3389, 2013

CAMPBELL, M. N. Biodiesel: algae as a renewable source for liquid fuel. **Guelph Engineering J.**, v.1, p. 2 -7.2008

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306. 2007.

DA RÓS, C. S. P.; SILVA, M. E.; SILVA-STENICO, M. F. F.; DE CASTRO, H. F. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 84, p. 177-182, 2012.

KAIWAN-ARPORN, P.; HAI, P. D.; NGUYEN, T. T.; ANNACHHATRE, A. P. Cultivation of cyanobacteria for extraction of lipids. **Biomass and Bioenergy**, v. 44, p. 142-149, 2012.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3632-3635, 2011.

MIAO, X.L.; WU, Q.Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841 – 846, 2006.

SARSEKEYEVA, F.; ZAYADAN, B.K.; USSERBAEVA, A.; BEDBENOV, V.S.; SINETOVA, M.A.; LOS, D.A. Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. **Photosynth Research**, v. 125, p. 329-340, 2015.

SHARATHCHANDRA, K.; RAJASHEKHAR, M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 2, p. 83-97, 2011.

SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; DE CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus sp.* PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. **Algal Research**, v. 3, p. 1-7, 2014.

SINGH, S.; KATE, B. N.; BANERJEE, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n.3, p.73-95, 2005.

VIMALARASAN, A.; PRATHEEBA, N.; ASHOKKUMAR, B.; SIVAKUMAR, N.; VARALAKSHMI, P. Production of biodiesel from cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) by alkali and enzyme mediated transesterification. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.70, p. 959-967, 2011.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Cianobactérias

Cianobactérias são micro-organismos procariontes fotossintetizantes, com parede celular constituída de mureína, característica das bactérias, e são recobertas por uma membrana lipopolissacarídica, comum de bactérias gram-negativas, portanto com grande similaridade morfológica e fisiológica com bactérias gram-negativas. De acordo com o sistema de classificação de Komárek e Anagnostidis as cianobactérias pertencem ao domínio Bacteria e à divisão Cyanobacteria. Atualmente já foram descritas mais de 150 gêneros e 2000 espécies (REVIERS, 2010) de cianobactérias. Morfológicamente as cianobactérias podem apresentar-se desde formas unicelulares (Ex. *Synechococcus*, *Synechocystis*), coloniais (Ex. *Microcystis*), filamentosas simples sem ramificações (Ex. *Lyngbya*), filamentosas falsamente ramificadas (Ex. *Tolypothrix*) e filamentosas com ramificações (Ex. *Stigonema*) (WITTON e POTTS, 2002; FRANCESCHINI et al., 2010).

Ao longo de sua história evolutiva as cianobactérias têm se adaptado, em decorrência das suas características fisiológicas e morfológicas, a diversos tipos de habitats e nichos ecológicos, incluindo os mais extremos. Elas podem ser observadas em águas doces, salobras ou marinhas, ambientes terrestres, bem como desertos, águas termais e ambientes árticos (FRANCESCHINI et al., 2010). Esta grande adaptabilidade desses micro-organismos baseia-se em seus mecanismos para tolerar a incidência de raios ultravioletas, elevadas concentrações de metais pesados, baixas concentrações de oxigênio e diferentes amplitude de temperaturas (WHITTON e POTTS, 2000; MOLICA e AZEVEDO, 2009). Além disso, em determinadas condições ambientais algumas cianobactérias tem a capacidade de produzir heterocitos. Heterocitos são

células vegetativas diferenciadas onde ocorre a fixação de nitrogênio atmosférico. Estas células apresentam parede espessada, com conteúdo celular frequentemente verde-amarelo e possuem nódulos polares que permitem a comunicação seletiva com as células vizinhas (WHITTON e POTTS, 2000; SINGH et al., 2005; CALIJURI et al., 2006). Também produzem esporos de resistência denominados de acinetos. Acinetos são células vegetativas que aumentam de tamanho, estocam grande quantidade de substâncias de reservas e espessam sua parede. Esta diferenciação ocorre quando as condições ambientais não são favoráveis ao desenvolvimento da população e as células vegetativas tendem a morrer. Os acinetos permanecem vivos no ambiente e germinam quando as condições ambientais tornam favoráveis o seu desenvolvimento (AZEVEDO e SANT'ANNA, 2006). Ainda, algumas espécies podem ajustar sua posição na coluna d'água por meio de vacúolos gasosos. Estes são inclusões citoplasmáticas, estruturas fusiformes ocas e rígidas, que permitem a regulação da flutuabilidade, facilitando sua sobrevivência conforme as condições ambientais (CALIJURI et al., 2006). Desta maneira, todas essas habilidades lhe conferem vantagens competitivas sobre outros grupos fitoplanctônicos.

Cianobactérias, ao contrário de outros organismos fotossintéticos, tem dois tipos de sistemas para captação de luz que torna a captação de energia luminosa mais eficiente. Um desses sistemas é realizado por pigmentos fotossintéticos (moléculas de clorofila a e carotenóides) que estão situados na membrana do tilacóides e o outro sistema são as ficobiliproteínas que são cromoproteínas solúveis em água arranjadas em agregados denominados de ficobilissomos ligado à superfície exterior das membranas dos tilacóides. Os ficobilissomos são compostos por ficoeritrina (495-570nm), ficocianina (550-630nm) e aloficocianina (650-670nm) (Figura 1) (LEE, 2008). As reações de conversão de luz para produção de toda a matéria biológica são realizadas nos

fotossistemas I e II. A energia luminosa é capturada pelos pigmentos nos tilacóides e transferida para clorofilas dentro do núcleo reativo dos fotossistemas. O fotossistema II (PSII) é responsável pela quebra da molécula de água que resulta na produção de elétrons e prótons, enquanto o fotossistema I (PSI) eleva o nível da energia dos elétrons. A atividade combinada de PSII, PSI, e da cadeia de transporte de elétrons resulta na redução de NADP^+ e a transferência de prótons através da membrana dos tilacóides. A translocação dos prótons conduz a síntese de ATP e o ATP e NADPH resultante acionam o Ciclo de Calvin para a fixação de carbono (DUCAT, 2011).

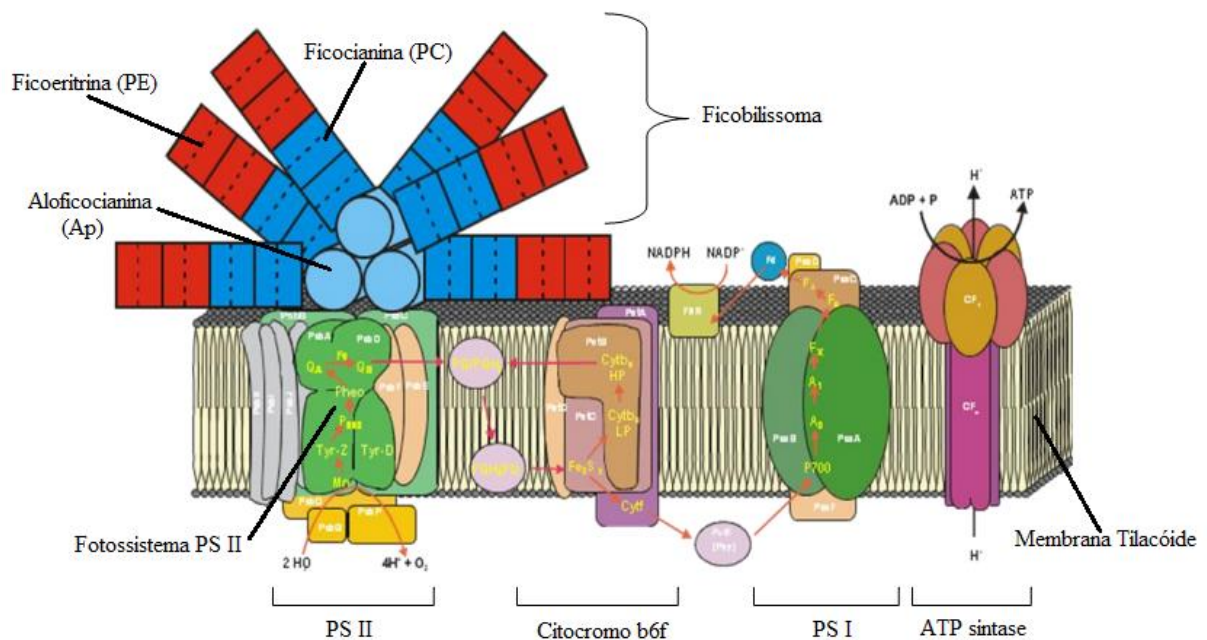


Figura 1: Principais complexos da membrana dos tilacóides em cianobactérias. (Adaptado de Sözer, 2011).

Dentre as cianobactérias, o gênero *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907, possui atualmente mais de 50 espécies descritas, muitas delas com ampla distribuição mundial (FRANCESCHINI et al., 2010). São coloniais, recobertas por mucilagem e células de formas muito variadas. Nas colônias, as células apresentam-se numerosas, dispendo-se de modo irregular, frouxa ou densamente na mucilagem, nunca

apresentando envoltórios gelatinosos individuais. Mucilagem fina ou espessa, incolor em geral homogênea ou indistintamente lamelada, difluente ou firme, às vezes de contorno refringente. Apresentam aerótopos, mas nunca células acessórias como acinetos e heterocitos (KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS, 1998).

O gênero *Microcystis* possui grande importância ecológica e de saúde pública, uma vez que espécies desse gênero são comumente responsáveis por extensas florações em diferentes tipos de ambientes aquáticos. O enriquecimento das águas com nutrientes provenientes de esgotos urbanos, atividades agropecuárias e industriais, com grandes quantidades de nitrogênio e fósforo, é considerado a principal causa da ocorrência de florações de cianobactérias (MOLICA e AZEVEDO, 2009).

Os principais problemas ambientais ocasionados por essas florações são mortalidade de peixes, aves e mamíferos que tem como principal consequência a perda da biodiversidade nesses ecossistemas aquáticos. Ainda, as florações de cianobactérias podem causar gosto e odor desagradáveis nas águas afetando os serviços de abastecimento de água. O gosto e odor desagradáveis são devido aos metabólitos geosmina e o 2-methylisoborneol (2-MIB) (AZEVEDO e SANT'ANNA, 2006). Além desses problemas, a maioria das cianobactérias é capaz de produzir toxinas que podem ser acumuladas na cadeia alimentar e produzir diversos tipos de intoxicações, que podem afetar outros organismos além da comunidade aquática (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2001).

Apesar de causar grandes transtornos ambientais pode-se destacar que as cianobactérias atuam como importantes produtoras primárias, desempenhando papel importante nos ciclos biogeoquímicos de nitrogênio, carbono e oxigênio, sendo

responsáveis por cerca de 30% da produção anual de oxigênio da Terra (WHITTON e POTTS 2000; SHARMA et al. 2011).

Além da importância ecológica e social, nos últimos anos as cianobactérias vêm chamando à atenção do setor biotecnológico devido a sua capacidade de produção de metabólitos, estruturalmente novos e biologicamente ativos (SINGH et al., 2005; ANGERMAYER et al., 2009; QUINTANA et al., 2011; NOZZI et al., 2013; HAYS e DUCAT, 2014). Estes metabólitos secundários ativos isolados a partir de cianobactérias tem grande potencial de utilização terapêutica, tais como atividades antivirais, antibacteriana, antifúngica, antitumorais e anti-inflamatórias (ABED et al., 2009; SHAMA et al., 2011). Na Tabela 2 são apresentadas as principais atividades biológicas dos metabólitos ativos encontrado em diferentes gêneros de cianobactérias.

Tabela 2: Principais atividades biológicas dos metabólitos ativos em diversos gêneros de cianobactérias. (Adaptado de BURJA et al., 2001; SINGH et al., 2005; SHARMA et al., 2011)

Gêneros	Compostos	Principais Atividades
<i>Aphanothece, Microcystis e Synechocystis</i>	36	Inibidor de enzima, citotóxicos, promotor de tumor, antibiótico, anticâncer, hepatotóxico.
<i>Lyngbya, Oscillatoria, Phormidium, Schizothrix e Spirulina</i>	197	Antialgal, anticâncer, anti-HIV, antifúngica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimitótico, antiproliferativa, antiviral, herbicida, imunossupressor, neurotóxica e protetor solar
<i>Anabaena, Aphanizomenon, Calothrix, Cylindrospermum, Nodularia, Nostoc, Rivularia, Scytonema, Tolypothrix</i>	126	Anticâncer, antifúngicos, antimaláricos, anti-HIV, hepatotóxico, antimicrobiana, antimitótico, anti-inflamatória, antiviral, citotóxica, inibidor de enzima, neurotóxica.
<i>Fischerella, Hapalosiphon, Prochlorothrix, Stigonema e Westiellopsis</i>	16	Antifúngicos, antibióticos, Anticâncer, antimitótico, citotóxica, herbicida.

Historicamente, a aplicação mais comum do uso de cianobactérias tem sido na alimentação humana, envolvendo várias espécies e explorado por empresas em todo mundo. A mais importante delas é a *Spirulina*. Espécies desse gênero contem alta

concentração de proteínas, é fonte de minerais, vitaminas e alguns ácidos graxos essenciais (LOURENÇO, 2006). No entanto, apesar de seu elevado potencial nutritivo, as cianobactérias ainda não ganharam importância significativa como substituto de alimentos ou como próprio alimento devido aos seguintes obstáculos: a consistência do pó da biomassa seca, coloração verde escuro e odor de peixe e a produção de compostos tóxicos com potencial para causar efeitos deletérios em seres humanos e animais. Todos esses fatores podem limitar a incorporação desta fonte de biomassa em produtos alimentares convencionais (De CASTRO OLIVEIRA et al., 2013).

Com a crise energética atual, as cianobactérias passaram a ser investigadas quanto a possibilidade de constituir biomassa para produção direta de biocombustíveis como estratégia sustentável do ponto de vista energético, econômico e ambiental. (ANGERMAYR et al., 2009; MACHADO e ATSUMI, 2012; WIJFFELS et al., 2013; SARSEKEYEVA et al., 2015). As propriedades das cianobactérias as tornam matérias-primas promissoras para produção de bioenergia. Podem-se destacar os níveis elevados de fotossíntese e a alta taxa de crescimento que são vantajosos quando comparados com outras algas e plantas superiores. Essa característica faz com que seu cultivo demande menor espaço, reduzindo o comprometimento de terras aráveis, desvantagem dos biocombustíveis provenientes de biomassa vegetal. As cianobactérias apresentam poucas necessidades nutricionais, tornando o cultivo mais simples e barato. Além disso, esses micro-organismos apresentam naturalmente grande capacidade de armazenamento de lipídios, presentes principalmente nos tilacóides e a plasticidade do seu metabolismo pode ser manipulada geneticamente para seleção de vias metabólicas destinadas a produção de biocombustíveis.

A eficiência fotossintetizante das cianobactérias permite a síntese de seus componentes de armazenamento de energia como carboidratos, proteínas e lipídios, que

se tornam matéria-prima que pode ser convertida em bioenergia (QUINTANA et al., 2011). Elas têm sido investigadas para produção de diferentes biocombustíveis incluindo o biohidrogênio, bioetanol, biometano e biodiesel (PARMAR et al., 2011; MACHADO e ATSUMI, 2012; SARSEKEYEVA et al., 2015).

Esses produtos são derivados das vias metabólicas das cianobactérias. Assim o biohidrogênio é produzido como subproduto durante a fixação de nitrogênio pelas nitrogenases ou diretamente pela atividade reversível de enzimas hidrogenases. Por serem capazes de sintetizar glicose e sacarose, esses açúcares simples podem ser transformados em etanol por fermentação anaeróbica, fazendo com que as cianobactérias sejam também fonte para a produção do bioetanol. A biomassa pode ser usada para produzir o gás metano por meio de digestão anaeróbica e fermentação e o biodiesel pode ser obtido pela extração dos lipídios que são hidrolizados e após transesterificação dão origem aos ésteres de ácidos graxos que constituem o biodiesel.

2. Condições de cultivo de Cianobactéria

2.1 Fatores físicos

As cianobactérias podem sofrer grande variabilidade no seu metabolismo dependendo das condições de cultivo, o que vai se refletir na composição química dos produtos obtidos a partir de sua biomassa. A intensidade luminosa, temperatura e nutrientes (MIAO e WU, 2004; CHISTI, 2007; KHAN, 2009) são fundamentais na constituição desses organismos. A luz é essencial para o crescimento, pois atua como a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa (MARKOU e GEORGKAKIS, 2011). Já a temperatura pode afetar o crescimento celular e as vias bioquímicas das microalgas e cianobactérias (CHRISTI, 2007; MATA et al., 2010).

2.2 Nutrição

Como qualquer organismo, para um crescimento ótimo as cianobactérias têm necessidade de nutrientes em quantidades distintas que podem afetar suas propriedades morfológicas e bioquímicas. A quantidade exigida para os processos metabólicos podem ser classificados em macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg e Fe) e micronutrientes (Mn, Cu, Zn, Mo, B, Co, Ca, Na, Se e Ni) (ABALDE et al., 1995, LOURENÇO, 2006). Na Tabela 3 são descritas as funções dos principais nutrientes requisitados por esses microorganismos.

Tabela 3: Elementos necessários para o crescimento de cianobactérias e suas funções metabólicas. (Adaptado de LOURENÇO, 2006).

Elemento	Funções
Carbono	Componente de diversas substâncias celulares
Nitrogênio	Constitui proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes.
Fósforo	Componente estrutural e transferência de energia
Enxofre	Grupos ativos de enzimas e coenzimas e componente estrutural
Potássio	Regulação osmótica, controle do pH e estabilidade de proteínas
Magnésio	Constituinte da molécula de clorofila e ativação enzimática
Ferro	Participação das vias Biosintética da clorofila e do citocromo, respiração, fotossíntese e co-fator de diversas enzimas.
Manganês	Co-fator de enzimas
Molibdênio	Atua no metabolismo do nitrogênio e como co-fator de enzimas
Cobalto	Componente da vitamina B12 e atua no metabolismo do nitrogênio
Boro	Composição de algumas enzimas do metabolismo primário
Zinco	Componente estrutural de diversas enzimas
Sódio	Ativação enzimática e balanço de água
Cálcio	Componente estrutural, ativação enzimática e co-fator no transporte de íons .
Cobre	Transporte de elétrons na fotossíntese , enzimas, necessário na síntese de clorofila
Cloro	Atua no fotossistema II e metabólitos secundários

A condição nutricional determina a taxa de crescimento da população de cianobactérias, a taxa de acumulação de lipídios e a produtividade lipídica, além da produção dos demais componentes.

Os três componentes básicos da matéria orgânica: proteínas, carboidratos e lipídios, podem variar sua quantidade em condições de estresse. Nessa condição as cianobactérias cessam sua divisão celular e seu metabolismo é direcionado para o armazenamento de energia na forma de produção de lipídios (XIN et al., 2010). A limitação de nutrientes é uma pressão ambiental eficiente para aumentar o acúmulo de lipídios por meio de três mudanças: a diminuição do teor celular da membrana dos tilacóides; a ativação da acil-hidrolase e a estimulação da hidrólise de fosfolipídios.

2.2.1 Carbono

O carbono é um dos principais nutrientes para o cultivo de microalgas e cianobactérias, uma vez que constitui cerca de 50% da biomassa (LOURENÇO 2006). Ele pode ser absorvido a partir de formas inorgânicas e orgânicas. A conversão do carbono inorgânico em compostos orgânicos é conseguida por meio da fotossíntese (REYNOLDS et al., 2006). A fotossíntese possibilita a conversão da luz em energia química, conduzindo à produção de matérias-primas requeridas para a síntese de diversos bioprodutos (CHRISTI, 2007).

2.2.2 Nitrogênio

Além do carbono, o nitrogênio é um dos principais elementos utilizados no desenvolvimento de cianobactérias e microalgas, podendo ser assimilado por meio de diferentes fontes, como nitrogênio gasoso, amônia, nitrato e nitrito (MARKOU e GEORGKAKIS, 2011). A composição química da biomassa de cianobactérias é afetada pela quantidade de nitrogênio no meio de cultura, sendo o conteúdo de proteína bruta e clorofilas relacionadas com o aumento das concentrações desse nutriente. A redução na disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura possibilita que lipídios e carboidratos sejam sintetizados preferencialmente (RIGANO et al., 1998; LOURENÇO, 2006; MARKOU e GEORGKAKIS, 2011).

2.2.3 Fósforo

O fósforo é essencial ao crescimento celular e faz parte de vários processos como transferência de energia, biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolipídios, DNA, entre outras funções (RICHMOND, 2004). As respostas da privação de fósforo em cianobactérias e microalgas são semelhantes aos observados em cultivos com deficiência de nitrogênio, havendo aumento no teor de lipídios na composição da biomassa (RICHMOND, 2004; QUINTANA et al. 2011).

2.2 Tipos de metabolismos

Outro fator que também pode favorecer a produção de biomassa e a taxa de crescimento das cianobactérias é o tipo de cultivo empregado, dependendo da fonte de carbono utilizada e do acesso a energia luminosa. Os cultivos podem ser classificados em cultivos fotoautotróficos, onde as cianobactérias podem crescer utilizando luz e dióxido de carbono, cultivos heterotróficos, com emprego exclusivo de compostos orgânicos, sem a utilização de luz e cultivo mixotrófico, com utilização simultânea de uma fonte luminosa e um substrato orgânico como fonte de energia, seja o CO₂ ou outro substrato orgânico como fontes de carbono (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004; MATA et al., 2010).

2.3 Sistemas de Cultivo

Os cultivos de cianobactérias podem ser realizados por sistemas de cultivo abertos e sistemas de cultivos fechados (Fotobioreator) (MATA et al., 2010)

2.3.1 Cultivos abertos

Os sistemas de lagoas ou tanques abertos (Raceways) (Figura 2) são considerados os mais adequados para produção em grande escala de micro-organismos devido ao seu

baixo custo de construção e operação, durabilidade e maior produção de biomassa quando comparada aos sistemas fechados (CHRISTI, 2007; MATA et al., 2010). Os sistemas mais empregados utilizam canais de circulação (20- 50 cm de profundidade), com agitação por meio de pás mecânicas e com entrada de meio de cultivo para estabilizar o crescimento e a produtividades desses microorganismos (DA RÓS, 2012). Apesar das vantagens desse sistema, lagoas abertas são geralmente mais susceptíveis as condições meteorológicas, dificultando o controle da temperatura da água, evaporação e iluminação. Além disso, essas lagoas estão sujeitas a maior contaminação por outros micro-organismos, como fungos ou bactérias (MATA et al., 2010).



Figura 2: Lagoa aberta (Raceway Pond) (Fonte: [AlgaePARC-
http://www.algaeparc.com/our-research](http://www.algaeparc.com/our-research)).

2.3.2 Cultivos fechados

Os fotobioreatores (Figura 3) são comumente utilizados nos cultivos de microalgas e cianobactérias devido ao maior controle das condições de cultivo e parâmetros de crescimento, reduzindo assim as desvantagens obtidas pelos sistemas abertos (WIJFFELS e BARBOSA, 2010). No entanto, os fotobioreatores possuem diversas limitações como, superaquecimento, acumulação de oxigênio, menos espaço de crescimento, danos celulares por cisalhamento e deterioração do material utilizado.

Além disso, existe um alto custo envolvido na sua construção e operação (MATA et al., 2010).



Figura 3: Fotobioreator (Fonte:AlgaePARC- <http://www.algaeparc.com/our-research>)

Dentre os sistemas fechados, em pequena escala, pode-se também destacar o uso de frascos de vidro (por exemplo, frasco de Erlenmayer) (Figura 4). Estes frascos são comumente utilizados em diversos tipos de experimentos com múltiplas finalidades. Com o uso desse tipo de frasco é possível controlar diversos parâmetros e simular condições ambientais.



Figura 4: Frascos tipo Erlenmayer usados durante os experimentos nesta Tese.

3. Processo de obtenção de biomassa para produção de biodiesel

O processo de obtenção de biomassa é o mesmo tanto para microalgas quanto para cianobactérias. A figura 5 mostra uma representação esquemática das etapas de obtenção de biodiesel por cianobactérias. As etapas preliminares de escolha da(s)

espécie(s) e o cultivo já foram mencionados. Desta maneira, seguem-se a colheita da biomassa, ruptura celular, a extração do óleo e a produção do biodiesel.

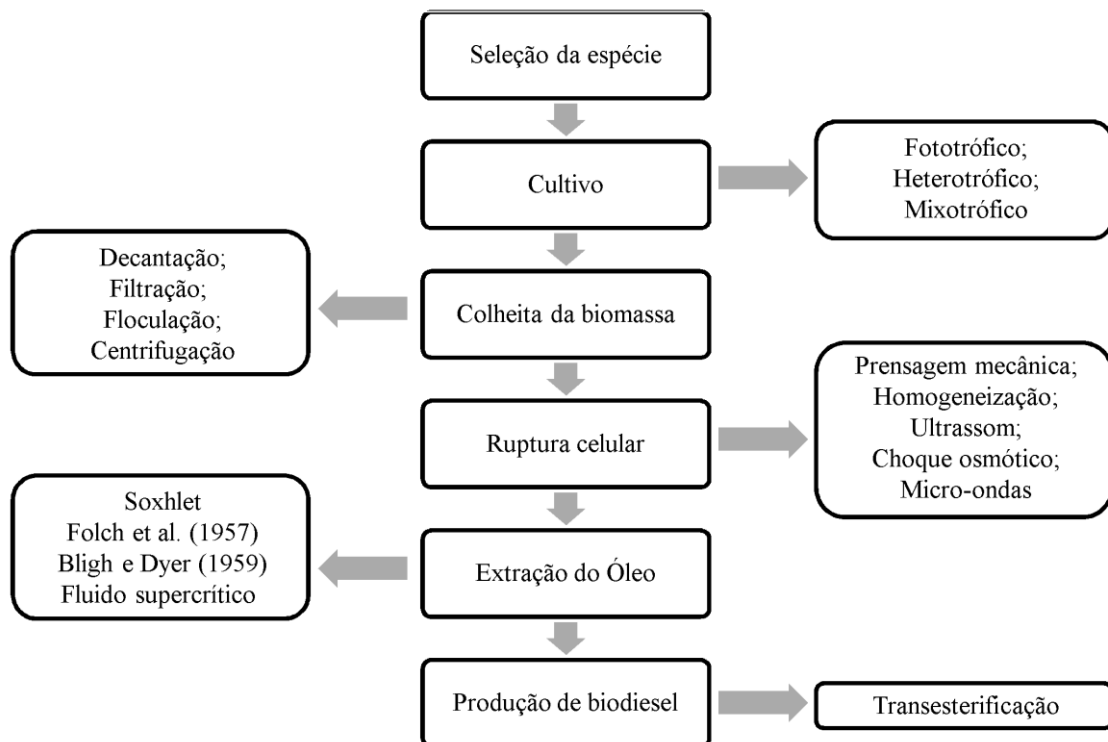


Figura 5: Etapas para obtenção de biodiesel por cianobactérias. Adaptada de MATA et al. (2010).

3.1 Colheita da biomassa

Não existe um método padronizado para coletar e separar as cianobactérias do meio líquido. No entanto, os métodos mais utilizados são filtração, centrifugação e alguns casos sedimentação. A sedimentação é um método que separa a biomassa do líquido pela densidade. É um método mais simples, porém sua eficiência depende do tamanho e da densidade das espécies. Tem baixo custo, mas é demasiadamente demorado. A filtração por pressão ou vácuo é uma técnica eficiente, mas depende do uso de filtros especiais. Além disso, é limitada pelo tamanho das células, sendo mais indicado para cianobactérias filamentosas. A centrifugação é uma técnica bastante utilizada para recuperação da biomassa da maioria dos micro-organismos. É uma técnica muito rápida,

mas que requer bastante energia (MATA et al., 2010; CHEN et al., 2011; FRANCO et al., 2013).

Todos os métodos descritos podem ser acompanhados por processos de floculação ou flotação. Muitas vezes esta etapa é conhecida como um pré-tratamento. A floculação é um processo no qual as partículas menores são agregadas para formar partículas maiores facilitando a recuperação. Apesar dessa vantagem, a floculação exige a utilização de agentes floculantes (por exemplo, sulfato de ferro) que podem tornar o processo caro, além da possível contaminação do tratamento. A flotação é uma técnica de separação gravitacional auxiliada pela adição de microbolhas de gás (geralmente ar). As microbolhas de gás em contato com a partícula, ou floco, forma um aglomerado de densidade aparente menor que a da água, fazendo com que esse aglomerado partícula-bolha flutue até a superfície e seja removida por meio de raspadores de superfície (FUNASA, 2003). Diferente da floculação não é necessário adicionar qualquer substância química. É considerada eficiente, mas há pouca evidência da sua viabilidade técnica e econômica (BRENNAN e OWENDE, 2010; CHEN et al., 2011; FRANCO et al., 2013).

3.2 Ruptura celular

Após a recuperação da biomassa é necessário aplicar uma força de cisalhamento nas células no intuito de romper a estrutura celular para liberar os lipídios intracelulares e da membrana (FRANCO et al., 2013). Alguns desses processos são a prensagem mecânica, homogeneização, choque-osmótico, ultrassom e micro-ondas (MERCER e ARMENTA, 2011; HALIM et al., 2012; FRANCO et al., 2013; LI et al., 2014).

A prensagem mecânica e homogeneização consistem na ruptura das paredes celulares por força mecânicas (pressão) a fim de recuperar o óleo intracelular sem alterar a integridade química das substâncias de interesse (MERCER e ARMENTA,

2011). É o método de escolha para fontes de maior tamanho como as oleaginosas, mas pouco efetivo para micro-organismos.

No choque osmótico há uma redução repentina na pressão osmótica, que pode causar a ruptura das paredes celulares em solução (MERCER e ARMENTA, 2011). Apesar de ser um método barato e economicamente viável, nem todas as paredes celulares são rompidas eficientemente por choque osmótico (PEREIRA et al., 2012).

Na extração por ultrassom ondas mecânicas de alta frequência são aplicadas como método de ruptura das células fornecendo um maior contato do conteúdo intracelular com o solvente extrator (FRANCO et al., 2013). Trata-se de um processo de melhor rompimento celular, no entanto há alto consumo de energia principalmente em uma escala maior, necessidade de equipamento e pessoal especializado para sua aplicação.

3.3 Extração de lipídios

A ruptura celular leva a liberação do conteúdo celular total com a presença de componentes diversos, como proteína, carboidratos e lipídios, entre outros. Dessa mistura complexa é necessário extrair a fração lipídica. Procedimentos consagrados para extração de óleo de biomassa vegetal terrestre têm sido adaptados às microalgas e cianobactérias. Geralmente são utilizadas as técnicas de ruptura celular acopladas com as extrações com solventes orgânicos (MERCER e ARMENTA, 2011; LI et al., 2014). No entanto, são necessárias adaptações considerando as particularidades da biomassa como a resistência do arcabouço celular, o tamanho e a agregação das células. Entre os principais métodos a extração por solventes orgânicos, à frio ou à quente, é um dos mais comuns. Basicamente, o processo de extração consiste na separação das fases lipídica e aquosa por meio de solventes orgânicos. Solventes de baixa polaridade como o hexano, éter de petróleo são os mais utilizados. Outros solventes como clorofórmio, metanol, diclorometano ou misturas desses solventes também são comumente utilizados.

Tradicionalmente, os principais métodos utilizados para extrair óleos de cianobactérias são os descritos por Folch et al. (1957), Bligh e Dyer (1959) e o método de extração à quente usando Soxhlet. O método proposto por Folch et al. (1957) consiste no uso binário dos solventes clorofórmio/metanol (2:1 v/v) com posterior adição de cloreto de potássio para separação das fases. O método proposto por Bligh e Dyer (1959) também utiliza uma mistura de solventes, no entanto, é adicionado água para que haja as separações das fases. Uma desvantagem desses métodos é que, em escala maior, quantidades significativas de solventes residuais são geradas e por se tratar de uma mistura, sua reciclagem é dispendiosa. Outra desvantagem é a indesejável extração de contaminantes hidrofílicos (BRUN et al., 2009). Além disso, há uma grande preocupação na utilização desses solventes devido a sua elevada toxicidade (MERCER e ARMENTA, 2011). Em razão disso, há um estímulo à busca de solventes menos tóxicos e mais seletivos para o processo de extração (LI et al., 2014).

O método de percolação por Soxhlet consiste em submeter a biomassa a ciclos contínuos de solvente orgânico de baixa polaridade aquecido para extração da sua fração lipídica. Este ciclo repete-se até que não haja mais lipídios brutos para serem extraídos no extrator de Soxhlet. O método possui muitas vantagens, dentre elas o fato da amostra estar sempre em contato com o solvente, havendo constante renovação. O solvente pode ser recuperado e utilizado em outras extrações. Além disso, trata-se de uma metodologia muito simples que não requer treinamento especializado e que possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação aos outros métodos, sem a necessidade de filtração da biomassa após o término da extração, uma vez que a amostra fica envolta em cartucho durante todo o procedimento (BRUM et al., 2009). Porém, apresenta a desvantagem do gasto energético para a evaporação/condensação do

solvente e, dependendo do ponto de ebulição do solvente pode ocorrer a oxidação de alguns lípidos extraídos.

A extração com fluido supercrítico envolve a utilização de substâncias que foram elevadas acima de seus pontos críticos de temperatura e pressão. As propriedades físicas de um fluido supercrítico são intermediárias entre um gás e um líquido em condições normais. Esta propriedade lhe permite agir como um solvente de extração sem deixar resíduos quando o sistema retornar as condições de temperatura e pressão ambientes (HERRERO et al., 2006). As principais vantagens desse método são a utilização de uma tecnologia limpa, sem deixar resíduos e a utilização de solventes não tóxicos. Além disso, não altera as propriedades das matérias-primas e a extração de produtos de alta qualidade. Principal desvantagem desse método é que o processo torna-se caro devido ao elevado custo dos equipamentos (MAUL, 1999).

Na extração enzimática as enzimas podem ser utilizadas para facilitar a hidrólise da parede celular para liberar os lipídios num solvente adequado (ZHENG et al., 2011). No entanto, o custo deste processo de extração não o torna viável em grande escala (PARMAR et al., 2011).

Outro método de extração de óleo está sendo proposto a partir da biomassa molhada com algum método de ruptura (choque osmótico ou fluido supercrítico). A principal vantagem desse método é a redução dos custos associados a secagem da biomassa. No entanto, o teor de água da biomassa afeta significativamente a eficiência da extração dos lipídios (MUBARAK et al. 2015).

Na Tabela 4 são mostrados os principais métodos de extração lipídica (com técnica de ruptura) em diferentes espécies de cianobactérias e microalgas e seus respectivos rendimentos lipídicos.

Tabela 4: Comparação dos teores de lipídios (%) produzido por diferentes espécies de cianobactérias utilizando diversos métodos de extração

Espécies	Técnica de ruptura	Método	Teor de Lipídios	Referências
<i>Oscillatoria calcuttensis</i>			25,7	
<i>Oscillatoria acuminata</i>			24,7	
<i>Nostoc linckia</i>			18,5	
<i>Calothrix fusca</i>			23,0	
<i>Lyngbya limnetica</i>			18,0	
<i>Phormidium purpurescens</i>	-----		26,5	
<i>Microcystis aeruginosa</i>		Soxhlet	28,0	Sharathchandra et al. 2011
<i>Lyngbya dendrobia</i>			11,0	
<i>Oscillatoria perornata</i>			14,0	
<i>Phormidium ambiguum</i>			10,5	
<i>Oscillatoria amoena</i>			18,7	
<i>Scytonema bohnerei</i>			22,0	
<i>Oscillatoria chlorina</i>			16,7	
<i>Synechococcus sp</i>	-----	Bligh e Dyer	13,0	Silva et al. 2014
<i>Microcystis aeruginosa</i>			28,0	
<i>Synechococcus sp</i>	-----	Bligh e Dyer	26,9	Da Rós et al. 2013
<i>Trichormus sp</i>			23,7	
<i>Nostoc sp</i>	-----	Bligh e Dyer	15,0	Prabakaran e Ravindran 2011
<i>Tolypothrix sp</i>			12,0	
<i>Synechococcus sp</i>	Ultrassom	Folch et al	29,0	Silva et al. 2014
<i>Nostoc sp</i>	Ultrassom		16,0	
<i>Tolypothrix sp</i>	Ultrassom		16,0	
<i>Nostoc sp</i>	Choque osmótico	Bligh e Dyer	12,0	Prabakaran e Ravindran 2011
<i>Tolypothrix sp</i>	Choque osmótico		13,0	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Choque osmótico	Bligh e Dyer	8,0	
<i>Botryococcus sp</i>	Choque osmotico		11,0	Lee et al. 2010
<i>Scenedesmus sp</i>	Choque osmótico		7,0	
<i>Microcystis aeruginosa</i>	-----	Folch et al.	28,0	Da Rós et al. 2012
<i>Synechococcus sp</i>	Ultrassom	Folch et al.	29,0	Silva et al. 2014
<i>Synechococcus sp</i>	Micro-ondas	Folch et al.	15,0	Silva et al. 2014
<i>Tetraselmis sp</i>	-----	Fluido supercrítico	11,0	Li et al. 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	-----	Enzimática	24,0	Zheng et al. 2011

O teor de lipídios encontrado nas microalgas pode variar de acordo com a natureza de cada espécie. Assim, o conteúdo de óleo em microalgas pode alcançar 75% do peso de biomassa seca, como em *Botryococcus braunii*. Todavia, a maioria das algas comuns (exemplos, *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) tem níveis de óleo entre 20 a 50% e podem obter produtividades mais altas (CHISTI, 2007; DENG, 2009; MATA et al., 2010) (Tabela 5).

Tabela 5: Conteúdo de lipídios de espécies de microalgas (adaptado de CHISTI, 2007; DENG, 2009; MATA et al., 2010).

Espécies de Microalgas	Conteúdo de lipídios (% peso seco)	Espécies de Microalgas	Conteúdo de lipídios (% peso seco)
<i>Ankistrodesmis</i> sp.	24-31	<i>Monosus subterraneus</i>	16
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Monallanthus salina</i>	20-22
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33	<i>Nannochloris</i> sp.	20-56
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21	<i>Nannochloropsis</i> sp.	12-53
<i>Chlorella emersonii</i>	25-63	<i>N. oculata</i>	22-29
<i>C. minutissima</i>	57	<i>Ankistrodesmis</i> sp.	29-65
<i>C. protothecoides</i>	14-57	<i>Botryococcus braunii</i>	69
<i>C. sorokiniana</i>	19-22	<i>Chaetoceros muelleri</i>	30
<i>Chlorella</i> sp.	10-48	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	62
<i>C. vulgaris</i>	5-58	<i>Chlorella emersonii</i>	22-39
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20-51	<i>C. minutissima</i>	35
<i>Dunaliella salina</i>	6-25	<i>C. protothecoides</i>	18-57
<i>D. primolecta</i>	23	<i>C. sorokiniana</i>	11-55
<i>D. tertiolecta</i>	16-71	<i>Chlorella</i> sp.	13-51
<i>Dunaliella</i> sp.	17-67	<i>C. vulgaris</i>	16-40
<i>Euglena gracilis</i>	14-20	<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Ellipsoidion</i> sp.	27	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25	<i>Isochrysis galbana</i>	7-40
<i>Isochrysis</i> sp.	7-33	<i>Zitzschia</i> sp.	45-47

Apesar da grande importância das microalgas para produção de lipídios, as cianobactérias vêm ganhando destaque como matéria prima na produção de óleos. De acordo com a literatura o rendimento lipídico de cianobactérias pode variar na faixa entre 10,5 a 36% variando a espécie e o método de extração (Tabela 6).

Tabela 6: Conteúdo de lipídios em cianobactérias (SHARATHCHANDRA e RAJASHEKHAR 2011; KAIWAN-ARPORN et al. 2012; DA RÓS et al. 2013; SILVA et al. 2014).

Espécies	Conteúdo de Lipídios (% de peso seco)
<i>Oscillatoria calcuttensis</i>	25,7
<i>Oscillatoria acuminata</i>	24,7
<i>Nostoc linckia</i>	18,5
<i>Calothrix fusca</i>	23,0
<i>Lyngbya limnetica</i>	18,0
<i>Phormidium purpurescens</i>	26,5
<i>Microcystis aeruginosa</i>	28,0
<i>Lyngbya dendrobia</i>	11,0
<i>Oscillatoria perornata</i>	14,0
<i>Phormidium ambiguum</i>	10,5
<i>Oscillatoria amoena</i>	18,7
<i>Scytonema bohnerii</i>	22,0
<i>Oscillatoria chlorina</i>	16,7
<i>Synechococcus sp</i>	13,0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	28,0
<i>Synechococcus sp</i>	26,9
<i>Trichormus sp</i>	23,7
<i>Nostoc sp</i>	15,0
<i>Tolypothrix sp</i>	12,0
<i>Synechococcus sp</i>	36,0
<i>Nostoc sp</i>	16,0
<i>Tolypothrix sp</i>	16,0
<i>Nostoc sp</i>	12,0
<i>Tolypothrix sp</i>	13,0
<i>Synechococcus sp</i>	29,0
<i>Synechococcus sp</i>	15,0

3.4 Produção de biodiesel

A matriz energética atual é dependente dos combustíveis fósseis. Trata-se de uma mistura complexa de hidrocarbonetos saturados e insaturados, lineares e cíclicos que foram gerados pela decomposição da biomassa vegetal ao longo das eras geológicas. De acordo com Agencia de Energia Internacional (AEI), em 2005, a principal demanda de

combustíveis era representada pelo petróleo (36%), carvão (27,5 %), gás natural (23%), nuclear (8,5 %), hidrelétricas (6,3 %) e outras fontes não fósseis (0,9%). No entanto, em 2015 foi registrada uma diminuição no consumo em todas essas fontes tradicionais com o aumento do uso de fontes não fósseis que incluem a biomassa vegetal (0,9 % para 25 %). O aumento do uso dessas fontes é devido ao esgotamento das reservas tradicionais que vem estimulando a procura por outras substâncias que compartilhem as propriedades desses, principalmente para uso em veículos automotivos.

Como fonte de energia renovável a biomassa pode ser convertida em biocombustíveis que são representados pelo biogás e pelos biocombustíveis líquidos. Dentre os biocombustíveis líquidos estão os bio-álcoois (etanol, butanol e metanol) e o biodiesel (SARSEKEYEVA et al., 2015).

O biodiesel pode ser definido como sendo uma mistura de mono-álquil ésteres de cadeia longa de ácidos graxos provenientes de fontes biológicas renováveis vegetais, animais ou microbianas. O biodiesel pode ser gerado por transesterificação. A transesterificação tem sido o método mais utilizado para produzir o biodiesel, porque melhora as propriedades físicas do biocombustível para o motor diesel, além de ter baixo custo e simplicidade (ATABANI et al. 2012). Na figura 6 é mostrada uma resumo da classificação do processo de transesterificação segundo ATABANI et al. (2012).

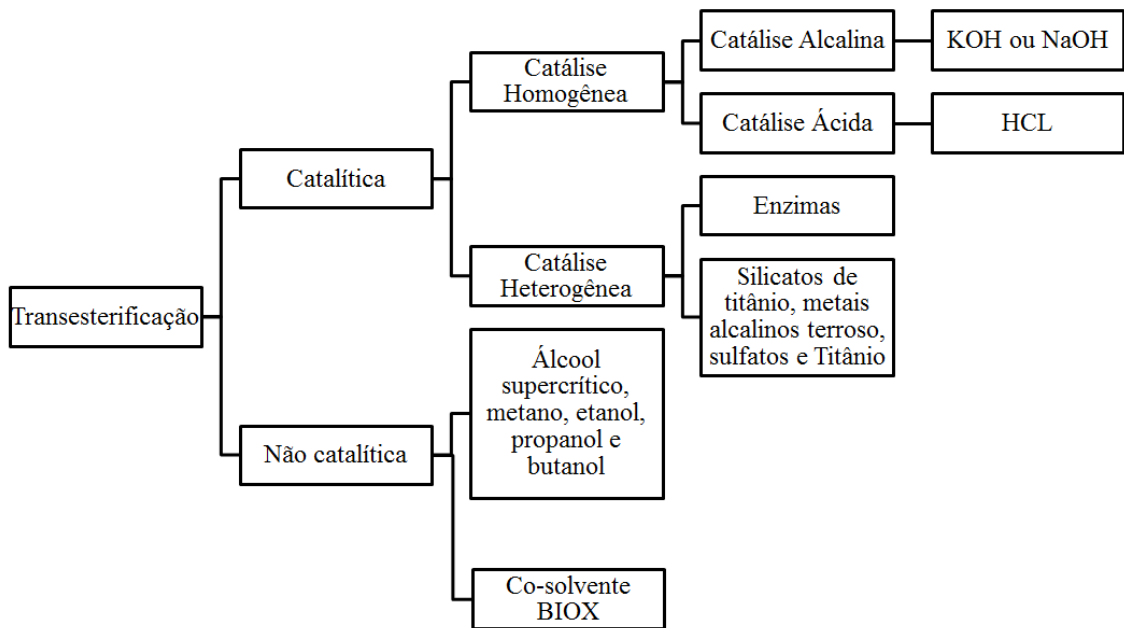


Figura 6: Resumo da classificação dos processos de transesterificação.

A transesterificação catalítica consiste em uma reação química de um óleo vegetal com um álcool, que pode ser etanol ou metanol, na presença de um catalisador ácido (HCl- ácido clorídrico) ou básico (NaOH -hidróxido de sódio). Como resultado, obtém-se o éster metílico ou etílico (biodiesel), conforme o álcool utilizado, e o glicerol (MEIRELLES, 2003; HOYDONCX et al., 2004; MIAO e WU, 2006; HOSSAIN et al., 2008; VASUDEVAN e BRIGGS, 2008). Embora a hidrólise de ésteres seja quimicamente simples a reação ocorre em etapas e podem ser reversíveis. Os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, monoglicerídeos e finalmente os monoglicerídeos liberam o glicerol como subproduto. Em cada etapa da reação, ocorre a liberação de uma molécula do éster de interesse. Os ésteres gerados constituem o biodiesel e o glicerol o subproduto da reação (MATA et al., 2010).

Embora a catálise heterogênea venha sendo cada vez mais aplicada no processo de transesterificação devido ao processo ser menos poluente e mais seletivo, a catálise

homogênea (alcalina ou ácida) é amplamente utilizada devido à facilidade de manipulação dos catalisadores e pelas as altas taxas de conversão dos glicerídeos para ésteres. A desvantagem desse método é que requer muitas etapas de recuperação e purificação do produto final diferente da catálise heterogênea. No entanto, por sua vez a catálise heterogênea possui limitação de difusão, no caso das enzimas sensibilidade à desnaturação e até o momento elevado custo em escala industrial.

A transesterificação não catalítica está sendo explorada devido a alguns problemas encontrados na transesterificação catalítica tais como: elevado consumo de tempo, desfasamento de tempo de reação causada pela baixa solubilidade do álcool na fase e triglicerídeos, a necessidade de separação do catalisador e impurezas do biodiesel. Um exemplo de transesterificação não catalítica é método de metanol supercrítico que utiliza menor energia com menor tempo de reação (2-4 minutos) comparado a transesterificação catalítica. Além disso, por não utilizar nenhum catalisador a purificação do biodiesel e a recuperação do glicerol são mais fáceis. Entretanto, o método ainda tem alto consumo de metanol, bem como elevado custo da reação e operação (ATABANI et al. 2012).

O biodiesel comparado ao diesel proveniente do petróleo tem alguns méritos. Trata-se de um combustível biodegradável e de baixa toxicidade. Possui um perfil de emissão de combustão mais favorável devido às baixas emissões de monóxido de carbono (exceção dos óxidos de nitrogênio) (RAMOS et al., 2009). Possui um alto ponto de fulgor (150 °C) que o torna menos volátil conferindo-lhe manuseio e armazenamento mais seguros. Apresenta excelente lubricidade proveniente dos ácidos graxos que pode reduzi o uso da máquina e estender a vida útil do motor. O biodiesel tem propriedades físicas e conteúdo energético semelhante ao diesel que permite que funcione eficazmente em motores movidos a diesel sem que haja qualquer modificação física no motor (AL-

ZUHAIR, 2007; CAMPBELL, 2008). Atualmente, é utilizado na substituição do diesel ou no uso de misturas binárias diesel/biodiesel.

3.5 Qualidade do Biodiesel

A qualidade do biodiesel é determinada basicamente pela composição de ácidos graxos presentes nos óleos extraídos da biomassa (TALEBI et al., 2013). Os ácidos graxos são principalmente dependentes da origem do óleo e das condições de cultura que foram realizadas (RAMOS et al., 2009). A composição de ácidos graxos em cianobactérias é determinada pelo comprimento da cadeia de carbono e o número de ligações duplas que são utilizados para determinar a qualidade do biodiesel (DA ROS et al., 2013; LOS e MIRONOV, 2015). Os ácidos graxos comumente encontrados em cianobactérias possuem o comprimento da cadeia usualmente entre C14 a C18. O número de duplas ligações nessas cadeias pode variar de zero a quatro. Os ácidos graxos podem ser classificados em saturados (ausência de duplas ligações), monoinsaturados (presença de uma dupla ligação) e poli-insaturados (com 2 ou mais duplas ligações).

As propriedades do biodiesel são caracterizadas por propriedades físico-químicas. Algumas destas propriedades incluem: poder calorífico (MJ/Kg), número de cetanos, densidade (Kg/m³), viscosidade (mm²/s), lubricidade, ponto de fulgor, ponto de nevoa e fluidez (°C), valor de acidez (Mg de KOH / g de óleo), teor de cinzas (%), a corrosão de cobre, resíduo de carbono, teor de água e de sedimentos, intervalo de destilação, teor de enxofre, glicerina (% m/m), de fósforo (mg/ kg) e a estabilidade à oxidação (KNOTHE et al. 2005; ATABANI et al. 2012).

A investigação das propriedades do perfil de ácidos graxos é importante para selecionar espécies para produção de biodiesel e visando à qualidade do biodiesel essas propriedades devem ser testadas. No entanto, a realização destes testes é limitada pelos altos custos das análises e pela necessidade de um volume maior de amostra

dificultando pesquisas em nível laboratorial a partir de uma diversidade maior de fontes (RAMOS et al. 2009). Desta maneira, alguns pesquisadores estão estimando alguns dessas propriedades por meio de equações empíricas visando qualificar o biodiesel obtido de plantas e microalgas (RAMOS et al, 2009;. FRANCISCO et al, 2010; NASCIMENTO et al, 2013). A partir dessas equações é possível estimar o número de cetano, índice de iodo, o grau de insaturação, estabilidade a oxidação e o ponto de entupimento do filtro à frio.

O número de cetanos é amplamente utilizado como parâmetro da qualidade do combustível diesel relacionado com o tempo de retardo de ignição e da qualidade da combustão. Número de cetanos elevado está relacionado ao aumento das cadeias carbônicas de ácidos graxos e a maior saturação. Logo, o número de cetanos está linearmente correlacionado ao grau de insaturação. Quanto maior o grau de insaturação dos óleos devido a componentes altamente insaturados, tais como: ésteres de ácido linoleico (C18: 2) e linolênico (C18: 3) menores serão os número de cetanos no biodiesel gerado. Enquanto, número de cetanos elevado é encontrado em biodiesel rico em ácidos graxos saturados tais como ésteres de ácido palmítico (C16: 0) e esteárico (C18:0) (KNOTHE, 2007; RAMOS et al. 2009; NASCIMENTO et al. 2013). Segundo as especificações da norma americana ASTM D6751, da norma europeia EN14214 e da norma brasileira ANP n° 14 o número mínimo de cetanos no biodiesel é 47, 51 e 45, respectivamente. Um adequado número de cetano é necessário para o bom desempenho do motor. Números elevados de cetano ajudar a garantir boas propriedades de arranque a frio e minimizar a formação de fumaça branca. Enquanto baixo número de cetanos pode acarretar o aquecimento lento do motor e falhas na combustão.

O índice de iodo é uma medida da insaturação total dentro de uma mistura de ácidos graxos. É expressa em gramas de iodo que reagem com 100 g da amostra respectiva,

refletindo na adição de iodo para as duplas ligações (RAMOS et al, 2009;. FRANCISCO et al, 2010; NASCIMENTO et al, 2013). A limitação de ácidos graxos insaturados é necessária porque aquecimentos elevados dos ácidos graxos presentes no biodiesel resultam em polimerização dos glicerídeos. Isto pode levar à formação de depósitos ou a deterioração do lubrificante no motor (NASCIMENTO et al., 2014, RAMOS et al., 2009). O grau de insaturação está correlacionado linearmente com o índice de iodo. Logo, quanto maior a insaturação presente no óleo, maior será o valor de iodo conseqüentemente maior será a possibilidade à oxidação, a formação de depósitos e a deterioração da capacidade de lubrificação do biodiesel (RAMOS et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2013.).

A estabilidade à oxidação também é afetada pelo aumento do grau de insaturação contido no biodiesel principalmente pelo aumento de ácidos graxos poli-insaturados (RAMOS et al., 2009). A estabilidade à oxidação é uma propriedade importante principalmente durante armazenamento prolongado. Geralmente, fatores tais como a presença de ar, temperaturas elevadas ou a presença de metais facilitam a oxidação. As razões para auto-oxidação do biodiesel estão relacionadas à presença de ligações duplas nas cadeias de ácidos graxos. Estas reações de oxidação ocorrem em diferentes velocidades, dependendo do número e da posição das duplas ligações (KNOTHE et al. 2005). Desta maneira, biodiesel rico em ácidos graxos poli-insaturados possui baixa estabilidade à oxidação, enquanto biodiesel com baixas concentrações desses ácidos tornam-se mais estáveis ao longo do armazenamento (RAMOS et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2013).

O ponto de entupimento do filtro à frio (CFPP) é geralmente utilizado para prever o desempenho do fluxo do biodiesel a baixas temperaturas (FRANCISCO et al., 2010) que é determinado pelo fator do comprimento da cadeia saturada. Quando uma maior

quantidade de ácidos graxos saturados, tipicamente ácido esteárico e palmítico, estão presentes nos óleos pior será a qualidade do biodiesel a baixas temperaturas (DA RÓS et al., 2013). ANP padroniza um máximo de 19 °C para este parâmetro. Em temperaturas mais baixas os ésteres metílicos cristalizam, precipitam e formam aglomerados, acarretando o entupimento de filtros e linhas de combustível. Quanto maior o tamanho das cadeias de carbono ou o grau de saturação de moléculas que compõem o biodiesel maior será o valor de CFPP, e piores sua propriedade em baixa temperatura. Entretanto, para solucionar este problema alguns aditivos químicos podem ser utilizados para inibir a aglomeração de cristais (RAMOS et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2013). Os ésteres insaturados não estão incluídos neste parâmetro porque os pontos de fusão destes compostos são muito mais baixos em comparação com a dos saturados (RAMOS et al., 2009).

3.6 Ácidos graxos em Cianobactérias

As membranas de cianobactérias são representadas pela membrana citoplasmática e a membrana dos tilacóides. Ambas as membranas contêm quatro principais glicerolípidios: monogalactosyldiacilglicerol (MGDG), digalactosyldiacilglicerol (DGDG), sulfoquinovosyldiacilglicerol (SQDG) e fosfatidilglicerol (PG). O movimento molecular destes glicerolípidos é determinado principalmente pelas extensões de insaturação dos ácidos graxos que são esterificados da cadeira principal de glicerol. O grau de insaturação é, por sua vez, determinada pela atividade da enzima desaturase de ácido graxo, esta enzima introduzem ligações duplas em posições específicas na cadeia dos ácidos graxos (LOS e MIRONOV, 2015).

A via de síntese de ácidos graxos por cianobactérias é iniciada pela via de conversão de carbono (Ciclo de Calvin) que gera o glicerato-3-fosfato (G3P). Por meio da via glicolítica este composto é convertido a acetil-coenzima A (Acetil Co-A). Acetil Co-A é

carboxilado para malonil-CoA por meio de um complexo multienzimático. Esta é considerada a primeira etapa da síntese de ácidos graxos. O grupo malonil do malonil-CoA é transferido para a proteína transportadora de acil (ACP). Estas proteínas transportadoras tornam os grupos acetil e malonil disponível para as enzimas seguintes na da síntese dos ácidos graxos. Acetil-ACP e malonil-ACP são condensados em conjunto para formar 3-ketobutiril-ACP and CO_2 . Este composto é então condensado com outra molécula de malonil-ACP para formar 3-cetoacil-ACP e CO_2 . O 3-cetoacil-AC tem seis átomos em comprimento (3-ceto-hexanoil-ACP). Este, em seguida, sofre a uma série de reações aumentando o comprimento da cadeia de acil pela adição de dois carbonos por vez. Este ciclo continua até que um acil-ACP de tamanho desejado seja alcançado (16C ou 18C). A acil-ACP de cadeia longa produzida pode ser submetida a uma variedade de diferentes destinos metabólicos dentre eles pode ser transferido para lipídios estruturais complexos para produzir compostos tais como glicerofosfolípidos gliceroglicolípidos ou que são utilizados em membranas celulares e das lipoproteínas, como fonte energética, como ácidos graxos livres ou entrar em outras vias bioquímicas para sintetizar metabólitos secundários (TAYLOR, 2012). Na figura 7 está descrito a via de biossíntese de ácidos graxos. Na figura 8 mostra uma visão simplificada das principais via metabólicas.

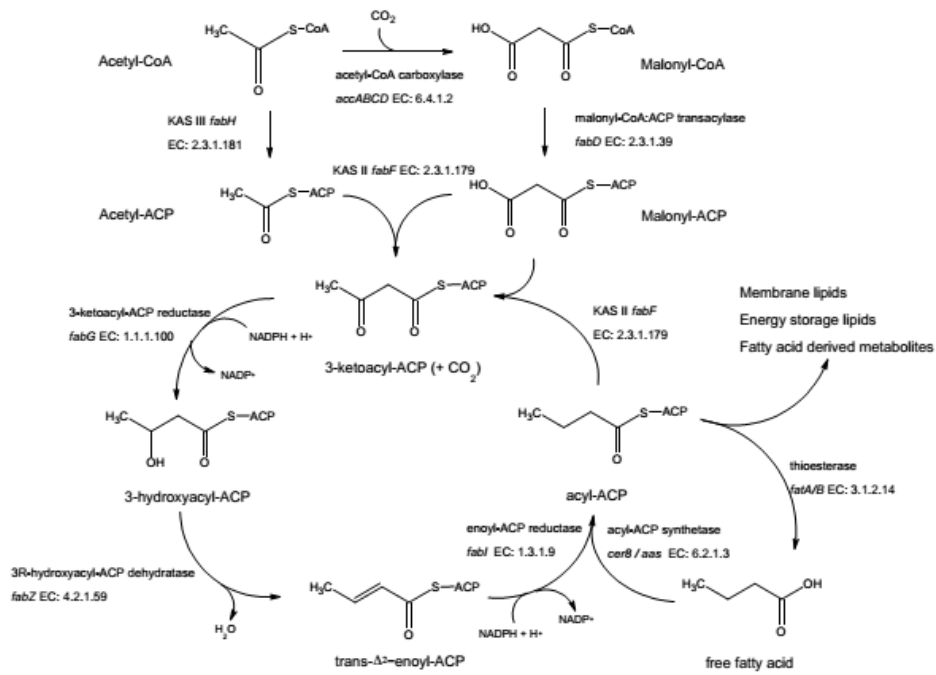


Figura 7: Resumo da biossíntese de ácidos graxos (Fonte: TAYLOR, 2012).

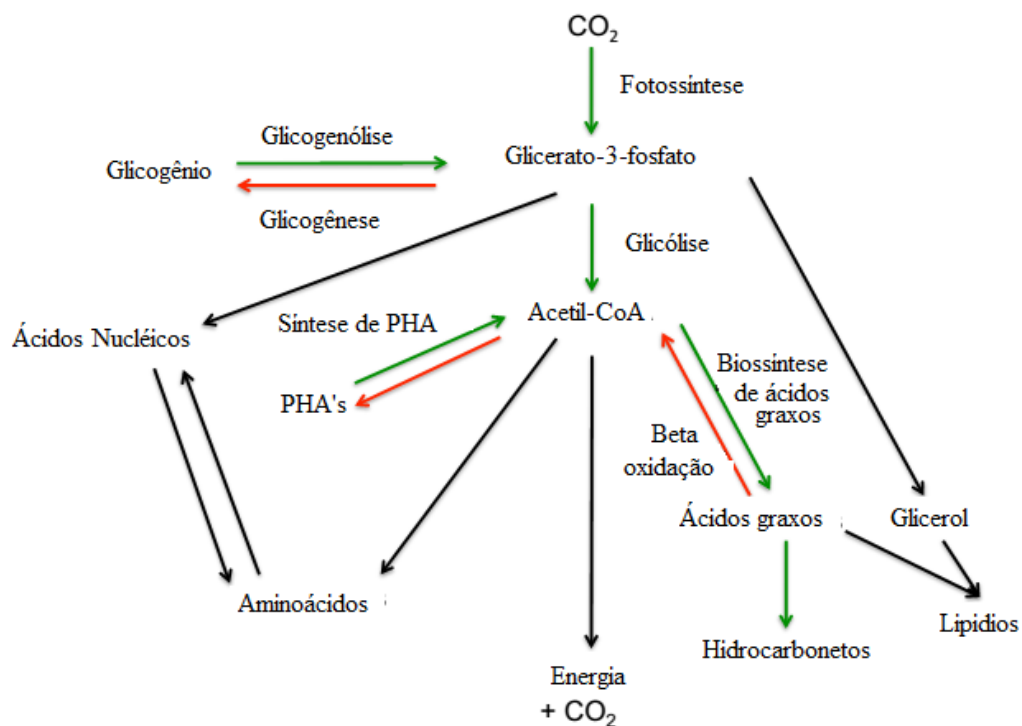


Figura 7: Visão simplificada das principais vias metabólicas em cianobactérias. Setas pretas: representam vias essenciais para sobrevivência. Setas verdes: fluxo do carbono. Setas vermelhas: Vias que podem ser reguladas pela modificação de genes (Fonte: TAYLOR, 2012).

Referências

- ABALDE, J.; CID, A.; FIDALGO, J.P.; TORRES, E.; HERRERO, C. **Microalgas: cultivo y aplicaciones**. La Coruña: Servicio de Publicaciones, 1995. 210 p.
- ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-12, 2009.
- AFIFY, A.; SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Enhancement of biodiesel production from different species of algae. **Grasas Y Aceites**, v. 61, p. 416-422, 2010.
- AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 1, p. 57-66, 2007.
- ANGERMAYR, S.A.; HELLINGWERF, K. J.; LINDBLAD, P.; DE MATTOS, M. J. T. Energy biotechnology with cyanobacteria. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, p. 257-263, 2009.
- ASTM D6751-02 (2002) Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels: ASTM International. West Conshohocken, USA
- ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and sustainable energy reviews**, v.16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.
- BITTENCOURT, M.; CABRAL, M.; YUNES, J. Cianobactérias tóxicas. **Biociência & desenvolvimento**, v. 23, p. 44-47, 2001.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- 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.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. D. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 849-854, 2009.
- BURJA, A. M.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; GRANT BURGESS, J.; WRIGHT, P. C. Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, v. 57, n. 46, p. 9347-9377, 2001.
- CALIJURI M.C., Alves M. S. A., SANTOS, A. A. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**, São Carlos: Ed. Rima, 2006, 109 p.

CAMPBELL, M. N. Biodiesel: algae as a renewable source for liquid fuel. **Guelph Engineering J.**, v.1, p. 2 -7.2008.

CHAI, X.; ZHAO, X.; BAOYING, W. Biofixation of carbon dioxide by *Chlorococcum* sp. in a photobioreactor with polytetrafluoroethene membrane sparger. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 29, 2014.

CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306. 2007.

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

DA RÓS, C. S. P.; SILVA, M. E.; SILVA-STENICO, M. F. F.; DE CASTRO, H. F. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 84, p. 177-182, 2012.

DE CASTRO OLIVEIRA, W.; DE OLIVEIRA, C. A.; CAMPOS-GALVÃO, M. E. M.; DE CASTRO, V. C.; DO NASCIMENTO, A. G. Cianobactérias: uma revisão sobre potencial nutricional e alguns aspectos biotecnológicos. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, vol. 2, n. 1, 49-67, 2013.

DENG, X.; LI, Y.; FEI, X. Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. A review. **Journal of Microbiology Research**, v. 3, n.13. p. 1008-1014, 2009.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959- 1967, 2006.

DUCAT, D. C.; WAY, J. C.; SILVER, P. A. **Engineering cyanobacteria to generate high-value products. A review. Trends in Biotechnology**, v.29, n. 2, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Chemical Biology**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FRANCESCHINI, I. M; BURLIGA, A. L; REVIERS, B.; PRADO, J. F.; RÉZIG, S. H. Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre: Artmed, 332 p. 2010.

FRANCISCO E. C; NEVES D.B.; JACOB-LOPES E.; FRANCO T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 395-403, 2010.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; DA CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; DE ALMEIDA NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

FUNASA. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processo de remoção em águas para consumo humano**. Brasília: Ministerio da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2003, 56 f.

GERIS, R.; SANTOS, N.; AMARAL, B.; MAIA, I.; CASTRO, V.; CARVALHO, Reação de Transesterificação para Aulas Práticas de Química Orgânica. **Química Nova**, Salvador – BA, v. 30, n. 05. 1369-1373, 2007.

HALIM, R.; DANQUAH, M.K.; WEBLEY, P.A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709–32, 2012.

HAYS, S. G.; DUCAT, D. C. Engineering cyanobacteria as photosynthetic feedstock factories. **Photosynthesis research**, p. 1-11, 2014.

HENRIQUES, N. M.; NAVALHO, J. C; VARELA, J. C ; CANCELA, M. L. Dunaliella: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de Biotecnologia**, n. 61, p. 12-18, Dez. 1998.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006.

HOSSAIN, A.B.M. S.; A., BOYCE, A.; CHOWDHURY, P; NAQUIDDIN, M. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy, **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n.3, p. 250-254, 2008.

HOYDONCX HE, DE VOS. DE, CHAVAN SA, JACOBS P.A. Esterification and transesterification of renewable chemicals. **Topics in Catalysis**, v. 27, p. 83–96, 2004.

KHAN, S.A; RASHMI; HUSSAIN, M.Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U.C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 2361-2372, 2009.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059–1070, 2005.

LEE, R. E. 2008. Cyanobacteria. In: Lee, R. E. (Ed.). **Phycology**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 33-80.

LEE, J.Y.; YOO, C.; JUN, S. Y.; AHN, C. Y.; OH, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource technology**, 101, n. 1, p. S75-S77, 2010.

LI, Y.; NAGHDI, F. G.; GARG, S.; ADARME-VEGA, T. C.; THURECHT, K. J.; GHAFOR, W. A.; SCHENK, P. M. A comparative study: the impact of different lipid

extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 14, 2014.

LIU, X., BRUNE, D., VERMAAS, W., CURTISS, R., III. Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2010.

LOS, D. A., MIRONOV, K. S. Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria: an update. **Life**, v. 5, n. 1, p. 554-567, 2015.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 587 p. 2006.

LU, X. A perspective: Photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 742-746, 2010.

MACHADO, I. M.; ATSUMI, S. Cyanobacterial biofuel production. **Journal of biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 50-56, 2012.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 14, n. 1, p. 217-232, Jan, 2010.

MAUL, A. A. Fluidos supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**, v. II, n. 11, p. 42-46, 1999.

MEIRELLES, F. S. **Biodiesel**. Federação da Agricultura do Estado de São Paulo. p.1-17. 2003.

MERCER, P.; ARMENTA, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. **European journal of lipid science and technology**, v. 113, n. 5, p. 539-547, 2011.

MIAO, X.L.; WU, Q.Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841 – 846, 2006.

MIAO, X.L.; WU, Q.Y. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 1, p. 85-93, 2004.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecol. Bras**, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; DE CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A.; DE SOUZA, C. O.; DRUZIAN, J. I.; HUSSAIN, J.;

LIAO, W. Microalgae versus land crops as feedstock for biodiesel: productivity, quality, and standard compliance. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 3, p. 1002-1013, 2014.

NASCIMENTO, I.A., MARQUES, S.S.I., CABANELAS, I.T.D., PEREIRA, S.A., DRUZIAN, J. I., DE SOUZA, C. O., VICH, D.V., CARVALHO, G.C.C., NASCIMENTO, M.A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioresource Technology**, v. 6, p. 1-13, 2013.

NOZZI, N. E.; OLIVER, J. W.; ATSUMI, S. Cyanobacteria as a platform for biofuel production. **Synthetic Biology**, v. 1, n. 7, 2013.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10163-10172, 2011.

PEREIRA, C. M.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M. F.; COLEPICOLO NETO, P. Biodiesel derived from microalgae: advances and perspectives. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 2, p.150-154, 2011.

QUINTANA, N.; VAN DER KOOY, F.; VAN DE RHEE, M. D.; VOSHOL, G. P.; VERPOORTE, R. Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 471-490, 2011.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technol**, v. 100, p. 261–268, 2009.

RESOLUÇÃO ANP N° 14 (2012)

http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml. Acessado em fevereiro de 2016.

REYNOLDS, C. S.; USHER, M.; SAUNDERS, D.; DOBSON, A.; PEET, R.; ADAM, P.; RICHARDSON, D. **Ecology of phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press. 535 pp. 2006

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science Ltd. 2004.

RIGANO, V. M.; VONA, V.; ESPOSITO, S.; CARILLO, P.; CARFAGNA, S.; RIGANO, C. The physiological significance of light and dark NH₄⁺ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 177-181, 1998.

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

AZEVEDO, M.T .P; SANT'ANNA, C.L. Morfologia e reprodução In: SANT'ANNA, C. L. et al. **Identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência. 2006. p. 5-8.

SHARATHCHANDRA, K.; RAJASHEKHAR, M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 2, p. 83-97, 2011.

SHARMA, N. K.; TIWARI, S. P.; TRIPATHI, K.; RAI, A. K. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 6, p. 1059-1081, 2011.

SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; DE CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus sp.* PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. **Algal Research**, v. 3, p. 1-7, 2014.

SINGH, S.; KATE, B. N.; BANERJEE, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n.3, p.73-95, 2005.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water; A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. cap. 3, p. 41-111.

SÖZGER, O. **Carotenoids assist in assembly and functions of photosynthetic complexes in cyanobacteria**. 2011. 91 f. PhD. Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences University of Szeged, Szeged.

TALEBI, A. F.; MOHTASHAMI, S. K.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI, M.; MIRZAEI, H. H.; MIRZAJANZADEH, M.; SHAFAROUDI, S.M.; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, p. 258-267, 2013.

TAYLOR, G. **Fatty Acid Metabolism in Cyanobacteria**. 2012. 275 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas)- University of Exeter, Reino Unido. 2012.

UNE-EN 14214 (2003) European Standard. Automotive Fuels. Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines. Requirements and Test Methods; CEN-European Committee for Standardization: Brussels, Belgium

VASUDEVAN, P.T.; BIRGGS, M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** , v.35, p. 421-430, 2008.

VIMALARASAN, A.; PRATHEEBA, N.; ASHOKKUMAR, B.; SIVAKUMAR, N.; VARALAKSHMI, P. Production of biodiesel from cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) by alkali and enzyme mediated transesterification. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.70, p. 959-967, 2011.

WAGNER, L. **Biodiesel from algae oil**. Mora Associates, 2007.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**: their diversity in time and space. Springer. 2010.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 796-799, 2010.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 3, 405-413, 2013.

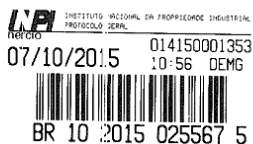
XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494-5500, 2010

ZHENG, Y.; CHEN, Z.; LU, H.; ZHANG, W. Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiform* is in a rectangular airlift photobioreactor. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.10, p. 1888–1901, 2011.

PATENTE

A presente invenção se refere a um método de extração de lipídios de cianobactérias, preferencialmente de *Microcystis panniformis* J. Komárek, J. Komárková-Legnerová, C. L. Sant'Anna, M. T. P. Azevedo, & P. A. C. Senna, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, *Microcystis novacekii* (Komárek) Compère e *Microcystis protocystis* Crow. O método proposto compreende modificações físicas na técnica de extração de lipídios nas espécies testadas, mas que podem ser adequadas também para microalgas e outros micro-organismos. Os resultados mostraram rendimentos dos extratos graxos semelhantes e/ou superiores a outros métodos descritos na literatura. As modificações introduzidas tornam o processo operacionalmente mais simples e econômico. O extrato graxo, assim obtido, é adequado para ser usado na produção de biodiesel.

O relatório descritivo do depósito de Patente não pode ser apresentado enquanto não estiver disponível na plataforma do Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Desta maneira, apenas o número do registro do depósito de pedido de patente é apresentado. Contudo, ressalta-se que se trata apenas de uma etapa metodológica que não compromete o entendimento da proposta e dos artigos gerados.



619

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
		Código: FQ001	Versão: 2
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
- 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
- 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
- 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
- 1.5 CEP: 31270-901
- 1.6 Telefone: (31) 3409-4774
- 1.7 Fax: (31) 3409-6430
- 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

"MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS GRAXOS DE CIANOBACTÉRIAS, PRODUTOS E USO"

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido N° _____ Data de Depósito: _____

- 5. Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito



continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: Raquel da Silva Cordeiro

6.2 Qualificação: Bióloga

6.3 CPF: 071.730.374-84

6.4 Endereço Completo: Rua Joaquim Francisco da Silveira, 305, Apto. 101, Bairro Ipiranga, Belo Horizonte, MG

6.5 CEP: 31.160-200

6.6 Telefone:

6.7 FAX:

6.8 E-mail:

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:			Código:	Versão:
Depósito de Pedido de Patente			FQ001	2	
			Procedimento:		DIRPA-PQ006

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	01
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	-
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	-
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	17
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	02
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	02
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	01
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	-
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de seqüências.	-
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso.	-
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de seqüências.	-
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Portarias, Anexo de Titulares, Anexo de Inventores, DOE.	05

12. Total de folhas anexadas: 29 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 07/10/2015

Local e Data

Adelina MR
Assinatura e Carimbo

Profa. Adelina Maria dos Reis
Pro-Reitora de Pesquisas UFMG
Portaria nº 1.530/2014

**Manuscrito 1 - Effects of nutritional conditions on lipid production by
cyanobacteria**

Manuscrito aceito para publicação no periódico: Anais da Academia Brasileira de Ciências.

Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria

Raquel da Silva Cordeiro¹, Izabela Cristina Dias Vaz¹, Sérgia Maria Starling

Magalh es², Francisco Antônio Rodrigues Barbosa¹

¹Laboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology – Institute of Biological Sciences – Universidade Federal de Minas Gerais – Av. Antônio Carlos, 6627 – 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

²Laboratory of Water – Department of Social Pharmacy – Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais— Av. Antônio Carlos, 6627 – Sala 1052– Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31270-901

Keywords: Biofuels, Culture medium, Lipids extraction, *Microcystis*, Nitrogen and phosphorus deprivation and Stress

Short title: Culturing conditions and lipid production by cyanobacteria

Section: Biological Sciences

Corresponding Author: Raquel Cordeiro – Laboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology – Institute of Biological Sciences –Federal University of Minas Gerais – Av. Antônio Carlos, 6627 – 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
e-mail: raqquel.cordeiro@gmail.com

ABSTRACT

The present study evaluated the effects of the culturing media and the levels of nitrogen and phosphorus on the growth, biomass productivity and lipid production of four species of *Microcystis* (*M. novacekii*, *M. aeruginosa*, *M. panniformis* and *M. protocystis*). The lipid extract was obtained by refluxing with dichloromethane (Soxhlet). The biomass and biomass productivity yields were maximized with ASM-1 medium treatment enriched with nitrogen and/or phosphorus (0.25-0.65 g/L and 25-50.7 mg/L d⁻¹, respectively). The lipid extract yields from *M. panniformis* and *M. novacekii* were inversely correlated with the concentration of nitrogen and directly correlated with the concentration of phosphorus (35.8 % and 31.7 %). The lipid extract yield from *M. aeruginosa* was inversely correlated with the nutrient concentration (23.3 %). *M. protocystis* exhibited a higher lipid content in the control medium (41.5 %) than in the nitrogen-enriched media. The recorded results show that a nutrient-poor culture medium favours cell growth and stimulates lipid accumulation, which directly affects the cost of cultivation by reducing nutrient consumption. All studied species may serve as biomass sources for biodiesel production, although *M. protocystis* exhibited the highest lipid production. Further studies are necessary to determine the composition of the recorded lipid extract.

Keywords: Biodiesel, culture media, lipid extraction, *Microcystis*, nitrogen and phosphorus deprivation and stress

INTRODUCTION

The decrease of worldwide oil reserves combined with the increase in the emission of greenhouse gases due to the use of fossil fuels has become a major impetus for the search for more environmentally friendly resources in order to meet the world's energetic needs in a sustainable manner (Silva et al. 2014). To this end, biofuels originating from plant biomass are an appealing option, although the energy used for fertilization, plantation, irrigation, and harvesting (Vasudevan and Briggs 2008) decreases the attractiveness of their production from social, economic, and environmental points of view.

Cyanobacteria are photosynthesizing, ancient and thriving microorganisms (gram-negative) (Gademan and Portman 2008, Mukherjee et al. 2013). These organisms produce a vast array of metabolites, such as proteins, carbohydrates, carotenoids, vitamins and lipids, which can be used as food sources for humans and animals, in pharmaceutical and cosmetic products and to produce energy (Parmar et al. 2011, Kaiwan-arporn et al. 2012, Borowitzka and Moheimani 2013, George et al. 2014, Zeng et al. 2015).

Cyanobacteria are promising for the production of biofuels mainly due to their high reproduction rates, high photosynthetic capacity and low nutritional requirements. Furthermore, these organisms do not compete for fertile and arable lands, and the plasticity of their metabolism allows lipid biosynthesis to be guided under controlled conditions. Lastly, several cyanobacteria strains can be easily genetically manipulated (Xin et al. 2010, Sharma et al. 2011, Sarsekeyeva et al. 2015).

To serve as an alternative for biofuel production, cyanobacteria must exhibit high biomass productivity and high lipid yields (Pulz and Gross 2004, Silva et al. 2014). However, distinct factors, such as light intensity, temperature, pH and nutrient

availability, can affect their growth, biomass productivity rates and lipid content (Mandal and Mallick 2009, Mata et al. 2010, Ahmad et al. 2011, Da Rós et al. 2012, George et al. 2014). Specifically, the concentrations of nitrogen and phosphorus within the culturing system are considered determinants of biomass growth and lipid accumulation (Xin et al. 2010, Markou et al. 2014).

Previous studies (e. g. Xin et al. 2010, Markou et al. 2012, Pancha et al. 2014) suggest that stress due to nutrient limitation can increase lipid content. The Redfield ratio proposed by Atkinson and Smith (1983) indicated that cyanobacteria cultivated with an N:P >30:1 exhibit limited growth due to insufficient phosphorus levels, whereas an N:P <10:1 indicates nitrogen deficiency, which promotes growth. Thus, low N:P proportions were found to promote growth, which implies that the culture medium needs to be optimized to maximize product yields based on the developmental capacity of these microorganisms (George et al. 2014).

Several studies have indicated that nitrogen and phosphorus limitation increases the accumulation of lipids in microalgae (e.g., Xu et al. 2001, Li et al. 2008, Xin et al. 2010, Lin and Lin 2011, Da Rós et al. 2012, Markou and Nerantzis 2013, Mayers et al. 2014). However, several of these studies only focused on the growth and accumulation of lipids by microalgae, although cyanobacteria also alter their growth rate and cellular composition when cultivated under sub- or supra-optimal nutrient conditions to address difficulties imposed by new environmental conditions (Makareviciene et al. 2013).

The present study aimed to i) evaluate the growth of four species of cyanobacteria maintained in three distinct nutritional culture media in order to select the best medium for maximizing biomass production and ii) investigate the effects of the

nitrogen and phosphorus concentrations on the growth and accumulation of lipids for biodiesel production.

MATERIAL and METHODS

Cyanobacteria

The following species were used in the present study: *Microcystis panniformis* J. Komárek, J. Komárková-Legnerová, C.L. Sant'Anna, M.T.P. Azevedo, & P.A.C. Senna, (2002), *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (1846), *Microcystis novacekii* (Komárek) Compère (1974) and *Microcystis protocystis* Crow (1923). The cyanobacteria were cultured at the Laboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology - LIMNEA at the Federal University of Minas Gerais. These species were collected, identified and isolated from natural lakes of the Rio Doce State Park in the southeast of Brazil.

Culture conditions

The cyanobacteria were cultivated in the following liquid media: Artificial Seawater Medium modified (ASM-1) (Gorham et al. 1964), Blue-Green 11 (BG-11) (Allen and Stanier 1968, Rippka et al. 1979) and Bold's Basal Medium (BBM) (Bold 1949, Bischoff and Bold 1963). The chemical compositions of the media are shown in Figure 1. The experiments were conducted in triplicate in Erlenmeyer flasks containing 700 ml of culture medium and 10% (v/v) of inoculum. The flasks were kept under constant light (40 W fluorescent lights/ $32 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) at a temperature of $20^\circ\text{C} \pm 2$ and bubbling with filtered air (3.5 L min^{-1}) for 13 days. These conditions were determined based on preliminary tests.

Composition	ASM-1 (mg/L)	BG-11 (mg/L)	BBM (mg/L)
Total Nitrogen	28	247.4	41.2
Total Phosphorus	2.3	4.2	13
N:P Ratio	12:1	59:1	3:1
NaCl	-----	-----	25
NaNO ₃	170	1500	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	29	36	25
MgCl ₂ .6H ₂ O	41	-----	-----
MgSO ₄ .7H ₂ O	49	75	75
H ₂ SO ₄	-----	-----	-----
K ₂ HPO ₄	8.7	30.6	75
KH ₂ PO ₄	-----	-----	175
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	17.8	-----	-----
Na ₂ Mg EDTA	-----	1	-----
NaCO ₃	-----	20	-----
CuSO ₄ .5H ₂ O	-----	0.08	0.08
Co(NO ₃)2.6H ₂ O	-----	-----	0.05
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0095	0.50	-----
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.00065	-----	-----
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.70	1.81	1.81
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-----	0.02	0.39
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.35	0.22	0.22
Citric Acid Monohydrate	-----	6	-----
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	-----	6	-----
H ₃ BO ₃	1.24	2.86	10.91
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.54	-----	-----
FeSO ₄ .7H ₂ O	-----	-----	4.98
EDTA Na ₂	3.72	-----	10
KOH	-----	-----	6.20

Figure 1. Composition of the culture media ASM-1, BG-11 and BBM.

Culture conditions under distinct nitrogen and phosphorus concentrations

The total nitrogen (N) and phosphorus (P) concentrations of ASM-1 medium were modified (Table 1) according to Da Rós et al. (2012). The experiments were conducted for 13 days in Erlenmeyer flasks containing 150 ml of ASM-1 modified medium and 10% (v/v) of inoculum. The treatments were conducted under the same

conditions described above. All experiments were conducted in triplicate and repeated 3 times.

Table 1. Changes in nitrogen and phosphorus concentrations of the ASM-1 culture medium.

Treatment	Total Nitrogen (mg/L)	Total Phosphorus (mg/L)	N:P Ratio
1*	28	2.3	12:1
2	42	3.5	12:1
3	14	3.5	4:1
4	42	1.2	35:1
5	14	1.2	11:1

* Quantity according to ASM-1 standard culture medium.

Growth Curves

The growth of each species was determined via optical density measurements (UV 1700 PhamaSpec SHIMADZU), namely the OD₆₅₅ (*M. panniformis*), OD₇₀₀ (*M. aeruginosa*), OD₆₈₀ (*M. novacekii*), and OD₇₀₀ (*M. protocystis*). The biomass concentration was determined based on individual calibration curves of optical density as a function of dry weight for each culture and used to calculate dry weight from optical density. The average dry weight of the samples was used to generate growth curves. Samples were collected at 48-hour intervals, and the maximum biomass production and biomass productivity were determined based on the growth curves. Specifically, the biomass productivity (P_x) was determined using Equation 1:

$$P_x = \Delta X / \Delta t \text{ (Equation 1)}$$

where ΔX corresponds to the difference between the final and initial in the biomass concentration (mg/L), and Δt (days) is the cultivation time interval.

Harvesting and biomass dryness

Cyanobacteria were harvested via centrifugation at 8000 x g and 4 °C for 10 min. The recovered biomass was dried in a convection oven at 50 °C for 24 h. The dry biomass was determined based on the gravimetric difference.

Lipid fraction extraction

The Soxhlet method with dichloromethane reflux was used to extract lipids because it was shown to be more efficient in preliminary tests. After 4 h. of extraction, the crude organic extract was removed and concentrated under a vacuum in a rotary evaporator (Marconi model TE-120) at temperatures up to 40 °C. The samples were then transferred to a convection oven and dried at 40 °C until reaching a constant weight. The lipid yield was calculated by dividing the lipid extract weight (g) by the dry biomass (g) and multiplying the result by 100.

Statistical Analysis

The results are expressed as the mean \pm SD (Standard Deviation). The effect of the culture medium on the biomass was tested with an analysis of variance (ANOVA, factor = culture media, days = repeated measurements) over all collected days. The effect of the culture media and distinct nitrogen and phosphorus treatments on the biomass concentration, biomass productivity and lipid content was tested with a one-way ANOVA. The normality of the data was analysed using the Shapiro-Wilk test, whereas homoscedasticity was assessed using Levene's test. To assess the significance of differences ($p < 0.05$), the mean were compared with a post hoc analysis (Tukey's LSD) using STATISTICA software, version 10 (Statsoft Inc., 2011).

RESULTS

The cyanobacteria growth curves recorded for the three culture media are shown in Figure 2. Significant effects on the biomass concentrations of all studied species were observed ($P = 0.000$). Specifically, the following maximum biomass levels were

obtained using ASM-1 medium: *M. protocystis* (0.887 g/L), *M. panniformis* (0.626 g/L), *M. aeruginosa* (0.504 g/L) and *M. novacekii* (0.484 g/L).

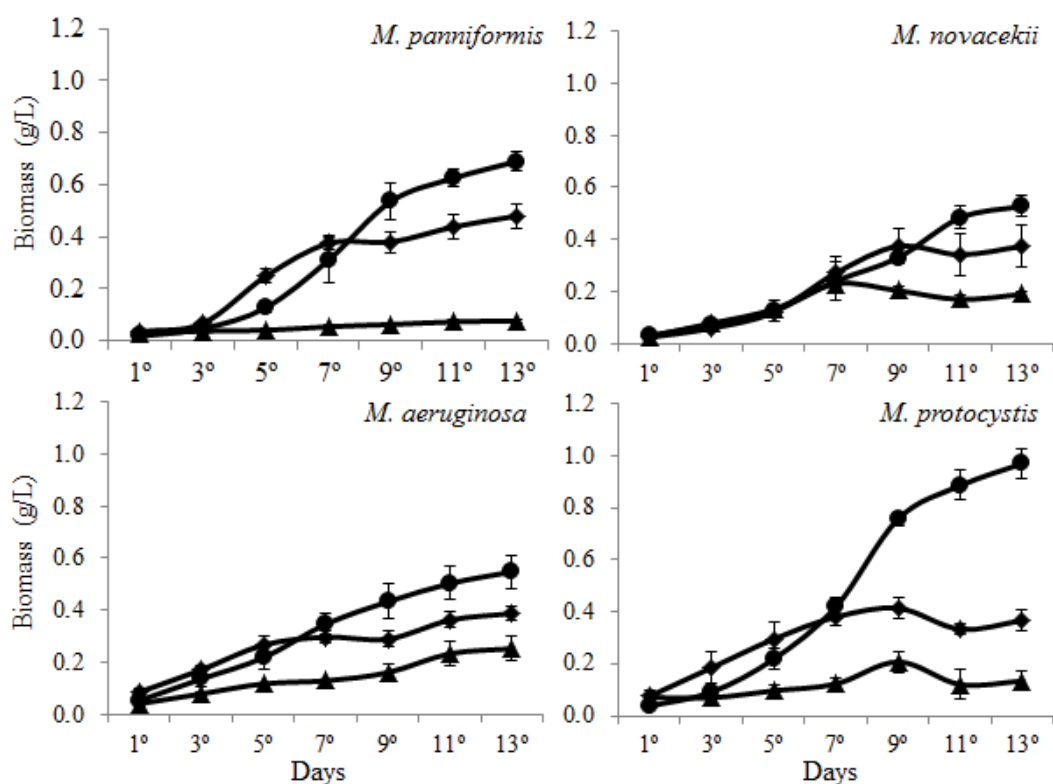


Figure 2. Growth curves and standard deviations for cyanobacteria species in distinct culture media for 13 days: (●) ASM-1, (◆) BG-11 and (▲) BBM.

The mean biomass productivity values are shown in Figure 3. Significant effects of the tested media were recorded for all evaluated species ($P = 0.000$). The biomass productivity rate was higher for strains that were cultivated in the ASM-1 medium than those in all other media tested. The highest productivity was obtained for *M. protocystis* ($77.8 \pm 4.8 \text{ mg/L d}^{-1}$), followed by *M. panniformis* ($56 \pm 2.9 \text{ mg/L d}^{-1}$), *M. aeruginosa* ($46.4 \pm 2.2 \text{ mg/L d}^{-1}$) and *M. novacekii* ($41.5 \pm 3.4 \text{ mg/L d}^{-1}$).

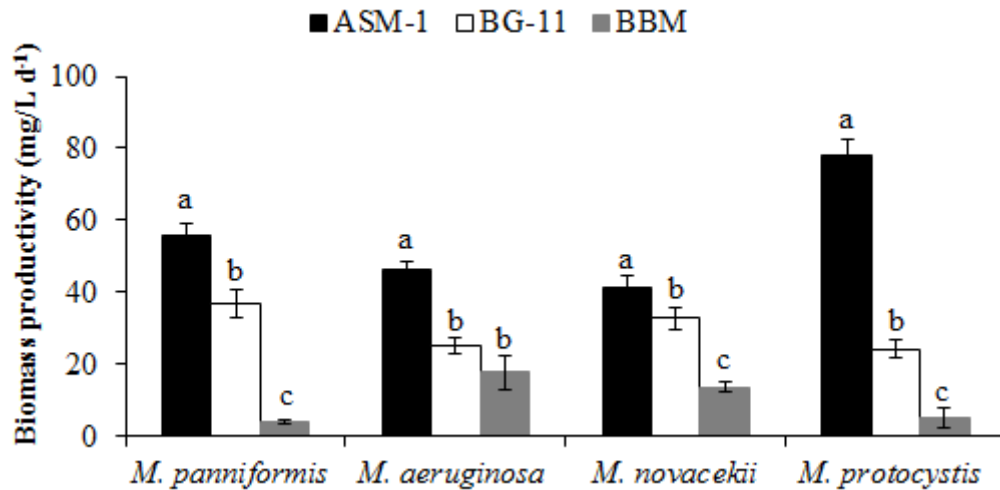


Figure 3. Mean biomass productivity and standard deviations (mg/L d⁻¹) of cyanobacteria species cultivated in distinct culture media for 13 days. *Significant differences among the culture media are indicated by different letters (ANOVA One-Way with post hoc Tukey's LSD, p < 0.05).

Based on the above results, the ASM-1 medium was selected to evaluate the effect of the N and P concentrations on the maximum biomass concentration, productivity, and lipid accumulation by cyanobacteria.

The effects of the N and P concentrations on the biomass production are presented in Figure 4. Specifically, the N and P concentrations did not significantly affect the biomass production by *M. aeruginosa* and *M. protocystis* but did significantly affect the biomass production by *M. panniformis* (P=0.000) and *M. novacekii* (P=0.001). Among the studied species, *M. protocystis* produced the most biomass in all tested treatments (0.52 to 0.61 g/L), whereas the other species produced more biomass in treatment which included increased N and P concentrations. Specifically, the maximum amounts of biomass produced were 0.36 ± 1.8 g/L for *M. novacekii*, 0.34 ± 0.9 g/L for *M. panniformis* and 0.25 ± 2.7 g/L for *M. aeruginosa*.

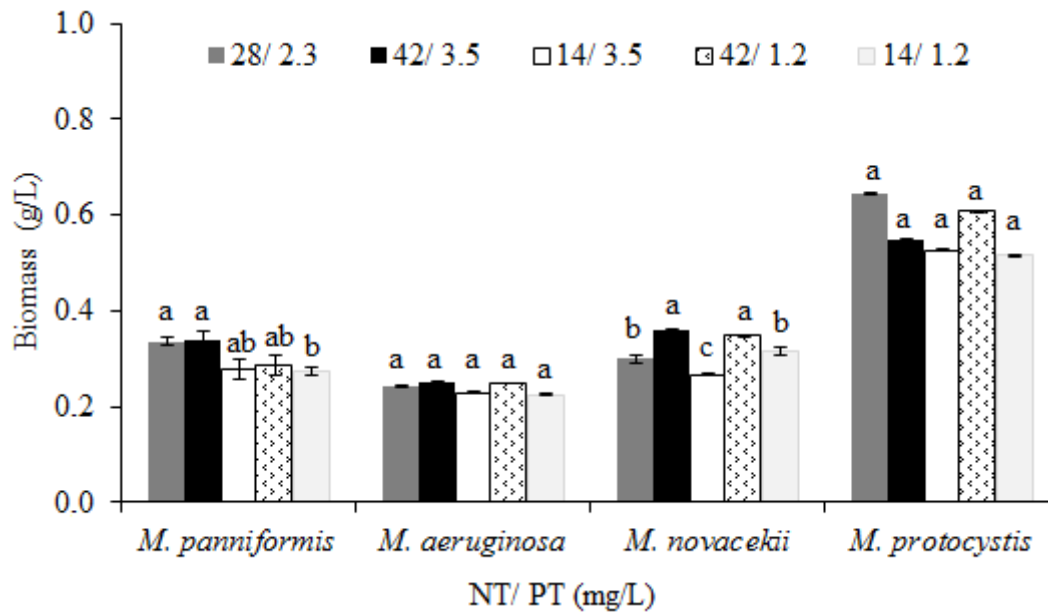


Figure 4. Maximum biomass and standard deviations (g/L) for the cyanobacteria species cultivated at distinct nitrogen and phosphorous concentrations for 13 days. Significant differences between treatments are represented by different letters (ANOVA One-Way with post hoc Tukey's LSD, $p < 0.05$).

The effects of the N and P concentrations on the biomass productivity rates and lipid yields of distinct species are shown in Figure 5. The treatments significantly affected the productivity rates of all tested species ($P = 0.000$), except for *M. aeruginosa*. The biomass productivity of *M. protocystis* ($50.7 \pm 1.3 \text{ mg/L d}^{-1}$) was maximized in the treatment which was only enriched with nitrogen. The productivity of *M. panniformis* was maximized in the control ($33.4 \pm 1.0 \text{ mg/L d}^{-1}$), whereas those of *M. novacekii* and *M. aeruginosa* were maximized in the treatment which included higher concentrations of nitrogen and phosphorus (32.5 ± 0.5 and $24 \pm 0.26 \text{ mg/L d}^{-1}$, respectively).

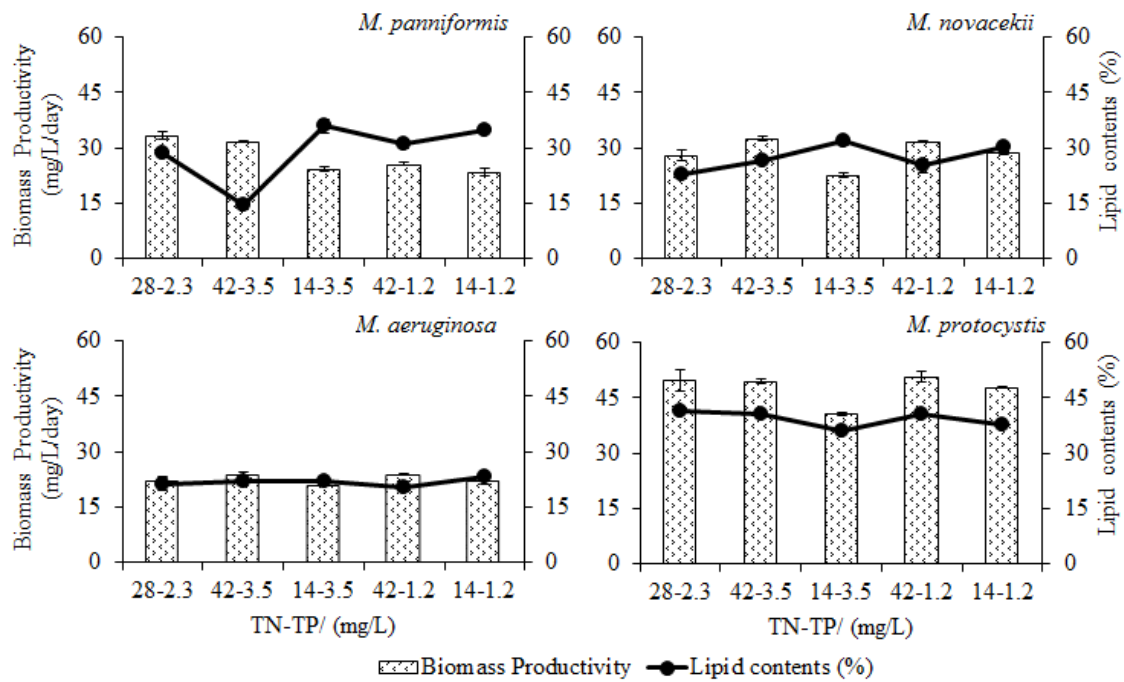


Figure 5. Effect of the nitrogen and phosphorous concentrations on the average biomass productivity and lipid content (%) of cyanobacteria for 13 days; standard deviations are also shown.

The lipid content extracted from cyanobacteria is shown in Figure 5. The treatments significantly affected the lipid content of all tested species ($P= 0.000$), except for *M. aeruginosa*. *M. panniformis* and *M. novacekii* produced greater amounts of lipid in response to lower nitrogen and higher P concentrations (35.8 ± 2 and 31.7 ± 1.3 %, respectively), which yielded the maximum lipid levels, followed by treatment which included lower N and P concentrations (34.8 ± 1 and 30 ± 1 %, respectively). The nitrogen concentrations were limited in these two treatments. *M. aeruginosa* exhibited higher lipid values when cultivated at low N and P concentrations. However, as shown in Figure 5, the lipid fraction obtained from this species does not depend on the nitrogen and phosphorus concentrations because the recorded mean are similar among treatments, ranging from 20.5 ± 1.7 to 23.1 ± 1.1 %. The behaviour of *M. protocystis* differed from that of other species. Treatment which is rich in nitrogen but poor in phosphorus maximized the lipid fraction (40.5 ± 0.2 %). In this treatment the N:P ratio is 35:1; thus, the phosphorus concentration is strongly limited. Nevertheless, similar

lipid fractions (40.4 ± 0.6 and 40.1 ± 2.2 %, respectively), were recorded for the control and treatment which included higher concentrations of nitrogen and phosphorus, which both feature an N:P ratio of 12:1 whereas lower values were recorded for treatments which feature reduced nitrogen levels (11:1 and 4:1, respectively).

DISCUSSION

The culture media significantly affected the growth of *Microcystis* species under test conditions. Moreover, the changes in the nitrogen and phosphorus contents in the ASM-1 medium significantly affected the growth, productivity and lipid yield.

BG-11, BBM and ASM-1 media are widely used to cultivate cyanobacteria. Their chemical composition is similar, particularly with respect to the nutrients included in the medium, although their concentrations differ among media. BG-11 and BBM contain higher levels of sulphates, nitrates and phosphates than ASM-1. Moreover, their N:P ratios differ. Specifically, the BBM medium features an N:P ratio of 3:1, which resulted in clear reductions in growth that are likely due to the limited N concentration. This finding corroborates those of Nascimento and Azevedo (1999), who cultivated *S. aquatilis f. salina* at an N:P ratio of 3:1 and recorded a low growth rate and biomass accumulation. This result is also similar to those obtained by George et al. (2014), who reported that the microalgae *Ankistrodesmus falcatus* exhibited reduced growth in BBM medium due to the low nitrogen concentration. The nitrogen concentration in the BG-11 medium is not limited (59:1) and consequently did not significantly affect the growth of microalgae, although this medium was not as effective as the ASM-1 medium (12:1).

Although high nutrient concentrations, particularly of nitrogen and phosphorus, are accepted to favour the growth of cyanobacteria (Ernest et al. 2005), some studies

recommend that these microorganisms must be treated individually and not as an homogeneous group because each species responds differently to the nutritional conditions (Marinho and Azevedo 2007, Markou and Georgakakis 2011, Loza et al. 2014). Our findings corroborate these previous findings.

Moreover, our findings are also corroborated by those of Shen and Song (2007), who studied different phenotypes of *Microcystis* (colonial and unicellular). They found that low phosphorous concentrations maximized the performance of colonial lineages compared with the unicellular forms. This effect can be attributed to the presence of mucilage in the colonial forms, which play an important role in the sequestration and assimilation of nutrients. Moreover, Loza et al. (2004) verified that high nutrient concentrations favoured some of the four studied cyanobacteria species (filamentous and colonials), whereas others produced higher yields in response to low concentrations due to their ecophysiological characteristics, such as the presence of heterocysts, which allow nitrogen fixation – an essential process during periods of nitrogen deprivation.

Finally, Vezie et al. (2002) verified that strains of toxic *Microcystis* performed better than non-toxic strains when cultivated under high nitrogen and phosphorus concentrations. In our study, this relationship with toxicity was not observed. The non-toxic species *M. protocystis* and *M. novacekii* performed better at higher concentrations of N and P than the toxic species *M. aeruginosa* and *M. panniformis*.

The results from our first phase show that the ASM-1 medium, whose composition is simpler than those of the BG-11 and BBM media, increased the productivity of the evaluated species. High biomass productivity rates are fundamental in large-scale cultivation processes, such as the production of biofuels, because high biomass densities increase the yield per volume of harvest while decreasing the cultivation

costs (Griffiths and Harrison 2009). Thus, a low-cost culture medium associated with rapid growth is attractive for biotechnological applications.

The biomass productivity and the lipid content are among the major parameters affecting the economic viability of biodiesel production from oils extracted from microalgae and cyanobacteria (Li et al. 2008, Dhup and Dhawn 2014). However, these parameters are not necessarily correlated. In response to nutrient scarcity, the metabolism of microalgae and cyanobacteria has been shown to be directed towards the synthesis of reserve compounds, such as saturated fatty acids, while halting cell division and consequently reducing growth rates (Alonso et al. 2000; Xin et al. 2010). According to Xin et al. (2010), nutritional limitations may result in lipid accumulation due to the following changes: a decrease in the thylakoid membrane content of the cell or the activation of acyl hydrolase and stimulation of phospholipid hydrolysis, which can enhance the intracellular fatty acid content.

In the present study, this relationship was observed for *M. panniformis*, *M. aeruginosa* and *M. novacekii*; specifically, the nitrogen and/or phosphorus concentrations were inversely correlated with lipid accumulation and directly correlated with biomass. Similar results were recorded by Converti et al. (2009) for the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. Specifically, nitrogen reduction doubled the accumulation of lipids while reducing the biomasses and productivity of both species. In a study of *Scenedesmus* sp., Xin et al. (2010) recorded high lipid contents in response to N and P limitation, followed by a reduction in the productivity rate. Rios et al. (2015) studied the microalga *Desmodesmus* sp. and recorded an increase in the lipid content followed by a reduction of biomass in response to nitrogen limitation. However, this relationship was not observed for *M.*

protocystis, whose productivity and lipid production were directly correlated with the nitrogen availability.

The majority of studies of the effects of N and P limitation on growth and lipid accumulation have focused on microalgae. However, Da Rós et al. (2012) examined *M. aeruginosa* and observed high productivity values in response to treatment with high N levels (83 mg/L day⁻¹), whereas the highest lipid content was recorded with standard ASM-1 medium. In our study, the species responses, particularly those of *M. aeruginosa*, were distinct, but the productivity rates were generally directly correlated with the N and P concentrations whereas the lipid concentration was inversely correlated with the nitrogen level. Moreover, the other *Microcystis* species in this study produced more lipids than those reported by the aforementioned authors.

Several other authors have also reported an inverse correlation between the lipid and nutrient contents for cyanobacteria species, such as *Spirulina* sp., which triple their lipid content in response to low nitrogen availability (Macedo and Alegre 2001), and for microalgae, such as *Monoraphidium* sp. (Dhup and Dhawan 2014), *Chlorella pyrenoidosa* (Nigam et al. 2011) and *Neochloris oleoabundans* (Li et al. 2008).

Overall, cyanobacteria produce oil yields ranging from 5 to 37 %. Sharathchandra and Rajashekhar (2011) evaluated 13 species of cyanobacteria from distinct aquatic environments and recorded lipid production rates ranging from 10.5 to 28.2 %, with the maximum value being produced by *M. aeruginosa* (28.2 %), whereas Da Rós et al. (2013) also reported a lipid yield of 28 % for this species, *Synechococcus* sp. and *Trichormus* sp. also produced yields of 26.9 and 23.7 %, respectively.

The comparison of lipid production by microalgae and cyanobacteria is limited by the lack of standardization for lipid extraction procedures, which results in considerable variations among the obtained results. For example, Kaiwan-arporn et al.

(2012) used distinct methods to extract lipids from *Synechocystis aquatilis* and recorded lipid contents between 6.5 and 21.3 %. Conversely, Silva et al. (2014) reported lipid contents of 13-36.8 % for *Synechococcus* sp., depending on the method of extraction, whereas Ashokkumar et al. (2014) used various solvents to extract oil from *M. aeruginosa* and obtained yields between 10.7 and 21.3 %.

In the present study, the lipid production by all *Microcystis* species ranged from 14.3 to 40.5 %. These rates are similar to or exceed the previously recorded rates for related species, which indicates that cyanobacteria constitute a new source of raw material for biofuel production under the tested conditions.

CONCLUSIONS

The present study elucidated new alternative sources of fuels by demonstrating that cyanobacteria species can constitute a low-cost raw material that produces favourable lipid yields for biofuel production. The low nutritional requirements of the tested species constitute an important point to be considered. Specifically, a culture medium poor in nutrients was shown to favour cell growth and stimulate the accumulation of lipids, which directly impacts the cost of cultivation by reducing nutrient utilization. Moreover, *Microcystis* species, which inhabit almost all types of aquatic ecosystems and very often dominate impacted environments worldwide easily adapted to laboratory conditions, which suggests that these species may be used in production plants. Among the studied species, *M. protocystis* produced the highest level of lipids, making it the most promising species for utilization at an industrial scale. New studies are necessary to determine the composition of the obtained lipid extract and to chemically and physically characterize these lipids for the production of biofuel.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Processo 471757/2013-6) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG- Processo APQ 01389-13) for the financial support and scholarship.

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito do meio de cultura e das concentrações de nitrogênio e fósforo no crescimento, produtividade de biomassa e produção lipídica de 4 espécies do gênero *Microcystis* (*M. novacekii*, *M. aeruginosa*, *M. panniformis* e *M. protocystis*) cultivadas nos meios líquidos ASM-1, BG-11 e BBM. O extrato lipídico foi obtido por refluxo em diclometano (Soxhlet). Os maiores rendimentos de biomassa e produtividade de biomassa foram obtidos no meio ASM-1. A biomassa e a produtividade foram maiores no tratamento enriquecido pela adição de nitrogênio e/ou fósforo (0,25-0,65 g/L e 25-50,7 mg/L d⁻¹, respectivamente). *M. panniformis* e *M. novacekii* apresentaram maior rendimento do extrato lipídico nos tratamentos com menores concentrações de nitrogênio e maiores concentrações de fósforo (35,8 % e 31,7 %) e *M. aeruginosa* no tratamento em baixas concentrações desses nutrientes (23,3 %). *M. protocystis* obteve teor máximo de lipídios no controle (41,5 %). Os resultados obtidos indicam que um meio de cultivo mais pobre em nutrientes pode favorecer o crescimento celular e estimular a acumulação de lipídios. Esse aspecto impacta diretamente no custo de produção do cultivo reduzindo o dispêndio do consumo de nutrientes. Todas as espécies demonstraram potencial como fonte de biomassa para produção de biodiesel, sendo *M. protocystis* aquela que apresentou a maior produção lipídica. Assim, estudos futuros são necessários para determinar a composição do extrato lipídico obtido.

Palavras-chave: Biodiesel, Estresse, Extração lipídica, Meio de cultura, *Microcystis*, Privação de nitrogênio e fósforo.

REFERENCES

- AHMAD AL, YASIN NH, DEREK CJC AND LIM JK. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renew Sust Energ Rev* 15(1): 584-593.
- ALLEN MM AND STANIER RY. 1968. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *J Gen Microbiol* 51: 203-209.
- ALONSO DL, BELARBI EH, FERNÁNDEZ-SEVILLA JM, RODRÍGUEZ-RUIZ J AND GRIMA EM. 2000. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytochemistry* 54(5): 461-471.
- ASHOKKUMAR V, AGILA E, SALAM Z, PONRAJ M, DIN MFM AND ANI FN (2014). A study on large scale cultivation of *Microcystis aeruginosa* under open raceway pond at semi-continuous mode for biodiesel production. *Bioresource Technol* 172: 186-193.
- ATKINSON MJ AND SMITH SV. 1983. C:N:P ratios of benthic marine plants. *Limnol Oceanogr* 28: 568-574.
- BISCHOFF HW AND BOLD HC. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. University of Texas Publications 6318: 1-95. ANDERSEN, R.A. (ed.) (2005): *Algal culturing techniques*, 578pp, Elsevier Academic Press, London.
- BOLD HC. 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. Nov. *B Torrey Bot Club* 76: 101-108.
- BOROWITZKA MA AND MOHEIMANI NR. 2013. Sustainable biofuels from algae. *Mitigation Adapt Strateg Glob Chang* 18 (1): 13-25.
- COMPÈRE P. 1974. Algues de la région du lac Tchad. II. Cyanophycées. - *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér Hydrobiol* 8: 165-198.
- CONVERTI A, CASAZZA AA, ORTIZ EY, PEREGO P. AND DEL BORGHI M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem Eng Process* 48: 1146-1151.
- CROW WB. 1923. The Taxonomy and Variation of the genus *Microcystis* in Ceylon. *New Phytol* 22: 59-68.
- DA RÓS PCM, SILVA ME, SILVA-STENICO MFF AND DE CASTRO HF. 2012. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. *J Mol Catal* 84: 177-182.

DA RÓS PCM, SILVA CSP, SILVA-STENICO ME, FIORE MF AND DE CASTRO HF. 2013. Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. *Mar Drugs* 11(7): 2365-2381.

DHUP S AND DHAWAN V. 2014. Effect of nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition of *Monoraphidium* sp. *Bioresource Technol* 152: 572-575.

ERNST A, DEICHER M, HERMAN PM AND WOLLENZIEN UI. 2005. Nitrate and phosphate affect cultivability of cyanobacteria from environments with low nutrient levels. *Appl Environ Microb* 71(6): 3379-3383.

GADEMANN K AND PORTMANN C. 2008. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Curr Org Chem* 12(4): 326-341.

GEORGE B, PANCHA I, DESAI C, CHOKSHI K, PALIWAL C, GHOSH T AND MISHRA S. 2014. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technol* 171: 367-374.

GORHAM PR, MCLACHLAN J, HAMMER UT AND KIM WK. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh Internat Verein Limnol* 15: 796-804.

GRIFFITHS MJ AND HARRISON STL. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21(5): 493-507.

KAIWAN-ARPORN P, HAI PD, NGUYEN TT AND ANNACHHATRE AP. 2012. Cultivation of cyanobacteria for extraction of lipids. *Biomass Bioenerg* 44: 142-149.

KOMÁREK J, KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ J, SANT'ANNA CL, AZEVEDO MTD AND SENNA PAC. 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp.. *Cryptogamie Algol* 23: 159-177.

LI Y, HORSMAN M, WANG B, WU N AND LAN CQ. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(4): 629-636.

LIN Q AND LIN J. 2011. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technol* 102: 1615-1621.

LOZA V, PERONA E AND MATEO P. 2014. Specific responses to nitrogen and phosphorus enrichment in cyanobacteria: Factors influencing changes in species dominance along eutrophic gradients. *Water Res* 48: 622-631.

- MACEDO RT AND ALEGRE RM. 2001. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em dois níveis de temperatura – Parte II: Produção de lipídios. *Ciênc Tecnol Aliment* 21(2): 183-186.
- MAKAREVICIENE V, SKORUPSKAITE V AND ANDRULEVICIUTE V. 2013. Biodiesel fuel from microalgae-promising alternative fuel for the future: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2: 119–130.
- MANDAL S AND MALLICK N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biot* 84(2): 281-291.
- MARINHO MM AND AZEVEDO SMFO. 2007. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. *Aquat Ecol* 41: 525-533.
- MARKOU G, ANGELIDAKI I AND GEORGAKAKIS D. 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl Microbiol Biot* 96: 631-645.
- MARKOU G AND GEORGAKAKIS D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Appl Energ* 88(10): 3389-3401.
- MARKOU G AND NERANTZIS E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnol Adv* 31(8): 1532-1542.
- MARKOU G, VANDAMME D AND MUYLAERT K. 2014. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Res* 65: 186-202.
- MATA TM, MARTINS AA AND CAETANO NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev*. 14(1): 217–232.
- MAYERS JJ, FLYNN KJ AND SHIELDS RJ. 2014. Influence of the N: P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technol* 169:588-595.
- MUKHERJEE G, NAYAK BK AND DAS D. 2013. Cyanobacteria as a valuable source of antiviral, antibacterial and antifungal compounds—an overview. *Algol Stud* 143(1): 3-25.
- NASCIMENTO SM AND AZEVEDO SMFO. 1999. Changes in cellular components in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios-an ecophysiological study. *Environ Toxicol* 14: 37-44.
- NIGAM S, RAI MP AND RUPALI S. 2011. Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa*. *Am J Biochem Biotechnol* 7(3): 124-129.

- PANCHA I, CHOKSHI K, GEORGE B, GHOSH T, PALIWAL C, MAURYA R AND MISHRA S. 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour Technol* 156: 146–154.
- PARMAR A, NK, PANDEY A, GNANSOUNOU E AND MADAMWAR D. 2011. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresour Technol* 102: 10163–10172.
- PULZ O AND GROSS W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biot* 65: 635-648.
- RIOS LF, KLEIN BC, LUZ LFJR, MACIEL RF AND MACIEL MRW. 2015. Nitrogen Starvation for Lipid Accumulation in the Microalga Species *Desmodesmus* sp.. *Appl Biochem Biotech* 175: 469-476.
- RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY JW, HERMAN M AND STANIER RY. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61.
- SARSEKEYEVA F, ZAYADAN BK, USSERBAEVA A, BEDBENOV VS, SINETOVA MA AND LOS DA. 2015. Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. *Photosynth Res* 125: 329-340.
- SHARATHCHANDRA K AND RAJASHEKHAR M. 2011. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. *J Algal Biomass Utiln* 2(2): 83-97.
- SHARMA YC, SINGH B AND KORSTAD J. 2011. A critical review on recent methods used for economically viable and eco-friendly development of microalgae as a potential feedstock for synthesis of biodiesel. *Green Chem* 13: 2993-3006.
- SHEN H AND SONG L. 2007. Comparative studies on physiological responses to phosphorus in two phenotypes of bloom-forming *Microcystis*. *Hydrobiologia* 592(1): 475-486.
- SILVA CSP, SILVA-STENICO ME, FIORE MF, DE CASTRO HF AND DA RÓS PCM. 2014. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. *Algal Research* 3: 1-7.
- VASUDEVAN PT AND BRIGGS M. 2008. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 421-430.
- VÉZIE C, RAPALA J, VAITOMAA J, SEITSONEN J AND SIVONEN K. 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microb Ecol* 43(4): 443-454.
- XIN L, HONG-YING H, KE G AND YING-XUE S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid

accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol* 101(14): 5494-5500.

ZENG Y, J, S, TONG D AND C. 2015. Study on the conversion of cyanobacteria of Taihu Lake water blooms to biofuels. *Biomass Bioenerg* 73: 95-101.

**Manuscrito 2- Co-culture of cyanobacteria and microalgae: enhancing
biomass productivity, lipid content and biofuel quality**

Manuscrito formatado para publicação no periódico: Bioresource Technology

Co-culture of cyanobacteria and microalgae: enhancing biomass productivity, lipid
content and biofuel quality

Raquel da Silva Cordeiro^a, Sérgia Maria Starling Magalhães^b, Vânia M. D. Pasa^c
and Francisco Antônio Rodrigues Barbosa^a

^aLaboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology – Institute of
Biological Sciences – Universidade Federal de Minas Gerais – Av. Antônio Carlos,
6627 – 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^bLaboratory of Water – Department of Social Pharmacy – Faculty of Pharmacy,
Universidade Federal de Minas Gerais— Av. Antônio Carlos, 6627 – Sala 1052– Belo
Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31270-901

^cFuel Laboratory, Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais
– Av. Antônio Carlos, 6627 – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31270.901

*Corresponding author: Raquel Cordeiro - Laboratory of Limnology, Ecotoxicology
and Aquatic Ecology – Institute of Biological Sciences – Universidade Federal de
Minas Gerais – Av. Antônio Carlos, 6627 – 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais,
Brasil. e-mail: raqquel.cordeiro@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to investigate the use of the strategy of co-culture among five cyanobacteria (*M. panniformis*, *M. viridis*, *M. aeruginosa*, *M. novacekii* and *M. protocystis*) and two microalgae species (*Kirchneriella obesa* and *Chlorella vulgaris*). Growth, biomass productivity, lipid content, and fatty acid composition were investigated. The specific growth rates of *Microcystis* were higher than the ones of microalgae. The highest biomass accumulation was obtained in mono-culture of *M. protocystis* (646.3 mg/L). Co-culture resulted in higher yields of productivity than that recorded from mono-culture. Lipid content of *Microcystis* and microalgae in co-culture was higher (23 to 47.6 %) than those in mono-culture (14.3 to 42.9 %). The fatty acid profile for all *Microcystis* and *K. obesa* individual and in the co-culture in the absence of the microalgae species was similar, with predominance of saturated, monounsaturated and polyunsaturated acids, respectively. Unlike, in the presence of the microalgae species in co-culture was recorded predominantly monounsaturated. The oil obtained from most cyanobacteria and microalgae in mono- and co-culture is good enough for making biodiesel according to estimated empirical equations. The results indicate that the co-culture strategy of *Microcystis* and microalgae species resulted in significant increase in the productivity and lipid content, although this was not observed in all the co-cultures tested.

Keywords: co-culture, cyanobacteria, productivity, lipid content, biofuel quality.

1. Introduction

The interest in biofuels has increased due to imminent reduction in non-renewable energy sources, increased costs of these resources and the need to ensure energy security. Biofuels are produced from a biomass which is the product of carbon fixation by photosynthetic organisms as plants, microalgae, and cyanobacteria (Sarsekeyeva et al., 2015). Recently, microalgae and cyanobacteria have been considered as a promising source for biofuels and chemical feedstocks, and their biomass represent an alternative for biofuel production, especially biodiesel (Quintana et al., 2011; Sarsekeyeva et al., 2015).

This interest is due mostly to their main advantages that include simplicity of culture, higher photosynthetic efficiency and growth rates, higher biomass production and oil productivities compared to typical terrestrial oil-seeds, and higher rates of CO₂ fixation and O₂ release (Mata et al., 2010; Mubarak et al., 2015). Additionally, they are non-food based feedstock resources therefore do not compete with other food sources (Mata et al., 2010).

Many approaches of cultivation, such as use of bioreactors, heterotrophic and mixotrophic nutrition, and co-culturing of cyanobacteria and microalgae have been developed to increasing biomass accumulation and total lipid yield. Of these approaches, co-culturing of microorganisms is a convenient solution for achieving the goals due to several aspects (Cai et al., 2007; Zhao et al., 2014). Co-culture condition has been explored in studies on the interactions between cell populations and is important to investigate cell–cell interaction of any kind (Goers et al., 2014).

In co-culture condition the quantity and type of organisms in the culture are all defined before inoculation, in which two or more different cell populations are grown

synchronously within same culture medium (Cai et al., 2007; Oncel et al., 2011). Furthermore, the use of co-cultures can perform complex functions that for individual populations are rather difficult or even impossible (Subashchandrabose et al., 2011). Co-culture can give greater stability to members, can mutually share complementary metabolic activities and also stimulate the synthesis of other secondary metabolites of interest (Subashchandrabose et al., 2011; Goers et al., 2014). This inter-population communication can imply exchange of chemicals that may be involved in the metabolism and growth of population. Finally, it is believed co-cultures become more robust to changes in culture environment (Brenner et al., 2008).

Most of co-culture studies for enhancement of biomass and lipid yields involves the use of several kinds of microorganisms in which are performed with only two populations as for example bacteria and microalgae (Wang et al., 2015), yeast and microalgae (Zhang et al., 2014; Yen et al., 2015), and two microalgae species (Oncel et al., 2011; Zhao et al., 2014). Although, few information is available in the use of cyanobacteria and microalgae grown in co-culture we can highlight the studies with *Chlorella vulgaris* and *Leptolyngbya* sp. (Bai et al., 2014) and *Chlorella vulgaris* and *Planktothrix isothrix* (Silva-Benavides and Torzillo, 2012).

In this study we have established a co-culture system with cyanobacteria and microalgae particularly considering their individual advantages (1) cyanobacteria have higher photosynthetic efficiency than microalgae due to increased range of their photosynthetic apparatus (2x greater) (Parmar et al., 2011); (2) cyanobacteria have higher growth rates than microalgae due to its simple cell structure which might yield higher lipid productivity (Quintana et al., 2011); (3) microalgae are commonly known to accumulate more oil than cyanobacteria (Wahlen et al., 2011); (4) microalgae produce higher amounts of polyunsaturated fatty acids (Dos Santos et al., 2015),

whereas fatty acid compositions for cyanobacteria is comprised of saturated fatty acids (Quintana et al., 2011); (5) the presence of different species better influence the growth and change the fatty acid composition of oils obtained than the species in mono-culture (Cai et al., 2007). Therefore, the advantages of each species could be combined to improve biomass accumulation and lipid production.

Moreover, cyanobacteria species are commonly found in phytoplankton communities in aquatic ecosystems worldwide, and some of them often form blooms (Gomes et al., 2015). Cyanobacterial blooms are a great threat to environmental health and public safety due to many cyanobacteria produce a variety of potent toxins and nasty odors (Lurling et al., 2013). On the other hand, this biomass could be used for several biotechnological purposes such as in the biosynthesis of pigments, colorants and certain bioactive compounds, applied in the food industry (Vanthoor-Koopmans et al., 2013), pharmacy and cosmetics (Singh et al., 2005), and biofuels (Sarserkeyaia et al., 2015). However, there is little information about on the use of cyanobacteria and microalgae grown in co-culture conditions. Therefore, the aim of this study was to investigate the use of the strategy of co-culture among cyanobacteria and microalgae in relation to growth, biomass productivity, lipid content and fatty acid composition.

2. Methods

2.1. Microorganisms

Microcystis panniformis J. Komárek, J. Komárková-Legnerová, C. L. Sant'Anna, M. P. Azevedo, & P. A. C. Senna, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, *Microcystis novacekii* (Komárek) Compère, *Microcystis protocystis* Crow, *Microcystis viridis* (A. Braun) Lemmermann, *Kirchneriella obesa* (West) West & G. S. West and *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beijerinck) were obtained from the Laboratory of Limnology, aquatic ecology and ecotoxicology of the Institute of Biological Sciences

of the Federal University of Minas Gerais- Brazil. These species were collected, identified and isolated from natural lakes of the Rio Doce State Park in the southeast of Brazil. These species were selected to the co-cultures because they are commonly recorded together in the same environment (unpublished data).

2.2. Mono- and co-culture conditions

We performed the cultivation of each species separately until the start of exponential phase to use as initial inoculum for each culture condition. An equal concentration of 3.5×10^5 cells ml^{-1} was used as inoculum in condition of monoculture and co-culture. Cultures were performed in 250 mL flasks containing 150 mL of the ASM-1 medium. The flasks were maintained at 20 ± 2 °C and the cultures were illuminated continuously with cool white fluorescent lamps ($32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and orbital shaking by 15 days. Co-culture experiments were maintained in the same conditions of cultivation of the mono-culture experiments. Co-culture treatments are represented in Table 1. In the first treatment, all species were maintained growing together, then the others treatments were always performed excluding one species of the treatment. All experiments were performed simultaneously. Those experiments were performed in triplicate and repeated three times.

Table 1: Experimental design of the cyanobacteria and microalgae in co-culture conditions.

Treatment	Cyanobacteria					Microalgae	
	<i>M. panniformis</i>	<i>M. viridis</i>	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. novacekii</i>	<i>M. protocystis</i>	<i>K. obesa</i>	<i>C. vulgaris</i>
1	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+	+
4	+	+	-	+	+	+	+
5	+	+	+	-	+	+	+
6	+	+	+	+	-	+	+
7	+	+	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+	+	-

2.3. Determination of algal growth and biomass concentrations

The growth in mono-culture was determined by optical density measurements (UV-1700 PhamaSpec SHIMADZU) and biomass concentration determined by the calibration curves of dry biomass weight (DBW) versus optical density (OD). It was determined the wavelength O.D._{700nm} for all treatments. To determine DBW, cells were centrifuged at 8000 rpm for 20 min. at 4 °C. The cell pellet was washed twice with distilled water, harvested and dried at oven. The average dry biomass weight of treatments was used to build growth curves. Samples were collected at 48 hours intervals. The specific growth rate (μ) at the exponential phase was calculated by:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

Where X_2 and X_1 are DBW (mg/L) at time of t_2 and t_1 , respectively. Biomass productivity (P_{DBW}) was calculated by:

$$(P_{DBW}) = (\Delta X / \Delta t) \quad (2)$$

Where, ΔX corresponds to the variation of the concentration of biomass (mg/L) within in time culture Δt (d). Experiments were performed in triplicate and repeated three times. Data were expressed as mean standard deviation (\pm SD).

2.4. Lipid extraction and determination

Lipid content was obtained from Soxhlet method with dichloromethane reflux. After 4 hours of extraction the dichloromethane was removed and the crude organic extract was concentrated under vacuum in rotative evaporator (Marconi model TE-120) up to 40 °C. The crude organic extract were then transferred to oven with air circulating and dried at 40 °C until constant weight. The lipid content (%) was calculated by:

$$\text{Lipid content total (\%)} = (W_L/\text{DBW}) \times 100 \quad (3)$$

Where W_L (mg) is the weight of the extracted lipids and DBW (mg) is the dry biomass weight.

2.5. Fatty acid composition analysis

To determine the fatty acid composition of each species in mono-culture and co-cultures the analyses were applied to the transesterified oil, which was extracted from biomass. Analyses of the fatty profile were performed in a gas Chromatograph (Shimadzu GC-2010) equipped with flame ionization detector and the capillary column SP2340 60 m x 0.25 mm x 0.20 μ m (Supelco/ Sigma-Aldrich). Temperatures from the detector and injector were 260 °C. The temperature gradient used was: 140 °C for 5 min, with gradual increase of 4 °C per minute until 240 °C, where it was held for 19 min. Helium was used as carrier gas with linear velocity 20 cm/s. The injection volume was 1 μ L and split 1:50. The identification of FAME was performed using

Supelco 37 Component Fame Mix (37 Comp. FAME Mix 10 mg/ml in CH₂CL₂; Supelco, USA) as standard and the quantification by normalization of the area.

2.6. Properties of biodiesel from mono- and co-culture conditions

Properties of biodiesel can be estimated by the fatty acid profile. In addition, the calculations for estimating the quality of biodiesel are based on correlative models involving empirical equations in reference to fatty acid profile of vegetable and microalgae oils (Ramos et al., 2009; Francisco et al., 2010; Nascimento et al., 2013).

The degree of unsaturation (DU) was calculated as follows Ramos et al. (2009):

$$DU = (\text{monounsaturated}) + 2 \times (\text{polyunsaturated}) \quad (4)$$

Where DU is the unsaturation degree (%), monousaturated is the weight percentage of the monousaturated fatty acids (wt %) and polyunsaturated is the weight percentage of the polyunsaturated fatty acids (wt %).

The long chain saturated factor (LCFS) was calculated as follows Ramos et al. (2009):

$$LCFS = (0.1 \times C16) + (0.5 \times C18) + (1 \times C20) + (1.5 \times C22) + (2 \times C24) \quad (5)$$

Where LCFS is long chain saturated factor (%); C16, C18, C20, C22 and C24 are the weight percentage of each of the fatty acids (wt %).

The cold filter plugging point (CFPP) was calculated as follows Ramos et al. (2009):

$$CFPP = 3.1417 \times LCFS - 16.477 \quad (6)$$

2.7. Statistical analysis

All the experiments were carried out in triplicates and data are presented as mean standard deviation (\pm SD). Data were further analyzed using one-way analysis of

variance (ANOVA) to test significant differences among cyanobacteria and microalgae in monoculture, and among the co-culture treatments ($P < 0.05$). Post hoc analyses were conducted using Tukey's when there was difference statistically significant. Analyses were performed using Statistica 10 software (Statsoft Inc., 2011).

3. Results and Discussion

3.1. Growth in mono- and co-culture conditions

The growth rates of the monoculture of cyanobacteria and microalgae are shown in Table 2. Specific growth rates in conditions of monoculture do not statistically differ (Table 2). Similar results were obtained in the study of Lüring and collaborators (2013) using eight cyanobacteria species and eight chlorophyte species at six different temperatures (20–35 °C). They do not reported significant differences between mean growth rates of cyanobacteria and chlorophytes in the range of evaluated temperatures. Although the growth rates of species observed in this study were similar the highest growth rates were recorded for *M. novacek* and *M. panniformis*, while for *M. protocystis* was observed lowest growth rates in comparison to others *Microcystis* (Table 2). Wilson et al. (2006) studying growth rates for 32 *M. aeruginosa* genotypes isolated from 12 lakes in the lower peninsula of Michigan recorded growth rates ranged from 0.17 to 0.46 day⁻¹. Those results tended to be a bit lower than the rates recorded in our study in relation to *M. aeruginosa* and the others *Microcystis* tested (0.50 to 0.64 day⁻¹). Lower growth rates, in relation to our results, also were found in the study by Gomes et al. (2015) studying the effect of temperature (18 and 30 °C) on growth of *M. aeruginosa* (0.3 to 0.4 day⁻¹).

It is known that cyanobacteria has higher growth rates compared to other algae (Quintana et al., 2011), specially *M. aeruginosa* (Gomes et al., 2015). However, the

growth rates can vary greatly in relation the species and the different growth conditions imposed upon it. In this study, most of the growth rates recorded of the *Microcystis* was higher than the microalgae *C. vulgaris* and *K. obesa* (Table 2). Those results disagree with the observations found by Lürling and collaborators (2013). In that study, the microalgae growth rates, at their optimum temperature, were significantly higher than cyanobacteria growth rates.

Table 2: Specific growth rates (day), maximum biomass (mg/L), maximum productivity (mg/L/day), and lipid content (% dwt) of *Microcystis* and microalgae in monoculture conditions.

Monoculture	Specific growth rate (days)	Maximum biomass concentration (mg/L).	Biomass productivity (mg/L/ day)	Lipid content (% dwt)
<i>M. panniformis</i>	0.60 ± 0.01 ^a	447.7 ± 25.2 ^b	31.1 ± 1.7 ^{bc}	29.0 ± 2.9 ^b
<i>M. viridis</i>	0.54 ± 0.01 ^a	377.9 ± 50.1 ^{bc}	24.4 ± 3.7 ^{bc}	23.0 ± 0.1 ^{bc}
<i>M. aeruginosa</i>	0.58 ± 0.20 ^a	441.1 ± 55.9 ^b	28.2 ± 6.7 ^{bc}	18.5 ± 0.8 ^{bc}
<i>M. novacekii</i>	0.64 ± 0.10 ^a	357.5 ± 32.3 ^{bc}	23.9 ± 2.3 ^c	26.4 ± 3.5 ^b
<i>M. protocystis</i>	0.50 ± 0.10 ^a	646.3 ± 41.4 ^a	44.2 ± 3.0 ^a	42.9 ± 2.1 ^a
<i>K. obesa</i>	0.53 ± 0.003 ^a	250.9 ± 13.4 ^c	17.6 ± 0.9 ^d	22.2 ± 1.8 ^{bc}
<i>C. vulgaris</i>	0.42 ± 0.02 ^a	401.0 ± 2.83 ^b	27.4 ± 0.2 ^{bc}	14.3 ± 5.7 ^c
All together	0.68 ± 0.002 ^a	442.7 ± 40.0 ^b	34.5 ± 3.6 ^b	23.0 ± 2.3 ^{bc}

*Significant differences among the species are indicated by different letters (ANOVA One-Way with post hoc Tukey's LSD, p<0.05).

In co-culture conditions the specific growth rates not statistically differ (Table 3). Collectively, growth the pattern of the species in co-culture was slightly increased than the species in monoculture condition (Table 2 and 3). Furthermore, we can observe that when all species were grown together was recorded an increase in cell growth rate compared to monoculture (Table 2). For *Microcystis* species, co-culture conditions were favored for the absence of *M. novacekii* and *M. protocystis* (Table 3). The same condition was observed when the microalgae *K. obesa* and *C. vulgaris* were removed of co-culture conditions (0.64 day⁻¹ and 0.63 day⁻¹, respectively) (Table 3). Those

results suggest two possibilities: first, the presence of others species in the medium culture did not interfered in the growth rates, second: the presence or absence of any species can have stimulated the growth of one or more species that dominated in the medium culture. As the main aim of this study was not to evaluate the competition among species these possibilities have not been confirmed, but on personal observations we observe highest presence of *Microcystis* in relation to microalgae in the co-culture.

Table 3. Specific growth rates (day), maximum biomass (mg/L), maximum productivity (mg/L/day), and lipid content (% dwt) of *Microcystis* and microalgae in co-culture conditions.

Treatment	Cyanobacteria					Microalgae		Parameters			
	<i>M. panniformis</i>	<i>M. viridis</i>	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. novacekii</i>	<i>M. protocystis</i>	<i>K. obesa</i>	<i>C. vulgaris</i>	Specific growth rate (days)	Maximum biomass (mg/L)	Biomass productivity (mg/L/ day)	Lipid content (% dwt)
1	+	+	+	+	+	+	+	0.68 ± 0.002	442.7 ± 40.0	34.5 ± 3.6	23.0 ± 2.3 ^d
2	-	+	+	+	+	+	+	0.58 ± 0.049	398.0 ± 47.7	31.0 ± 6.4	37.7 ± 6.1 ^{bc}
3	+	-	+	+	+	+	+	0.53 ± 0.088	438.0 ± 32.1	34.1 ± 2.6	39.9 ± 3.0 ^{bc}
4	+	+	-	+	+	+	+	0.57 ± 0.015	465.3 ± 28.0	35.4 ± 3.1	35.3 ± 2.0 ^{bc}
5	+	+	+	-	+	+	+	0.63 ± 0.028	392.8 ± 89.7	28.6 ± 3.2	44.5 ± 3.3 ^{ab}
6	+	+	+	+	-	+	+	0.63 ± 0.059	448.2 ± 66.2	32.2 ± 3.5	47.6 ± 0.5 ^a
7	+	+	+	+	+	-	+	0.64 ± 0.056	402.5 ± 27.6	30.9 ± 5.6	34.6 ± 1.0 ^c
8	+	+	+	+	+	+	-	0.63 ± 0.080	449.0 ± 54.0	33.5 ± 4.0	28.6 ± 3.1 ^{cd}
<i>P</i>								0.435	0.567	0.074	0.00004*

*Significant differences among the species are indicated by different letters (ANOVA One-Way with post hoc Tukey's LSD, p<0.05).

3.2. Biomass and productivity in mono- and co-culture conditions

Maximum biomass yield and productivity in mono-culture condition are shown in Table 2. The highest biomass accumulation in mono-culture was obtained for *M. protocystis* (646.3 mg/L), *M. panniformis* (447.7 mg/l) and *M. aeruginosa* (441.1 mg/L). While, co-culture conditions produced highest biomass accumulation in the absence of *M. aeruginosa* (465.3 mg/L), *M. protocystis* (448.2 mg/L), and *M. viridis* (438 mg/L) and of the microalgae *C. vulgaris* (449 mg/L) and *K. obesa* (402.5 mg/L) (Table 3). Besides, when all the species were cultivated together the maximum biomass recorded was 427.9 mg/L. We expected that when all species were grown together there was an increase in biomass, but this was not observed possibly due to interaction among the species. On the other hand, it has not registered a loss of biomass in relation to monocultures and co-cultures, in which the maximum biomass values were similar.

Co-culture conditions resulted in higher yields of productivity than that recorded from mono-culture condition. Mono-culture of *M. protocystis* had highest biomass productivity in comparison to two types of culture conditions. The higher biomass accumulation recorded in co-cultures indicates this condition had a higher productivity than the mono-cultures. However, the increase in biomass concentration was not related to the presence of species that have higher productivity in mono-culture. In fact, the absence of these species was responsible for the increased accumulation of biomass under conditions of co-culture, especially in the absence *M. aeruginosa*, *C. vulgaris* and *M. protocystis*. Therefore, we can infer the absence of one of these species in co-culture can stimulate the growth of other species of higher productivity, not necessarily of all species, and thus stimulate the dominance in this condition.

3.3. Lipid Content

Total lipid content in mono- and co-culture conditions is shown in Table 2 and 3. Lipid content for *Microcystis* and microalgae in co-culture condition was higher (23 to 47.6 %) than those in mono-culture condition (14.3 to 42.9 %). In these, *Microcystis* obtained higher lipid content (18.5 to 42.9 %) than *K. obesa* (22.2 %) and *C. vulgaris* (14.3 %) (Table 2). The absence of microalgae in co-culture condition not affected the lipid accumulation although it was observed a slight decrease in the total lipid content.

Microalgae are well known as producers of oils, particularly *Chlorella*. *C. vulgaris* has been reported as an important source for lipid, in which the content lipid ranges to 3% to 25% (Dos Santos et al. 2015; Hussain et al. 2015). In this study, the lipid content recorded for *C. vulgaris* was according to found by authors above. However, the variation in the amount of lipids is influenced by several factors, such as the method of extraction of lipids and the nutrition.

In this study, it was showed *Microcystis* had higher lipid content than the microalgae in mono-culture. Currently, several studies have demonstrated the productive potential of lipids by cyanobacteria. In these studies, lipid content accumulation by cyanobacteria can range from 7 to 45 % (Karatay and Dönmez, 2011; Sharathchandra and Rajashekhar, 2011; Ashokkumar et al., 2014). However, these recorded values were influenced by the species, by nutritional conditions and by the lipid extraction methods used. Besides to increasing biomass productivity, co-culture conditions of microalgae and cyanobacteria significantly increased the lipid content in comparison with mono-culture conditions. These results are in agreement with Zhao et al. (2014) who reported that co-cultures can help to increase biomass productivity and lipid content making most efficient for biodiesel production. However, comparison can be made with the literature about these results because there is little information available using

cyanobacteria and microalgae on co-cultures to increase biomass and lipid content are focused in the use of two species, basically microalgae and bacteria/yeast.

3.4. Fatty acid composition analysis in mono- and co-culture conditions

Fatty acid composition in mono- and co-culture conditions is shown in Table 4. In mono-culture condition, the majority of the FAs present in the five *Microcystis* species studied were saturated (42.8 to 47.5 %) with a higher proportion of palmitic acid (C16:0), followed by monounsaturated (24.7 to 36.6 %) with the predominance of the cis-10-heptadecenoic acid (17:1) and oleic acid (C18:1) and also by polyunsaturated (4.4 to 9.0 %) with the presence of linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3) acids. For *K. obesa* was recorded 35 % of saturated (30.4 % of C16:0) and 30 % of monounsaturated (28.5 % of C18:1) and 35 % of polyunsaturated (13.1 % of C18:3, 12.3 % of cis-11,14-eicosadienoic (C22:2) and 9.7 % of C18:2). The lipid from *C. vulgaris* presented mainly polyunsaturated (64.4 %), predominating C18:2 (33.1 %) and C18:3 (31.7 %), and saturated (21.9 %) with a higher proportion of C16:0 acid (19.8%) and monounsaturated (12.1 %) with the predominance of the C18:1 acid (8.3 %).

Table 4. Fatty acid profiles of the mono- and co-culture conditions.

Methyl esters	Fatty acid profile (% wt)														
	Co-culture										Mono-culture				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Lauric (C12:0)	0.5	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-	1.0	1.3	1.4	0.7	-	-
Myristic (C14:0)	1.4	1.2	1.7	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5	1.8	1.7	2.0	1.5	1.5	1.9	1.9
Pentadecanoic (C15:0)	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	-	-
Palmitic (C16:0)	24.1	25.8	28.5	23.5	26.1	28.6	31.8	28.8	35.5	34.5	33.3	34.1	35.1	28.5	19.8
Palmitoleic (C16:1)	0.5	0.4	0.3	0.3	1.2	0.3	0.2	-	0.7	1.8	0.7	1.4	4.3	0.3	4.2
Heptadecanoic (C17:0)	4.1	1.7	1.7	3.5	2.6	2.4	3.0	3.9	2.6	2.2	1.9	1.7	2.8	-	-
cis-10-Heptadecenoic (C17:1)	19.1	25.5	19.9	11.8	25.8	15.3	13.3	13.2	19.1	16.9	22.3	9.6	16.4	-	-
Stearic (C18:0)	0.6	0.1	7.1	6.7	0.1	0.1	0.1	0.1	2.8	4.0	3.7	5.4	4.3	2.4	-
Octadecenoic (C18:1)	21.7	18.5	12.0	13.8	19.9	21.8	22.4	20.2	11.2	12.9	12.4	13.3	14.9	30.4	8.3
Linoleic (C18:2n6c)	9.0	6.3	6.2	7.2	5.6	4.9	5.2	6.9	4.4	3.7	3.1	3.1	4.3	9.7	33.1
Linolenic (C18:3n3)	2.7	3.7	3.1	2.0	1.4	1.7	0.9	2.1	2.3	1.4	0.5	1.6	1.3	13.1	32.7
Arachidic (C20:0)	4.6	2.2	1.8	1.6	1.0	1.4	1.0	1.3	2.7	0.8	-	0.3	0.2	-	-
cis-11-Eicosenoic (C20:1)	0.6	0.5	0.4	0.5	0.6	0.4	0.4	0.8	1.0	0.5	0.5	0.2	0.3	-	-
cis-11,14-Eicosadienoic (C20:2)	0.5		1.7	0.4	0.2	0.1	-	-	0.2	0.4	0.4	0.5	0.5	-	-
Saturated (% dwt)	36.8 ± 1.8	33.7 ± 1.3	39.2 ± 3.7	37.3 ± 4.1	32.5 ± 2.5	35.5 ± 3.0	39.1 ± 4.3	38.7 ± 4.1	47.5 ± 0.7	44.0 ± 1.4	42.8 ± 0.3	44.7 ± 0.9	44.7 ± 0.4	35.0 ± 0.7	21.9 ± 0.2
Monounsaturated (% dwt)	41.7 ± 1.6	40.1 ± 6.8	32.4 ± 3.5	31.3 ± 11.6	46.8 ± 3.5	37.7 ± 1.6	36.2 ± 2.7	28.2 ± 8.7	32.5 ± 0.7	32.0 ± 0.1	35.3 ± 0.8	24.7 ± 0.4	36.6 ± 0.9	30.0 ± 0.9	12.1 ± 0.5
Polyunsaturated (% dwt)	12.6 ± 1.6	10.1 ± 5.7	13.2 ± 3.3	10.7 ± 0.6	9.7 ± 2.8	8.4 ± 0.9	7.2 ± 1.6	8.6 ± 2.1	7.9 ± 1.4	6.2 ± 0.5	4.4 ± 0.2	5.9 ± 0.2	9.0 ± 0.2	35.0 ± 0.1	64.4 ± 2.0
N.I. (% dwt)	7.2 ± 1.5	16.1 ± 11.1	15.2 ± 3.9	20.7 ± 11.9	11 ± 3.8	18.4 ± 3.7	17.5 ± 5.4	27.1 ± 10.5	12.1 ± 2.8	17.8 ± 2.1	17.4 ± 0.7	24.7 ± 0.4	9.7 ± 0.7	-	1.6 ± 2.3

1- All together, 2- All together without *M. panniformis*, 3- All together without *M. viridis*, 4- All together without *M. aeruginosa*, 5- All together without *M. novacekii*, 6- All together without *M. protocystis*, 7- All together without *K. obesa*, 8- All together without *C. vulgaris*, 9- *M. panniformis*, 10- *M. viridis*, 11- *M. aeruginosa*, 12- *M. novacekii*, 13- *M. protocystis*, 14- *K. obesa*, 15- *C. vulgaris*.

N.I.- not identified; (-) not detected.

In co-culture condition with the presence of microalgae predominated monounsaturated acids ranging from 37.7 % to 46.8 %, saturated fatty acids ranging from 32.5 to 36.8 % and polyunsaturated fatty acids from 8.4 % to 13.2 %. However, only for the co-culture without *M. panniformis* and *M. viridis* it was recorded higher proportion of saturated acids (37.7 and 39.2 %, respectively) followed by monounsaturated acids ones (31.3 % and 32.4 %, respectively). Among these the major fatty acids were palmitic acid (C16:0= 23.6 to 28.6 %), cis-10-heptadecenoic acid (C17:1= 11.8 to 25.8 %) and oleic acid (C18:1= 12 to 21.8 %). The predominant polyunsaturated fatty acids obtained were linoleic (C18:2), linolenic (C18:3) and cis-11,14-eicosadienoic (C22:2) in lower proportion (upto 17 %). Similar profile was obtained in the absence of *K. obesa* and *C. vulgaris* in co-culture. In these, most of the acids was saturated fatty acids (39.1 % and 38.7 %, respectively), followed by monounsaturated fatty acids (36.2 % and 28.2 %, respectively) and polyunsaturated fatty acids (7.2 % and 8.6 %, respectively). Palmitic acid was recorded in a higher proportion (31.8 and 28.8 %), followed by oleic (22.4 and 20.2 %) and cis-10-heptadecenoic acid (13.3 and 13.2 %), respectively.

Most fatty acids present in the *Microcystis* culture were saturated and monosaturated ones. Similar result was published by Sharathchandra and Rajashekhar (2011) after examining 13 species of freshwater cyanobacteria, by Da Rós et al. (2013) and by Ashokkumar et al. (2014) analyzing the fatty acid composition in *M. aeruginosa*. Lipid produced by *K. obesa* had a balanced proportion of acids saturated, monounsaturated, and polyunsaturated. Similar result was found by Song et al. (2013) evaluating the fatty acid profile of *K. lunaris*. In the same study it was also evaluated the composition of fatty acids of *C. vulgaris*. The authors observed the highest proportion of fatty acids saturated and polyunsaturated in the oil. Unlike, in this study it was observed the

highest proportion of fatty acids polyunsaturated (~65 %). This result corroborates the finding of related study by Dos Santos et al. (2015) for the oil extracted of *C. vulgaris* which contained the highest percentage of unsaturated fatty acids. Additionally, these authors conclude that fatty acid can change depending of culture condition and species tested which can also influence and explain the different results found in the literature. According to Talebi et al. (2013) three criteria should be taken into account to select species for biodiesel production: the natural potential of the microalgae or cyanobacteria, culture condition and lipid extraction method that can change the degree of saturation and unsaturation of fatty acids modifying the quality of the produced biodiesel

3.5. Properties of biodiesel from mono- and co-culture conditions

The quality of the biodiesel is basically determined by the composition of fatty acids present in the biomass (Talebi et al., 2013). Additionally, fatty acids are primarily dependent on oil nature and the culture conditions (Ramos et al., 2009). Moreover, the most important attributes that influenced the quality of biodiesel are the length of the carbon chain and the number of double bonds (Da Rós et al., 2013). Therefore, fatty acid profile from cyanobacteria and microalgae can influence some properties as cetane number (CN), iodine value (IV), oxidative stability, degree of unsaturation (DU), and cold filter plugging point (CFPP). Some of these properties are regulated by standards. Therefore, introduction and commercialization of biodiesel from microalgae and cyanobacteria will need to comply with those standards (Da Rós et al., 2013).

The degree of unsaturation (DU) from oil of the mono- and co-culture conditions is shown in Table 5. The degree of unsaturation of oil extracted from microalgae (100.1 % for *K. obsesa* and 140.9 % for *C. vulgaris*) in mono-culture was significantly higher than DU from *Microcystis* (36.5 % to 54.7 %) in the same condition ($p=0.000$). In co-

culture condition the recorded values of DU did not differ significantly. However, we observed there was an increase in the degree of unsaturation in this condition (52.7 % to 67 %) as compared with that in mono-culture conditions for *Microcystis*. The absence of the microalgae in co-culture condition resulted in a decreasing in the values of DU values (50.6 % without *K. obesa* and 45.6 % without *C. vulgaris*). These values are similar to the mono-culture of *Microcystis*.

Table 5. Degree of unsaturation (DU), Long-chain saturated factor (LCSF) and cold filter plugging point (CFPP) from mono- and co-culture conditions.

Culture	Treatment	DU (% dwt)	LCSF (% dwt)	CFPP (°C)
Mono-culture	<i>M. panniformis</i>	48.3 ± 3.5	8.7 ± 0.4	10.9 ± 1.2
	<i>M. viridis</i>	44.3 ± 1.2	6.6 ± 0.2	4.3 ± 0.5
	<i>M. aeruginosa</i>	44.2 ± 1.2	5.3 ± 0.2	-0.3 ± 0.8
	<i>M. novacekii</i>	36.5 ± 0.7	7.2 ± 0.3	6.9 ± 0.9
	<i>M. protocystis</i>	54.7 ± 1.3	5.7 ± 0.2	1.5 ± 0.6
	<i>K. obesa</i>	100.1 ± 1.2	6.8 ± 0.1	4.8 ± 0.3
	<i>C. vulgaris</i>	140.9 ± 4.6	2.2 ± 0.4	-9.4 ± 1.2
	All together	67.0 ± 4.5	6.5 ± 2.7	8.8 ± 0.3
Co-culture	All together without <i>M. panniformis</i>	60.4 ± 18.1	6.1 ± 1.0	2.7 ± 3.1
	All together without <i>M. viridis</i>	58.8 ± 3.3	13.2 ± 4.2	7.1 ± 1.6
	All together without <i>M. aeruginosa</i>	52.7 ± 12.6	7.3 ± 0.3	6.5 ± 1.0
	All together without <i>M. novacekii</i>	66.3 ± 9.0	3.9 ± 0.01	-4.3 ± 0.04
	All together without <i>M. protocystis</i>	54.5 ± 0.2	4.7 ± 1.0	-1.9 ± 3.2
	All together without <i>K. obesa</i>	50.6 ± 0.6	4.6 ± 0.5	-2.0 ± 1.6
	All together without <i>C. vulgaris</i>	45.6 ± 13.0	4.2 ± 0.01	-3.4 ± 0.01

For all *Microcystis* species DU was lower due to low percentage of polyunsaturated fatty acid, especially linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3) acids. This results suggesting the oil obtained should have higher cetane number (shorter ignition delay). From the composition of fatty acids *M. aeruginosa* in the study developed by Da Rós et al. (2013) and Ashokkumar et al. (2014) it was possible to obtain a degree of unsaturation of oils by the equation of Ramos et al (2009). Thus, in both studies the degree of unsaturation was similar to DU range found in the present study (60.7 and 48.15%, respectively). According to Ramos et al. (2009) a higher degree of unsaturation than 137 makes oils did not attend the European Standard for the cetane number.

Therefore, the oils obtained for *Microcystis* meets this standard in the category CN. The presence of *K. obsesa* and *C. vulgaris* in co-culture increased the degree of unsaturated in the oils obtained. These results indicate that the co-culture with microalgae could balance the fatty acids composition by increasing the concentration of polyunsaturated acids.

Degree of unsaturation is also useful to measure the iodine value (IV) present in the oils. According to Ramos et al. (2009) the iodine value is a measure of total unsaturation of a fatty material and it is linearly correlated with the concentration of unsaturated in the oils. The concentration of unsaturated acids in the oil can be limited because the higher the carbon chain length, the higher the IV and the higher is the density and viscosity of the biodiesel. Hence, higher the possibility of oxidation, deposits formation and deterioration of the biodiesel lubricity (Ramos et al., 2009; Nascimento et al., 2013). Therefore, lower percentage the DU recorded in this study suggests IV lower with higher oxidative stability.

Long-chain saturated factor (LCSF) is an important parameter used to determine the cold filter plugging point (CFPP). CFPP is usually used for the prediction of the flow performance of biodiesel at low temperatures (Francisco et al., 2010). LCSF and CFPP from oil of the mono- and co-culture conditions are shown in Table 5. In mono-culture condition the highest values of LCSF was recorded with *M. panniformis* (8.7 %), *M. novacekii* (7.2 %), *K. obesa* (6.8 %) and *M. viridis* (6.6 %) that had the poorest result of CFPP (10.9 °C, 6.9 °C, 4.8 °C and 4.3 °C, respectively). Whereas, oil from *C. vulgaris* (2.2 % of LCSF), *M. aeruginosa* (5.3 % of LCSF), and *M. protocystis* (5.7 % of LCSF) had the better result of CFPP (-9.4 °C, -0.3 °C and 1.5 °C, respectively). Co-culture condition had better results for LCSF and CFPP in the absence of *M. novacekii* (3.9 % and -4.3 °C, respectively), *M. protocystis* (4.7 % and -1,9 °C, respectively), *C. vulgaris*

(4.2 % and -3.4 °C, respectively), *K. obesa* (4.6 % and -2.0 °C, respectively), and *M. panniformis* (6.1 % and 2.7 °C, respectively). When greater amount of saturated fatty acids, typically the stearic and palmitic acid, are present in the oils (expressed by high LCSF) the worse will be its quality at low temperatures (Da Rós et al., 2013). *C. vulgaris*, *M. aeruginosa* and *M. protocystis* have the lowest LCSF. Hence, these species had low-temperature properties. Each country can specify certain temperature limits for different times of year based on national meteorological data. The values found are complying with the limits established by Brazilian National Petroleum Agency Standard (ANP Resolution N° 45/2014) in the maximum of 19 °C. According to the study of Da Rós et al. (2013) the CFPP values for five cyanobacteria species ranged 4 to 5.7 °C. These results are higher than most of the *Microcystis* tested in this study. In co-culture conditions the decrease of values of stearic acid (C16:0) contributed for the lower temperatures of CFPP. Similar results were published on soybean and sunflower biodiesel (-5 and -3 °C, respectively) (Ramos et al., 2009). Among microalgae species it was reported CFPP -12.3 °C to 20.8 °C (Francisco et al., 2010) and -9.7 °C to 12.4 °C (Talebi et al., 2013).

Not all cyanobacteria and microalgae in mono- and co-culture conditions tested in this study had oils satisfactory for making biodiesel. In this study it was showed that some cyanobacteria in co-culture with microalgae can contribute to enhancing the biomass productivity, lipid content, and fatty acids profile. Although the exact mechanism of the interaction between microalgae and cyanobacteria is currently unknown, the benefits this strategy brings could potentially be exploited for a sustained biomass and cost-effective production for biodiesel industry (Bai et al., 2014).

4. Conclusion

The new approach the co-culture emerged to resolve the contradiction between biomass productivity and lipid content to attain significantly higher lipid productivity (Zhao et al., 2014). In this study, the co-culture strategy *Microcystis* and microalgae species resulted in significant increase on biomass concentration, productivity and lipid content, although this resulted was not observed in all the co-cultures tested. Furthermore, the oil obtained in co-culture conditions is in agreement with the quality standards for biodiesel, thus rendering a feasible alternative to enhance the biodiesel production by cyanobacteria and microalgae. However, it is necessary to perform all the tests to prove the biodiesel quality according to established standards, once the properties of the biodiesel in this study were empirically estimated.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Processo 471757/2013-6) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG- Processo APQ 01389-13) for the financial support and scholarship.

References

- [1] Ashokkumar V., Agila E., Salam, Z., Ponraj, M., Din, M.F.M., Ani, F.N., 2014. A study on large scale cultivation of *Microcystis aeruginosa* under open raceway pond at semi-continuous mode for biodiesel production. *Bioresource Technol.* 172, 186-193.
- [2] Bai, R., Gutierrez-Wing, M.T., Negulescu, I.I., Rusch, K.A., 2014. Effect of organic carbon, C: N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. *Eng. Life Sci.* 14, 47-56.
- [3] Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 26, 483-489.
- [4] Cai, S., Hu, C., Du, S., 2007. Comparisons of growth and biochemical composition between mixed culture of alga and yeast and monocultures. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 391-397.

- [5] Chisti Y, 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
- [6] Da Rós, P.C.M., Silva, C.S.P., Silva-Stenico, M.E., Fiore, M.F., De Castro, H.F., 2013. Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. *Mar Drugs* 11, 2365-2381.
- [7] Dos Santos, R.R., Moreira, D.M., Kunigami, C.N., Aranda, D.A.G., Teixeira, C.M.L.L., 2015. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrason. Sonochem.* 22, 95-99.
- [8] Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E., Franco, T.T., 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 395-403.
- [9] Goers, L., Freemont, P., Polizzi, K.M., 2014. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J. R. Soc. Interface.* 11, 20140065.
- [10] Gomes, A.M.D.A., Lüring, M., 2015. Temperature effect on exploitation and interference competition among *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* and *Cyclotella meneghiniana*. *Sci. World. J.* 2015, 1-10.
- [11] Hussain, J., Liu, Y., Lopes, W.A., Druzian, J.I., Souza, C.O., Carvalho, G.C., Nascimento, I.A., Liao, W., 2015. Effects of different biomass drying and lipid extraction methods on algal lipid yield, fatty acid profile, and biodiesel quality. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 3048-3057.
- [12] Karatay, S.E., Dönmez, G., 2011. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Appl. Energy* 88, 3632-3635.
- [13] Lüring, M., Eshetu, F., Faassen, E.J., Kosten, S., Huszar, V. L., 2013. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biol.* 58, 552-559.
- [14] Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ Rev.* 14, 217–232.
- [15] Mubarak, M., Shaija, A., Suchithra, T.V., 2015. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Res.* 7, 117-123.
- [16] Nascimento, I.A., Marques, S.S.I., Cabanelas, I.T.D., Pereira, S.A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., Vich, D.V., Carvalho, G.C.C, Nascimento, M.A., 2013. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenerg. Res.* 6, 1-13.
- [17] Oncel, S.S., Imamoglu, E., Gunerken, E., Sukan, F.V., 2011. Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 86, 414-420.

- [18] Parmar, A., Kumar Singh, N., Pandey, Ashok, Gnansounou, E., Madamwar, D., 2011. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour. Technol.* 102, 10163–10172.
- [19] Quintana, N., Van der Kooy, F., Van de Rhee, M. D., Voshol, G. P., Verpoorte, R., 2011. Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 471-490.
- [20] Ramos, M.J., Fernández, C.M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, Á., 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour. Technol.* 100, 261–268.
- [21] RESOLUÇÃO ANP N° 14, DE 11.5.2012-DOU 18.5.2012. Available online: http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml (accessed on 20 November 2015).
- [22] Sarsekeyeva F., Zayadan, B.K., Usserbaeva, A., Bedbenov, V.S., Sinetova, M.A., Los D.A., 2015. Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. reality and perspectives. *Photosynth. Res.* 125, 329-340.
- [23] Sharathchandra, K., Rajashekhar, M., 2011. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. *J. Algal Biomass Utln.* 2, 83-97.
- [24] Silva-Benavides, A.M., Torzillo, G., 2012. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Appl. Phycol.* 24, 267–276.
- [25] Singh, S., Kate, B.N., Banerjee, U.C., 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 73-95.
- [26] Song, M., Pei, H., Hu, W., Ma, G., 2013. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 141, 245-251.
- [27] Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2011. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnol. Adv.* 29, 896-907.
- [28] Talebi, A.F., Mohtashami, S.K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H.H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S.M., Bakhtiari, S., 2013. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Res.* 2, 258-267.
- [29] Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H., 2013. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour. Technol.* 135, 142-149.
- [30] Wahlen, B.D., Willis, R.M., Seefeldt, L.C., 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresour. Technol.* 102, 2724-2730.

- [31] Wang, Y., Yang, Y., Ma, F., Xuan, L., Xu, Y., Huo, H., Dong, S., 2015. Optimization of *Chlorella vulgaris* and bioflocculant-producing bacteria co-culture: enhancing microalgae harvesting and lipid content. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 497-503.
- [32] Wilson, A.E., Wilson, W.A., Hay, M.E., 2006. Intraspecific variation in growth and morphology of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7386-7389.
- [33] Yen, H.W., Chen, P.W., Chen, L.J., 2015. The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast-*Rhodotorula glutinis* and microalgae-*Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation *Bioresour. Technol.* 184, 148-152.
- [34] Zhang, Z., Ji, H., Gong, G., Zhang, X., Tan, T., 2014. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. *Bioresour. Technol.* 164, 93-99.
- [35] Zhao, P., Yu, X., Li, J., Tang, X., Huang, Z., 2014. Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10. *J. Biosci. Bioeng.* 118, 72-77.

**Manuscrito 3- Two-stage cultivation of *Microcystis*: a strategy to enhance
biodiesel production**

Manuscrito formatado para publicação no periódico: Journal of Applied Phycology

Two-stage cultivation of *Microcystis*: a strategy to enhance biodiesel production

Raquel da Silva Cordeiro^a, Sérgia Maria Starling Magalhães^b, Vânia M. D. Pasa^c,
Francisco Antônio Rodrigues Barbosa^d

^aLaboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – Av. Antônio Carlos, 6627 – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31270.901

^bLaboratório de Água - Departamento de Farmácia Social - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais– Universidade Federal de Minas Gerais – Av. Antônio Carlos, 6627 – Box 1052– Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31270.901

^cFuel Laboratory, Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais – Av. Antônio Carlos, 6627 – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31270.901

*Corresponding author: Raquel Cordeiro - Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – Av. Antonio Carlos, 6627 – Box 486 – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 31270-901. e-mail: raqquel.cordeiro@gmail.com

Abstract

Aiming at to increase biomass production and then the lipid content in this study we report the two-stage strategy for four *Microcystis* species and biodiesel production. In stage I, these species were cultivated in ASM-1 medium with nitrogen-replete for the biomass production and then were transferred to a nitrogen-free ASM-1 medium (stage II) to the accumulation of lipids. Biomass, biomass productivity, lipid content and fatty acid composition were investigated. *M. protocystis* showed highest biomass concentration (0.89 ± 0.06 g/L) and biomass productivity (98.5 ± 6.3), while other species had very similar performance in the stage I. In the stage II was recorded for all species a decreasing in biomass by half. Lipid content increased significantly with change of stage I to stage II ($P=0.000$). In the stage II, the lipid content increased 1.4-fold for *M. aeruginosa* and *M. novacekii*, 1.3-fold for *M. protocystis*, and *M. panniformis* was recorded an increased 1.2-fold. The two-stage strategy not significantly affected the lipid profiles of species. The oil obtained from *Microcystis* had low degree of unsaturation values. The biodiesel from *Microcystis* can exhibited good flow performance at low temperatures due to low LCSF values. The fatty acid content obtained for all *Microcystis* species in both processes of cultivation was compatible with biodiesel quality standards suggesting that all tested species can be promising sources of feedstock for biodiesel production and that using two-stage process can be an effective strategy to increase the lipid content for biodiesel production.

Keywords: cyanobacteria, biomass productivity, lipid content, biofuel quality

1. Introduction

In recent years cyanobacteria have been investigated as potential feedstock for biodiesel production due to their several advantages, such as higher levels of photosynthesis and growth rates compared to microalgae and plants, efficient fixation of carbon dioxide, and low nutritional requirements. Furthermore, due to their large plasticity metabolism they can be easily handled to drive accumulation of lipids (Quintana et al. 2011; Machado and Atsumi 2012; Erdrich et al. 2014; Sarsekeyeva et al. 2015).

Cyanobacteria are commonly known to promote blooms in aquatic ecosystems worldwide and particularly the Genus *Microcystis* is one of the major players in many of these blooms. Moreover, *Microcystis* blooms pose a serious threat to ecological conditions and public health (Zhang et al. 2007; Harel et al. 2013; Zheng et al. 2015). Today, there is no efficient method to treat or control cyanobacteria blooms but one possibility to solve this problems has been proposed to use this biomass as feedstock to produce biofuels, what besides provide benefits to the environment also provides a way of resolving the potential conflict between the use of land for food or biofuel production (Zheng et al. 2015, Ashokkumar et al. 2014).

Under favorable growth condition, cyanobacteria cells with higher growth rates (high biomass) are often accompanied by low lipid content, while high lipid content are usually obtained under stress conditions, typically by nutrient limitation but with the lowest biomass (Adams et al. 2013). However, an excellent process of obtaining oil for biodiesel production should be able to produce high biomass productivity with the highest lipid content (Li et al. 2014). In order to achieve this condition several researchers are proposing the use of a two-stage cultivation strategy in order to enhance cell growth as well as lipid content (e.g. Rodolfi et al. 2009; Xia et al. 2013; Ra et al.

2015). In the first stage, the microorganisms are grown under nutrient-sufficient conditions to obtain maximum biomass production and then this biomass is transferred to a nutrient-starvation condition or other physiological stress stage to stimulate the accumulation of lipids (second stage) (Mujtaba et al. 2012; Griffiths et al. 2014).

Recently, it has been reported in the literature the potential of the strategy of using two-stage cultivation for achieving high cell density and high lipid content by nitrogen-starvation (e.g. Mujtaba et al. 2012; Zhang et al 2014; Yoon et al. 2015). However, most of the above reported approaches have been focused in microalgae while little is known about the performance of Cyanobacteria, especially *Microcystis* spp.

The major object of this study was to produce high biomass in nitrogen-replete condition (first stage) and highest oil accumulation in nitrogen-free condition (second stage) using four species of cyanobacteria, namely *M. panniformis*, *M. aeruginosa*, *M. novacekii* and *M. protocystis*. Complementally we want to evaluate the potential of these *Microcystis* species as feedstock for the synthesis of biodiesel through fatty acid compositions and biodiesel properties.

2. Materials and methods

2.1 Microcystis

Microcystis panniformis J. Komárek, J. Komárková-Legnerová, C. L. Sant'Anna, M. P. Azevedo, & P. A. C. Senna, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, *Microcystis novacekii* (Komárek) Compère and *Microcystis protocystis* Crow were obtained of Laboratory of Limnology, aquatic ecology and ecotoxicology of the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Minas Gerais- Brazil. These species were collected, identified and isolated from natural lakes of the Rio Doce State Park in the southeast of Brazil.

2.2 *Microcystis* cultivation

For biomass production, *Microcystis* were cultured in 250 mL flasks containing 150 mL of the ASM-1 medium with nitrogen-replete (Gorham et al. 1964). An equal concentration of 3.5×10^5 cells ml^{-1} was used as inoculum. The cultures were maintained at $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ under constant light (provided by cool white fluorescent lamps $40 \text{ W} / 32 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and shaking at 122 rpm for nine days (Stage I). Cultures grown were used as the inoculum for lipid accumulation in the stage II cultivation. At the end of stage I, cells were harvested by centrifugation at $5,000 \times g$ and $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min. The cell pellets were washed twice with distilled water. Cells were transferred to nitrogen-free ASM-1 medium, re-suspended, and maintained in the same conditions of stage I for 4 days. Experiments were performed in triplicate and repeated three times.

2.3 Analytical methods

Biomass concentration was determined by optical density measurements (OD) (UV 1700 PhamaSpec SHIMADZU) at OD_{655} (*M. panniformis*), OD_{700} (*M. aeruginosa*), OD_{680} (*M. novacekii*), and OD_{700} (*M. protocystis*). Calibration curves of OD versus dry biomass weight (DBW) were constructed for each species. Biomass concentration was determined at the end of each stage. Biomass productivity ($\text{mg} / \text{L} / \text{day}$) was determined only for stage I. The reduction in the culture time in Phase II (4 days) may affect the values for BP. Biomass productivity was calculated according to the Equation (1):

$$\text{BP} = (\Delta X / \Delta t) \quad (2)$$

Where, ΔX corresponds to the variation of the concentration of biomass (mg / L) within in time culture Δt (d).

Lipid content was obtained gravimetrically after extraction using a Soxhlet's extractor with dichloromethane reflux at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 hours. The lipid content (%) was calculated according to the Equation (2):

$$LC (\%) = (W_L/DBW) \times 100 \quad (2)$$

where W_L (mg) is the weight of the extracted lipids and DBW (mg) is the dry biomass weight.

Analysis of the fatty profile were performed in a gas Chromatograph (Shimadzu GC-2010) equipped with flame ionization detector and the capillary column SP2340 (60 m x 0.25 mm x 0.20 μ m). Temperatures from the detector and injector were 260 °C. The temperature gradient used was: 140 °C, 5 min, 4 °C to 240 °C, 19 min. Hydrogen was used as carrier gas linear velocity 20 cm/s. The injection volume was 1 μ L and split 1:50. The identification of FAME was performed using Supelco 37 Component FAME Mix (10 mg/mL- Sigma-Aldrich) as standard.

For analysis of the biodiesel property, the degree of unsaturation (DU), long chain saturated factor (LCSF), and cold filter plugging point (CFPP), were determined by empirical equations from fatty acids composition as described by Ramos et al. (2009).

2. 4. Statistical analysis

All the experiments were conducted in triplicates and data are presented as mean standard deviation (\pm SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the effect in two-stage cultivation in the four *Microcystis*. The level of significance adopted was $p < 0.05$. The results of experiments were analyzed with using STATISTICA software, version 10 (Statsoft Inc. 2011).

3. Results

Biomass concentration in the stage I and stage II

The use to a two-stage process to increase biomass (stage I) and to induce lipid accumulation (stage II) was evaluated for *Microcystis* in photoautotrophic cultivation. Growth of *Microcystis* in stage I and II are shown in Figure 1. As shown in Fig. 1,

biomass concentration of *Microcystis* in nitrogen-replete (stage I) was significantly higher than nitrogen-free (stage II) ($P=0.000$). After 9 days, *Microcystis* species were transferred for stage II. In this stage was observed for all species a decreasing in biomass. The most species tested here had biomass concentration reduced by half. While for *M. protocystis* this reduction was almost threefold highest (Table 1).

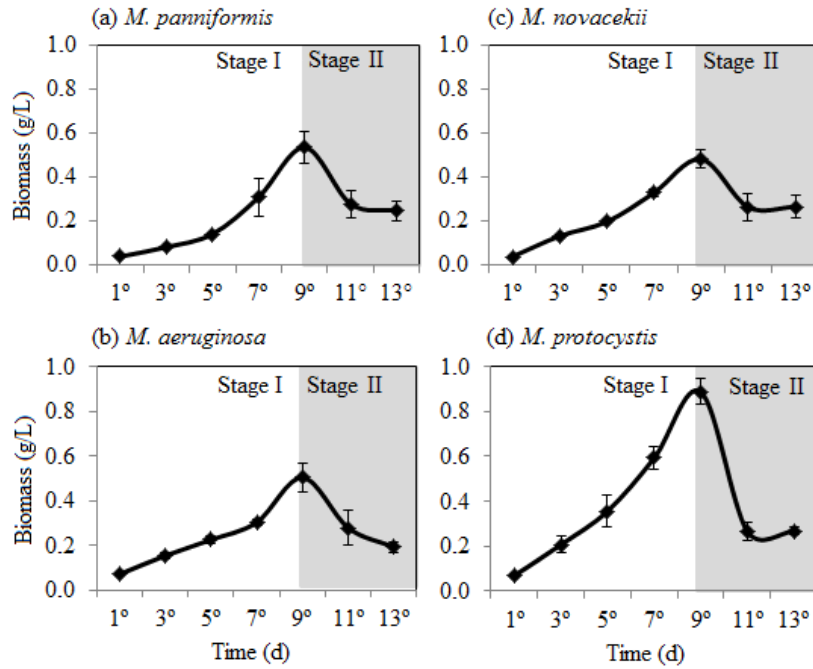


Figure 1. Growth curves of *Microcystis* in stage I and stage II of cultivation.

As summarized in Table 1, among the four *Microcystis* tested here, *M. protocystis* showed highest biomass concentration (0.89 ± 0.06 g/L) and biomass productivity (98.5 ± 6.3) in stage I. In this stage for *M. panniformis*, *M. aeruginosa*, and *M. novacekii* were obtained similar results for biomass concentration and biomass productivity (0.54, 0.50 and 0.48 g/L; 59.6, 55.9 and 53.8 mg/L/d, respectively).

Table 1: Biomass concentration, biomass productivity and lipid content of *Microcystis* in stage I and stage II of cultivation.

	<i>M. panniformis</i>		<i>M. aeruginosa</i>		<i>M. novacekii</i>		<i>M. protocystis</i>	
	Stage I	Stage II	Stage I	Stage II	Stage I	Stage II	Stage I	Stage II
Final biomass (g/L)	0.54 ± 0.07	0.28 ± 0.06	0.50 ± 0.06	0.28 ± 0.08	0.48 ± 0.04	0.27 ± 0.06	0.89 ± 0.06	0.27 ± 0.04
Biomass Productivity (mg/L/d)	59.6 ± 7.8	-	55.9 ± 7.1	-	53.8 ± 4.9	-	98.5 ± 6.3	-
Final Lipid Content (% dw)	29.1 ± 0.6	35.1 ± 3.2	22.5 ± 1.0	31.8 ± 2.3	23.3 ± 0.6	32.0 ± 0.9	33.7 ± 2.1	42.5 ± 0.3
Time (day)	9	4	9	4	9	4	9	4

Lipid content increased significantly with change of stage I to stage II ($P=0.000$). As shown in Table 1, the final lipid content in stage I was 22.5 % to 33.7 %, while in the stage II was 31.8 % to 42.5 % for all *Microcystis*. The highest lipid contents were 42.5 % for *M. protocystis* followed by *M. panniformis* (35.1 %), *M. novacekii* (32 %) and *M. aeruginosa* (31.8 %). In contrast with stage I, lipid content increased 1.4-fold for *M. aeruginosa* and *M. novacekii*, 1.3-fold for *M. protocystis*, and *M. panniformis* was recorded an increased 1.2-fold in lipid content. Although, biomass concentration decreased significantly when *Microcystis* were cultivated in the stage II was observed an enhanced in lipid content in relation to stage I.

The fatty acid compositions for all the *Microcystis* in the stage I and II are shown in Table 2. Both processes of cultivation showed similar fatty acid compositions, suggesting that two-stage process not significantly affected the lipid profiles of species. Most of oil obtained from *Microcystis* tested here was observed highest percentage of monounsaturated fatty acid followed to saturated, and polyunsaturated. Except for *M. panniformis*, that obtained oil with highest proportion of saturated fatty acid followed to monounsaturated, and polyunsaturated. Additionally, there was no significantly difference in the monounsaturated and polyunsaturated content. However, in relation to saturated oil content, when *M. novacekii* was cultivated in nitrogen-free medium was observed a decreased significantly in saturated oil content ($P=0.003$), due to reduce of proportion of palmitic acid (16:0) (31.7 % to 24.4 %). As shown in Table 2, the highest proportion of fatty acids in the oil of *M. panniformis* and *M. protocystis* in the two stages were palmitic acid (C16:0), followed to cis-10-Heptadecenoic (C17:1) and oleic acid (C18:1). While for *M. aeruginosa* and *M. novacekii* C17:1, C16:0, and C18:1 were predominant.

Table 2: Fatty acid compositions and estimated properties of biodiesel quality from *Microcystis* in the stage I and stage II of cultivation.

Methyl ester	<i>M. panniformis</i>		<i>M. aeruginosa</i>		<i>M. novacekii</i>		<i>M. protocystis</i>	
	Stage I	Stage II	Stage I	Stage II	Stage I	Stage II	Stage I	Stage II
Lauric (12:0)	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	-
Myristic (C14:0)	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.7	1.2 ± 0.1
Pentadecanoic (C15:0)	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	-	-	-	-
Palmitic (C16:0)	29.8 ± 1.1	29.9 ± 2.8	25.0 ± 1.0	17.3 ± 6.7	23.3 ± 3.0	17.5 ± 0.9	24.4 ± 4.2	27.9 ± 1.1
Heptadecanoic (C17:0)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.9 ± 0.5	0.8 ± 0.1
Stearic (C18:0)	3.3 ± 1.0	2.2 ± 1.6	3.3 ± 1.5	3.1 ± 1.6	5.2 ± 1.6	4.2 ± 0.5	5.5 ± 0.6	4.9 ± 1.6
Arachidic (C20:0)	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	-
Tricosanoic (C23:0)	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	22.7 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Palmitoleic (C16:1)	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	-	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1
<i>cis</i> -10-Heptadecenoic (C17:1)	21.8 ± 2.8	18.5 ± 3.6	31.0 ± 1.5	20.9 ± 7.7	28.5 ± 3.5	25.9 ± 6.8	19.3 ± 7.6	27.2 ± 1.7
Oleic (C18:1)	16.5 ± 2.3	16.8 ± 2.9	15.9 ± 3.0	8.9 ± 1.7	12.9 ± 0.7	10.4 ± 0.6	15.9 ± 2.5	15.7 ± 0.9
<i>cis</i> -11-Eicosenoic (C20:1)	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3
Erucic (C22:1)	0.4 ± 0.1	-	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.1	-	-	-
Linoleic (C18:2n6c)	2.2 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.5 ± 0.8	2.6 ± 1.5	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.6	6.0 ± 0.6	4.3 ± 1.1
Linolenic (C18:3n3)	1.2 ± 0.7	1.4 ± 0.8	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.5	1.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	3.7 ± 0.6	2.1 ± 0.5
Arachidonic (C20:4)	-	-	0.4 ± 0.2	-	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-	-
<i>cis</i> -13,16-Docosadienoic (C22:2)	2.3 ± 0.4	1.7 ± 0.9	2.8 ± 0.6	1.8 ± 0.7	2.4 ± 0.5	1.3 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.5
Saturated (% dwt)	40.0 ± 0.4	40.5 ± 1.9	33.0 ± 1.6	30.6 ± 2.4	31.7 ± 4.4	24.4 ± 0.3	40.4 ± 3.2	37.3 ± 1.9
Monounsaturated (% dwt)	39.5 ± 4.6	38.5 ± 5.9	48.2 ± 1.0	36.0 ± 3.7	42.2 ± 4.2	46.9 ± 2.6	41.4 ± 4.0	43.8 ± 0.1
Polyunsaturated (% dwt)	5.9 ± 0.3	4.8 ± 0.3	6.3 ± 1.1	7.2 ± 0.1	7.6 ± 0.4	1.5 ± 0.3	11.5 ± 2.2	8.8 ± 1.4
N.I. (% dwt)	17.3 ± 0.6	16.1 ± 3.6	12.6 ± 1.9	26.2 ± 1.2	18.6 ± 0.5	22.7 ± 1.0	6.7 ± 3.1	10.1 ± 0.1
DU	48.7 ± 0.2	48.3 ± 5.1	60.7 ± 1.3	50.3 ± 3.5	57.3 ± 3.5	57.5 ± 2.4	64.4 ± 2.8	61.4 ± 3.0
LCSF (% dwt)	5.5 ± 0.2	5.4 ± 0.1	4.8 ± 0.6	4.2 ± 1.5	5.3 ± 1.2	3.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.9
CFPP (°C)	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.3	-1.4 ± 2.0	-3.4 ± 4.6	0.1 ± 3.6	-4.3 ± 0.6	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1

DU- degree of unsaturation; LCSF, long chain saturated factor; CFPP, cold filter plugging point.
N.I.- not identified; (-) not detected.

Some properties of the biodiesel obtained from *Microcystis* in the stage I and II were empirically estimated and presented in Table 2. The biodiesel quality is dependent on the fatty acids presents in oil obtained. Degree of unsaturation can be used to estimate the cetane number (CN) and iodine value (IV). Higher proportion of saturated fatty acids in the oil obtained produces biodiesel with lower values of DU, consequently higher values of CN, while higher percentage of unsaturated fatty acid has higher values of DU, thus higher values of IV. The values recorded of DU from *Microcystis* were significantly affected by change of cultivation (P=0.02). Although, there was difference of DU between processes studied was observed a slight decrease of DU in the stage II for most of *Microcystis* studied. Cold filter plugging point (CFPP) can be obtained by proportion of the longer fatty acid chains in the oil, which based on the long chain

saturation factor (LCSF). Biodiesel with higher proportion of long chain fatty acids (higher LCSF) has higher values of CFPP. Higher values of CFPP in the oil can cause clogging of filters and fuel lines at low temperatures. In this study, LCSF was not significantly affected by change in the use of two-stage cultivation. However, in the stage II was observed a decrease of values of LCSF, suggesting that two-stage cultivation was effective to enhance the CFPP. The best results of CFPP in both processes were obtained in *M. aeruginosa* (-1.4 and -3.4 °C, respectively), followed by *M. novacekii* (0.1 and -4.3 °C, respectively), *M. panniformis* (0.9 and 0.6 °C, respectively), and *M. protocystis* (2.2 and 1.9 °C, respectively). These results suggest that oil obtained from *Microcystis* is according to standard to production of biodiesel and to use of two-stage processes can be more effective.

4. Discussion

The use of a two-stage process to increase biomass (stage I) and to induce lipid accumulation (stage II) proposed in this study showed to be an effective approach to enhance lipid accumulation by *Microcystis* species. Furthermore, this approach seems to resolve the contradiction which that species under stress conditions increase lipid accumulation but decrease growth rates, affecting directly biomass concentration and biomass productivity, for what a large-scale cultivation is necessary for biodiesel production (Markou and Nerantzis 2013). There are several chemical and physical stimuli that can be used to enhance lipid content among which nitrogen starvation has been considered the best strategy (Pancha et al. 2014). In cultivation systems of microorganisms it is very important to select an ideal culture medium that will offer better growing conditions to produce higher yields (Markou et al. 2014). In the present study we expected in stage I a biomass accumulation higher than in stage II due to normal conditions of cultivation, confirmed by the recorded results.

The biomass productivity achieved by *Microcystis* species recorded in the present study was consistent with previous studies that used NaNO₃ (170 mg/L) as nitrogen source and similar culture condition in *M. aeruginosa* (e. g. Da Rós et al. 2012, Krüger et al. 2012). However, the effect of nitrogen-free medium on biomass accumulation of *Microcystis* sp in stage II was higher than expected. We observed a considerable decrease in the biomass production in stage II. This reduction in concentration of biomass under stress by nitrogen deprivation could have induced a halt in growth or even cell death. In contrast, in stage II it was not visualized a color change on cultures until the end of the experiment suggesting the cells grew normally despite limitations. However, we believe that this sudden loss in biomass in the second stage can be due to loss of biomass during the centrifugation.

Under stress caused by nitrogen starvation cell division can halt leading to a decrease of biomass production but leading to an accumulation of intracellular lipid (Xin et al. 2010). This is due to a decrease in the thylakoid membrane content of the cell or the activation of acyl hydrolase and stimulation of phospholipid hydrolysis, which can enhance the intracellular fatty acid content (Xin et al. 2010).

Herein, although starvation by nitrogen has affected significantly the biomass of *Microcystis* we observed an enhancement in lipid content (~10 %). Therefore, in our work with *Microcystis* the lipid content in all tested species was optimized in two-stage cultivation, similarly with the results recorded by Griffiths et al. (2014). These researchers investigated the two-stage strategy to improve lipid content in *Chlorella vulgaris*. It was applied a first strategy with nitrogen-replete medium to optimize biomass productivity, followed by nitrogen-free medium to enhance lipid content. This strategy increased the lipid content (11% to 28%) in comparison with the stage under nitrogen-replete conditions.

In the literature, lipid content in cyanobacteria in normal condition of nitrogen-replete medium (0.250 to 1.5 g/L NaNO₃) and without genetic manipulation ranged from 7 to 45 % (Karatay and Dönmez 2011; Abdo et al. 2013; Silva et al. 2014). Specifically for *Microcystis* species it was recorded total lipid content only for *M. aeruginosa* ranging between 13 to 30 % (Sharathchandra and Rajashekhar 2011; Da Rós et al 2013; Ashokkumar et al. 2014; Abdo et al. 2014). In the present study, the lipid content in normal condition of nitrogen-replete medium (stage I) (0.170 g/L) ranged between 22.5 and 33.7 % results similar and/or even higher as compared to those reported for *M. aeruginosa*. Furthermore, when it was imposed a stress condition the lipid content was further increased (31.8- 42.5 %) reaching levels close to the ones recorded for other species and genera of cyanobacteria.

The fatty acid composition present in the oil is an important property to identify a good candidate for biodiesel production (Dhup and Dhawan 2014). According to Quintana et al. (2011) unicellular cyanobacteria are considered most appropriate to high quality biodiesel production due to larger monounsaturated fatty acid amount and low levels of polyunsaturated fatty acid. In this study the fatty acid composition considering the saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids of all *Microcystis* was very similar in both processes of cultivation, suggesting that the two-stage process did not significantly affected the lipid profiles of the species. However, there was a predominance of monounsaturated and saturated fatty acids. Fatty acid composition of *Microcystis* was consistent with other profiles (e.g *M. aeruginosa*) found in the literature, with highest content of monounsaturated and saturated fatty acids (Sharathchandra and Rajashekhar 2011; Abdo et al 2013; Ashokkumar et al. 2014).

Biodiesel quality is not determined only by a single fatty acid but by the product of a quantitative/qualitative balance among the total fatty acid composition present in oils

(Nascimento et al. 2014). This balance plays an essential role in some properties of biodiesel such as oxidation stability (OS), cetane number (CN), iodine value (IV) and cold filter plugging point (CFPP), which are determined by the degree of unsaturation (DU) and the chain length of the fatty acids (Quintana et al. 2011). These properties assess the quality of biodiesel in relation to its ability to remain stable during extended storage, ignition quality, combustion performance, and flow performance at low-temperatures (Nascimento et al. 2014, Ramos et al. 2009). In this study biodiesel produced by all *Microcystis* species had low degree of unsaturation due to the lower polyunsaturated fatty acids content of these cyanobacteria. Low DU is associated with high CN which is used as a property to the ignition delay time and combustion quality (Xia et al. 2013; Nascimento et al. 2014). Therefore, low DU values are considered better to oxidative stability of biodiesel during longer storage while higher CN values are associated to shorter ignition time for diesel cycle engines (Nascimento et al. 2013). Herein, DU values obtained from *Microcystis* (48.3 to 64.4 %) are similar to results obtained by Da Rós et al. 2013 (61.4%) and Ashokkumar et al. 2014 (48.2 %) analyzing the profile of fatty acids for *M. aeruginosa*. Additionally, these researchers concluded in their studies that *M. aeruginosa* is a promising source of lipid feedstock for biodiesel production.

CFPP is a property normally used to evaluate oil flow performance at low temperatures which was obtained by the long chain saturated factor (LCSF) (Francisco et al. 2010). Biodiesel with a higher percentage of saturated fatty acids easily crystallize at low temperatures than unsaturated fatty acids because of its high melting point (Knothe 2005). Herein, despite the oil obtained from *Microcystis* had low DU values this was not influenced by the LCSF and CFPP values. According to Quintana et al. (2011) biodiesel composed of long-carbon-chain saturated fatty acids shows poor cold-

flow properties (high LCSF). In the present research biodiesel from *Microcystis* exhibited good flow performance at low temperatures due to low LCSF values. According to published data the CFPP obtained for different vegetable oils varied from -12 to 17 °C (Ramos et al. 2009), while for microalgae oil ranged from -11.7 to 17.4 °C (Nascimento et al. 2014). Despite that the US Standard (ASTM D6751-02), European Standard (EN 14214), and Australian Standard do not mention a low-temperature property in their lists of specifications, in the Brazilian National Petroleum Agency Standard (ANP Resolution N° 45/2014) the limit established range from 5 to 19 °C, but based on meteorological data and localization in the country. Therefore, in this study, the CFPP values obtained for all *Microcystis* (-4.3 to 2.2 °C) are in agreement with the ANP Resolution N° 45/2014. Moreover, these values are within the range recorded for vegetables and microalgae oils confirming to possibility of the use of oil from these *Microcystis* for biodiesel production.

Among the species studied, *M. protocystis* recorded better productivity of biomass and lipid content, while other species had very similar performance. However, as discussed above, the fatty acid content obtained for all *Microcystis* species in both processes of cultivation was compatible with biodiesel quality standards suggesting that all tested species are promising sources of feedstock for biodiesel production and the use of two-stage cultivation processes do not affect the fatty acid composition for these *Microcystis* species. These results allow us to propose that this approach can be applied to biodiesel production since the basic properties of biodiesel quality will not be modified.

Conclusion

The two-stage cultivation approach showed to be an effective strategy to increase the lipid content for biodiesel production from all *Microcystis* species tested here.

Moreover, it also revealed not affected the fatty acid composition in these species thus suggesting this strategy of cultivation can be applied for biodiesel production since the basic properties of biodiesel will not be modified. Finally, the use of two-stage cultivation strategy brings a contribution to solve a growing environmental problem besides to constitute a potential resource potential for renewable biofuels production.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Processo 471757/2013-6) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG- Processo APQ 01389-13) for the financial support and scholarship. We are grateful to the technical contributions from Nilva of the Laboratório de Ensaios de combustíveis ICEX-UFMG.

References

- Abdo SM, Ahmed E, El-Enin SA, El Din RS, El Diwani G, Ali G (2013) Growth Rate and Fatty Acids Profile of 19 Microalgal Strains Isolated from River Nile for Biodiesel Production. *J. Algal Biomass Utln* 4: 51– 59
- Abdo SM, Ahmed E, El-Enin SA, El Din RS, El Diwani G, Ali G (2014) Qualitative and quantitative determination of lipid content in microalgae for biofuel production. *J. Algal Biomass Utln* 5: 23- 28
- Adams C, Godfrey V, Wahlen B, Seefeldt L, Bugbee B (2013) Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technol* 131: 188-194
- Ashokkumar V, Agila E, Salam Z, Ponraj M, Din MFM, Ani FN (2014) A study on large scale cultivation of *Microcystis aeruginosa* under open raceway pond at semi-continuous mode for biodiesel production. *Bioresource Technol* 172: 186-193
- Astm D6751-02 (2002) Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels: ASTM International. West Conshohocken, USA

- Da Rós PCM, Silva CSP, Silva-Stenico ME, Fiore MF, De Castro HF (2012) *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. *J Mol Catal* 84: 177-182
- Da Rós PCM, Silva CSP, Silva-Stenico ME, Fiore MF, De Castro HF (2013) Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. *Mar Drugs* 11: 2365-2381
- Dhup S, Dhawan V (2014) Effect of nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition of *Monoraphidium* sp. *Bioresource Technol* 152: 572-575
- Erdrich P, Knoop H, Steuer R, Klamt S (2014) Cyanobacterial biofuels: new insights and strain design strategies revealed by computational modeling. *Microb Cell Fact* 13: 1-15
- Francisco EC, Neves DB, Jacob-Lopes E, Franco TT (2010) Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol* 85: 395-403
- Gorham PR, McLachlan J, Hammer UT, Kim WK (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh Internat Verein Limnol* 15: 796-804
- Griffiths MJ, Van Hille RP, Harrison ST (2014) The effect of degree and timing of nitrogen limitation on lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 6147-6159
- Harel M, Weiss G, Lieman-Hurwitz J, Gun J, Lev O, Lebendiker M, Temper V, Block C, Sukenik A, Zohary T, Braun S, Carmeli S, Kaplan A (2013) Interactions between *Scenedesmus* and *Microcystis* may be used to clarify the role of secondary metabolites. *Environ Microbiol* 5: 97-104
- Karatay SE, Dönmez G (2011) Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Appl. Energy* 88: 3632-3635
- Knothe G (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol* 86: 1059–1070
- Krüger T, Hölzel N, Luckas B (2012) Influence of cultivation parameters on growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) isolated from Lake Chao (China). *Microb Ecol* 63: 199-209
- Li T, Zheng Y, Yu L, Chen S (2014) Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass Bioenerg* 66: 204-213
- Machado IM, Atsumi S (2012) Cyanobacterial biofuel production. *J Biotechnol* 162: 50-56

- Markou G, Nerantzis E (2013) Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnol Adv* 31: 1532-1542
- Markou G, Vandamme D, Muylaert K (2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Res* 65: 186-202
- Mujtaba G, Choi W, Lee CG, Lee K (2012) Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresour Technol* 123: 279-283
- Nascimento IA, Marques SSI, Cabanelas ITD, De Carvalho GC, Nascimento MA, De Souza CO, Druzian JI, Hussain J, Liao W (2014) Microalgae versus land crops as feedstock for biodiesel: productivity, quality, and standard compliance. *Bioenerg Res* 7: 1002-1013
- Nascimento IA, Marques SSI, Cabanelas ITD, Pereira SA, Druzian JI, de Souza CO, Vich DV, Carvalho GCC, Nascimento MA (2013) Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenerg Res* 6: 1-13
- Pancha I, Chokshi K, George B, Ghosh T, Paliwal C, Maurya R, Mishra S (2014) Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour Technol* 156: 146–154
- Quintana N, Van der Kooy F, Van de Rhee MD, Voshol GP, Verpoorte R (2011) Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 471-490
- Ra CH, Kang CH, Kim NK, Lee CG, Kim SK (2015) Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. *Renew Energ* 80: 117-122
- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol* 100: 261–268
- RESOLUÇÃO ANP N° 14 (2012)
http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml. Accessed 19 October 2015
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102:100–112
- Sarsekeyeva F, Zayadan BK, Usserbaeva A, Bedbenov VS, Sinetova MA, Los DA (2015) Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. *Photosynth Res* 125: 329-340

Sharathchandra K, Rajashekhar M (2011) Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. *J Algal Biomass Utiln* 2: 83-97

Silva CSP, Silva-Stenico ME, Fiore MF, De Castro HF, Da Rós PCM (2014) Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. *Algal Res* 3: 1-7
Statsoft (2011) Statistica: data analysis software system. Version 10. StatSoft Inc.

UNE-EN 14214 (2003) European Standard. Automotive Fuels. Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines. Requirements and Test Methods; CEN-European Committee for Standardization: Brussels, Belgium

Xia L, Ge H, Zhou X, Zhang D, Hu C (2013) Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. *Bioresour Technol* 144: 261-267

Xin L, Hong-Ying H, KE G, Ying-Xue S (2010) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol* 101: 5494-5500

Yoon SY, Hong ME, Chang WS, Sim SJ (2015) Enhanced biodiesel production in *Neochloris oleoabundans* by a semi-continuous process in two stage photobioreactors. *Bioprocess Biosyst Eng* 38: 1415–1421

Zeng Y, Tang J, Lian S, Tong D, Hu (2015) Study on the conversion of cyanobacteria of Taihu Lake water blooms to biofuels. *Biomass Bioenerg* 73: 95-101

Zhang D, Xue S, Sun Z, Liang K, Wang L, Zhang Q, Cong W (2014) Investigation of continuous-batch mode of two-stage culture of *Nannochloropsis* sp. for lipid production. *Bioprocess Biosyst Eng*, 37: 2073-2082

Zhang M, Kong F, Xing P, Tan X (2007) Effects of interspecific interactions between *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* on their growth and physiology. *Internat Rev Hydrobiol* 92: 281-290

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho permitiu verificar o potencial das espécies de *Microcystis* avaliadas em diferentes condições de cultivo para a produção de extrato graxo visando à produção de biodiesel.

A manipulação das concentrações de nutrientes nos meios de cultivo com menor disponibilidade de nutrientes não alterou a capacidade das espécies de *Microcystis* investigadas em crescer e produzir biomassa. O baixo requerimento nutricional dessas espécies deve ser destacado, uma vez que tem impacto direto nos custos nos sistemas de cultivo.

A fácil manipulação e plasticidade do metabolismo das *Microcystis* é outro fator que deve ser destacado. Nesse estudo, foram aplicadas diversas abordagens visando obter óleo para produção de biodiesel. Dentre elas, o uso de cocultura mostrou-se bastante eficaz. Uma vez que este tipo de cultivo resultou em um aumento na produtividade de biomassa e do conteúdo de lipídios. Destaca-se também que o óleo obtido por meio dessa estratégia, considerando as equações empíricas aplicadas para estimar suas propriedades, apresentou conformidade com propriedades essenciais ao uso como biodiesel. Do mesmo modo, o cultivo em duas fases permitiu elevação do conteúdo de lipídios por meio da indução de estresse por privação de nutrientes na segunda fase, sem alterar a composição do biodiesel e consequentemente, as suas propriedades estimadas.

Demonstrou-se, por meio desse estudo, o potencial das *Microcystis* como fonte de biomassa para produção de biodiesel. Considerando a ubiquidade das *Microcystis* e o clima do Brasil favorável ao seu cultivo estes resultados incentivam a continuidade dos estudos na perspectiva de uma produção em maior escala para permitir testes efetivos que sustentem a produção comercial.

Como contribuição adicional, devem-se considerar os constantes problemas no Brasil com a eutrofização de corpos d'água e a floração de cianobactérias, principalmente do gênero *Microcystis*. Esse estudo abre perspectiva de utilizar a biomassa dessas florações como fonte de biomassa para a produção de biodiesel, dentro do conceito de biorrefinaria.

O uso de matérias-primas fixadoras de CO₂ como as cianobactérias permite obter um sistema mais eficiente para a produção de energia sustentável e quando estas espécies são acopladas em um sistema de coculturas pode ser possível reduzir os custos de produção.

Atualmente, o principal desafio na comercialização de biocombustíveis por microalgas e cianobactérias está relacionado aos custos de produção que as tornam pouco competitivas em relação aos combustíveis fósseis. Desta maneira, este trabalho trouxe novas contribuições apresentando possíveis fontes de matéria-prima para produção de biomassa de baixo custo, visando à obtenção de óleo para geração do biodiesel.

