

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MONICA DE ALBUQUERQUE BONINI**

**POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE VINHAÇA COMO MEIO PARA O  
CULTIVO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*: ASPECTOS  
TOXICOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS**

**São Carlos - SP  
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MONICA DE ALBUQUERQUE BONINI**

**POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE VINHAÇA COMO MEIO PARA O  
CULTIVO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*: ASPECTOS  
TOXICOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do título de **Doutor em Biotecnologia**.

**Orientadores:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Teresa Lombardi  
Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

**São Carlos - SP  
2016**

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

B715p Bonini, Monica de Albuquerque  
Potencial de utilização de vinhaça como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* : aspectos toxicológicos e microbiológicos / Monica de Albuquerque Bonini. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
88 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Efluentes. 2. Reúso. 3. Biomassa. 4. Avaliação e Identificação da Toxicidade (TIE). 5. Promotores de crescimento. I. Título.



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Monica de Albuquerque Bonini, realizada em 04/03/2016:

---

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
UFSCar

---

Prof. Dr. Andre Bernardo  
UFSCar

---

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
UFSCar

---

Profa. Dra. Jandira Liria Biscalquini Talamoni  
UNESP

---

Profa. Dra. Paula Cristina Garcia Manoel Crnkovic  
EESC/USP

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar, mas o  
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

***Madre Teresa de Calcutá***

*(1910 – 1997)*

*“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos outros dez.”*

***George Bernard Shaw***

*(1856 – 1950)*

## **AGRADECIMENTOS**

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus orientadores, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Teresa Lombardi e Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza, por abrirem as portas de seus laboratórios e por todo seu conhecimento, auxílio, sugestões e contribuições;

Ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, por ter me apresentado o mundo das microalgas e contribuído muito com minha formação. Pela sua amizade e prontidão, sempre;

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Algas, Alex, Renata, Thaís, Dani, Grazi, Jaque, Raquel, Pedro, Eduardo, Adriano, Léo, Dalva, Silvia, Moira e Hirla, pela companhia, amizade e contribuições e, especialmente, à Andréa e à Camila, por compartilharem o dia-a-dia do trabalho com a vinhaça e tornar suas particularidades mais facilmente entendidas quando pensadas em conjunto;

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia, especialmente à Giovanna, pela amizade, ajuda e convivência ao longo destes quatro anos em São Carlos;

Aos técnicos administrativos Zélia Venézio e Ivete Palombo, do Departamento de Microbiologia e Patologia (DMP – UFSCar), pela convivência e auxílios, e ao Carlos Aparecido Casali, do Departamento de Botânica (DB – UFSCar), pelas conversas, risos e infinitas contribuições ao meu trabalho;

Aos amigos remanescentes do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, especialmente Mariane, Tina e Maikon, pela amizade e todos os almoços ao longo dos anos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec – UFSCar), pela oportunidade de crescimento nos âmbitos acadêmico e pessoal;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),  
pelo suporte financeiro durante a realização deste trabalho;

Ao meu noivo Felipe, por seu amor e paciência infinita, e por ser meu alicerce  
em cada minuto do dia e em cada etapa da minha vida;

À minha mãe Nilsa, meu maior exemplo de vida e de amor incondicional, sem o  
qual eu não seria o que sou hoje, e ao meu pai, Fernando, pelo qual tento ser uma pessoa  
melhor a cada dia.

À minha irmã Marina que, mesmo distante, me apóia, me aconselha e me faz rir;

Aos meus avós, Alsira e Mário (*in memoriam*) que continuam a me encantar  
com sua visão do mundo;

A todos meus amigos, simplesmente por existirem, tornando a vida mais leve;

A Deus, que me permite acordar todos os dias e buscar a realização de meus  
sonhos com saúde, coragem e força.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS .....  |    |
| LISTA DE TABELAS .....  |    |
| RESUMO .....  |    |
| ABSTRACT .....  |    |
| <b>APRESENTAÇÃO</b> .....   | 1  |
| Referências .....   | 5  |
| <b><u>CAPÍTULO 1</u></b> .....  | 8  |
| Resumo .....  | 8  |
| <b><u>CHAPTER 1</u></b> .....   | 9  |
| Abstract .....  | 9  |
| 1 Introdução .....  | 10 |
| 2 Material e Métodos .....  | 12 |
| 3 Resultados .....  | 14 |
| 4 Discussão .....   | 17 |
| 5 Referências .....   | 22 |
| <b><u>CAPÍTULO 2</u></b> .....  | 27 |
| Resumo .....  | 27 |
| <b><u>CHAPTER 2</u></b> .....   | 28 |
| Abstract .....  | 28 |
| 1 Introdução .....  | 29 |
| 2 Material e Métodos .....  | 31 |
| Ajuste de pH (3,0 e 11,0) .....   | 34 |
| Ajuste de pH + aeração (pH inicial, 3,0 e 11,0) .....                                       | 34 |
| Extração em fase sólida (coluna C18 e resina XAD-8) .....                                   | 34 |
| Adição de agente oxidante - Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ..... | 35 |



|  |    |
|--|----|
| Adição de agente quelante – Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).....  | 36 |
| 3 Resultados.....  | 37 |
| 3.1 Ensaios preliminares visando selecionar as concentrações de tiosulfato de sódio, EDTA, resina XAD-8 e sílica C18 para os experimentos com vinhaça..... | 37 |
| 3.2 Ensaios referentes aos procedimentos de TIE.....   | 39 |
| 4 Discussão.....   | 44 |
| 4.1 Ensaios preliminares visando selecionar as concentrações de tiosulfato de sódio, EDTA, resina XAD-8 e sílica C18 para os experimentos com vinhaça..... | 44 |
| 4.2 Ensaios referentes aos procedimentos de TIE.....   | 44 |
| 5 Referências.....   | 54 |
| <b><u>CAPÍTULO 3</u></b> .....   | 62 |
| Resumo.....  | 62 |
| <b><u>CHAPTER 3</u></b> .....  | 63 |
| Abstract.....  | 63 |
| 1 Introdução.....  | 64 |
| 2 Material e Métodos.....  | 67 |
| Cultivo em vinhaça pré-tratada.....  | 67 |
| Monitoramento do crescimento microbiano.....   | 68 |
| Caracterização da microbiota cultivada em vinhaça.....   | 69 |
| 3 Resultados.....  | 70 |
| 4 Discussão.....   | 74 |
| 5 Referências.....   | 79 |
| <b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....  | 86 |
| <b>ANEXO</b> .....   | 87 |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Densidades celulares de *Chlorella vulgaris* após 96 horas de cultivo em vinhaça. □ = vinhaça convencional com nutrientes; Δ = vinhaça convencional sem nutrientes; ■ = vinhaça orgânica com nutrientes e ▲ = vinhaça orgânica sem nutrientes. ○ = Média dos tratamentos controle ( $1,24 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>; n=12).....15

**Figura 2.** Taxas específicas de crescimento ( $\mu$ , dia<sup>-1</sup>) de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça. □ = vinhaça convencional com nutrientes; Δ = vinhaça convencional sem nutrientes; ■ = vinhaça orgânica com nutrientes e ▲ = vinhaça orgânica sem nutrientes. ○ = Média dos tratamentos controle (n=12).....16

**Figura 3.** Valores de pH após 96 h de cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça. Barra preta: vinhaça convencional com nutrientes; barra cinza escura: vinhaça convencional sem nutrientes; barra cinza clara: vinhaça orgânica com nutrientes; barra branca: vinhaça orgânica sem nutrientes. Barra hachurada = média dos tratamentos controle (n=12).....16

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Densidade óptica (DO) de amostras de vinhaça tratadas com diferentes concentrações de resina XAD-8. A concentração 0 refere-se ao tratamento controle.....39

**Figura 2.** Densidade óptica (DO) de volumes crescentes de vinhaça passados por cartuchos de C18. A concentração 0 refere-se ao tratamento controle.....39

**Figura 3.** Densidade celular (cél mL<sup>-1</sup>) de *Chlorella vulgaris* após 96 h de cultivo em vinhaça. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pHinicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle ( $9,3 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>; n=24).....40

**Figura 4.** Taxas específicas de crescimento ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) de *Chlorella vulgaris* durante cultivos em vinhaça. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pHinicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle (n=24).....41

**Figura 5.** Valores finais de pH após 96 h de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça submetida aos tratamentos TIE. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pHinicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle (n=24).....42

**Figura 6.** Concentração de oxigênio dissolvido após 96 horas de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pHinicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle (n=24).....43

**Figura 7.** Condutividade elétrica (CE) após 96 h de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pHinicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle (n=24).....43

### CAPÍTULO 3

**Figura 1.** Crescimento de *C. vulgaris* (■; cél mL<sup>-1</sup>) e de micro-organismos associados ao seu cultivo em meios PCA (○; UFC mL<sup>-1</sup>) e Sabouraud (Δ; UFC mL<sup>-1</sup>) durante cultivo em vinhaça pré-tratada.....71

**Figura 2.** Crescimento de *C. vulgaris* (■; cél mL<sup>-1</sup>) e de micro-organismos associados ao seu cultivo em meio PCA (○; UFC mL<sup>-1</sup>) durante cultivo em meio LC Oligo.....71

**Figura 3.** Porcentagem de isolados microbianos obtidos do plaqueamento em meios PCA e Sabouraud de alíquotas de vinhaça e meio LC Oligo cultivados com *Chorella vulgaris*. Branco: PCA Vinhaça; Preto: PCA Controle; Cinza claro: Sabouraud vinhaça; Cinza escuro: Sabouraud Controle; Hachurado: PCA Vinhaça em jarra de anaerobiose.....72

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Caracterização físico-química das vinhaças e composição nutricional do meio LC Oligo utilizado para o cultivo de *Chlorella vulgaris*. DBO: demanda bioquímica de oxigênio; DQO: demanda química de oxigênio; COT: carbono orgânico total. Valores em mg L<sup>-1</sup>; \*Valor não determinado.....13

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Caracterização físico-química da vinhaça previamente às manipulações referentes aos procedimentos de TIE. Teores de K<sub>2</sub>O em kg m<sup>3</sup>; condutividade elétrica em µS cm<sup>-1</sup> e demais valores em mg L<sup>-1</sup>.....32

**Tabela 2.** Manipulações (não sequenciais) e agentes-alvo a serem removidos com os procedimentos de TIE em vinhaça.....32

**Tabela 3.** Valores médios de clorofila *a*, densidade óptica e rendimento quântico máximo do fotossistema II em 96 horas de cultivo de *C. vulgaris* em diferentes concentrações de tiosulfato de sódio. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....38

**Tabela 4.** Valores médios de clorofila *a*, densidade óptica e rendimento quântico máximo do fotossistema II em 96 horas de cultivo de *C. vulgaris* em diferentes concentrações de EDTA. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....38

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Caracterização físico-química da vinhaça antes e após cultivo de *C. vulgaris*. DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; DQO: Demanda química de oxigênio; COT: Carbono orgânico total; NT: Nitrogênio orgânico total. Teores de K<sub>2</sub>O em kg m<sup>3</sup>; condutividade elétrica em µS cm<sup>-1</sup> e demais valores em mg L<sup>-1</sup>.....68

**Tabela 2.** Caracterização fisiológica dos micro-organismos cultiváveis isolados de meios PCA e Sabouraud a partir de vinhaça e de meio LC Oligo cultivados com *Chlorella vulgaris*.....73

**Tabela 3.** Composição bioquímica da biomassa produzida durante cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça e em meio LC Oligo. Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Valores em pg cél<sup>-1</sup>.....74

## RESUMO

Microalgas têm sido cultivadas no mundo todo visando obter biomassa para as mais diversas aplicações. No entanto, seu custo de produção é elevado, pois além de demandarem elevada quantidade de água, exigem nutrientes minerais para que possam crescer satisfatoriamente. A utilização de águas residuárias para cultivos microalgais tem merecido destaque uma vez que, simultaneamente à possibilidade de se reduzir os custos de produção algal, é possível reduzir o potencial eutrofizante e contaminante dos efluentes através da incorporação de nutrientes ali presentes à biomassa microalgal. No entanto, efluentes apresentam maior complexidade do que meios de cultura sintéticos, com características variáveis ao longo do tempo e maior presença de micro-organismos associados como bactérias, fungos e leveduras. O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar e a vinhaça é o principal subproduto dessa produção, sendo gerada na proporção de 10 - 12 L vinhaça/L etanol. A presença de nutrientes minerais na vinhaça indica seu uso como adubo vegetal, quer seja para microalgas, quer para vegetais vasculares. Entretanto, cultivar microalgas em vinhaça é ainda um desafio. Se, por um lado, em cultivos fotoautotróficos a coloração escura do efluente pode ser limitante, em cultivos heterotróficos a presença de contaminantes biológicos pode levar à competição por recursos e comprometer a qualidade da biomassa final. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de utilização de vinhaça de cana-de-açúcar como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, uma espécie robusta usualmente empregada em tratamento de águas residuárias. Buscou-se desvendar qual constituinte da vinhaça a torna tão problemática aos cultivos microalgais e analisar as possibilidades de cultivo fotoautotrófico objetivando, sempre, maior rendimento de biomassa. Ensaio laboratoriais foram conduzidos inicialmente com duas vinhaças, uma convencional e uma oriunda de um processamento agroecológico, utilizando diferentes concentrações para o cultivo microalgal. Com base nesses resultados, selecionou-se a vinhaça convencional para intensificação dos estudos referentes à toxicidade deste efluente. Ensaio envolvendo avaliação e identificação da toxicidade (TIE) foram conduzidos através de uma série de manipulações físico-químicas da vinhaça, com objetivo de alterar a biodisponibilidade de determinados compostos e, conseqüentemente, aumentar a produção microalgal. Os resultados mostraram que, dentre os tratamentos, o ajuste de pH foi o principal responsável pelo maior crescimento de *Chlorella vulgaris* quando cultivada em vinhaça, enquanto a adição de EDTA, tiossulfato de sódio e resina XAD-8 ao efluente limitou o crescimento microalgal. O crescimento de *C. vulgaris* foi maior em concentrações intermediárias de vinhaça (30 – 70%), demonstrando a possibilidade de utilização deste resíduo como meio para o cultivo microalgal. Selecionada a condição ideal de cultivo para *C. vulgaris*, realizou-se um rastreamento dos micro-organismos presentes na vinhaça e nas culturas não axênicas da microalga, com isolamento e caracterização dos mesmos no tocante à produção de ácido indolacético (AIA), fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato inorgânico. A presença de micro-organismos heterotróficos na vinhaça não comprometeu o crescimento microalgal e os resultados mostraram-se promissores quanto ao uso dos micro-organismos isolados como promotores de crescimento em cultivos microalgais. A biomassa produzida apresentou produtividade protéica de 15,57 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, com diminuição dos teores de nitrogênio, sulfato, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) em relação à vinhaça inicial. Os resultados sugerem a possibilidade de uso de vinhaça como meio para o cultivo de *C. vulgaris*, com redução do potencial contaminante do efluente e aumento da biomassa produzida em relação ao meio de cultura sintético.

**Palavras-chave:** Efluentes. Reúso. Biomassa. Avaliação e Identificação da Toxicidade (TIE). Promotores de crescimento.

## ABSTRACT

Microalgae have been cultivated worldwide to obtain biomass for various applications. Nonetheless the production costs of microalgae is still high due to factors such as photobioreactors, water and nutrients to grow the organisms. In recent years the use of wastewaters of several origins for microalgal cultures have been studied. However wastewater generally are more complex than synthetic microalgae culture media. Their characteristics can vary over time and have associated microorganisms such as bacteria, fungi and yeasts. Vinasse is a wastewater generated in large volumes by the ethanol industry of Brazil and it is rich in nutrients and organic materials. The use of this effluent to support microalgae growth can reduce the microalgae production costs at the same time that it decreases the contaminant potential of the effluent through the incorporation of nutrients into biomass. The aim of this research was to evaluate the potential of the use of sugarcane vinasse as culture medium for the growth of the freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*. *C. vulgaris* is a robust species commonly used in the treatment of effluents. Laboratory tests were initially conducted with two distinct vinasses, a conventional and an originating from a agroecological processing, at different concentrations. Based on these results the conventional vinasse was selected for more detailed studies that aimed at treating the vinasse in defined procedures known as Toxicity Identification Evaluation (TIE). Through such procedure, we attempted to answer why it is so difficult to grow microalgae in sugarcane vinasse and how could the microalgal production be increased in such a complex residue. The results showed that pH adjustment resulted in the highest *Chlorella vulgaris* biomass in vinasse, whereas the addition of EDTA, sodium thiosulfate and XAD-8 resin to remove specific compounds from the wastewater limited the microalgal final yield. The growth of *C. vulgaris* was higher at intermediate treated vinasse concentrations (30 - 70%). This demonstrated the possibility of using of this residue as a medium for microalgal cultivation. Once selected the ideal condition for *C. vulgaris* cultivation (30% vinasse and TIE pH=3.0), there was a screening of the microorganisms present in the vinasse and in non axenic cultures of microalgae after its inoculation with *C. vulgaris*. The microorganisms were isolated and characterized for indole acetic acid (IAA) production, nitrogen fixation and inorganic phosphate solubilization. The presence of heterotrophic microorganisms in the vinasse did not affect the microalgal production. We obtained promising results about future applications of these microorganisms as growth promoters in microalgal cultures. The biomass produced showed protein productivity of 15.57 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and a decrease of nitrogen, sulfate, biochemical oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) contents in comparison with the initial vinasse was obtained. The results suggest the possibility of using vinasse as a medium for the cultivation of *C. vulgaris*, with decrease of the potential contaminant of the effluent and increase of biomass production when compared to synthetic culture medium.

**Keywords:** Effluents. Reuse. Biomass. Toxicity Identification Evaluation (TIE). Growth promoters.

## APRESENTAÇÃO

Microalga é um termo genérico, sem efeito taxonômico, que engloba uma série de micro-organismos de natureza distinta. O termo envolve tanto organismos eucarióticos quanto procarióticos, uma vez que se refere tanto às algas microscópicas *stricto sensu* quanto às cianobactérias, formalmente conhecidas como cianofíceas. As microalgas constituem um grupo heterogêneo e cosmopolita, sendo encontradas principalmente em ambientes aquáticos, mas também na superfície de vários tipos de solos (Madigan et al., 2004; Tomaselli, 2004).

Em escala comercial, o cultivo de microalgas iniciou-se no Japão, na década de 60, com espécies do gênero *Chlorella* sp. visando o uso da biomassa como suplemento alimentar. A partir daí, o cultivo e interesse nestes micro-organismos aumentaram gradativamente em todo o mundo, com a biomassa destinando-se às mais variadas aplicações, como a produção de proteínas unicelulares, lipídios, clorofila, carotenóides, enzimas, agentes antioxidantes, vitaminas e antibióticos (Pulz e Gross, 2004; Spolaore et al., 2006; Harun et al., 2010; Borowitzka, 2013).

No entanto, a produção de microalgas padece, ainda, de elevado custo. Assim, com objetivo de reduzir os custos de produção destes micro-organismos, seu cultivo tem sido proposto em águas residuárias. Além da possibilidade de se obter uma biomassa passível de utilização, seja na fertilização dos solos, na forma de proteínas unicelulares ou na obtenção de biocombustíveis, o cultivo em resíduos traz como vantagem adicional a redução do potencial contaminante dos efluentes. Sabe-se, por exemplo, que as microalgas possuem habilidade de remover nutrientes presentes em resíduos, tais como efluentes de estações de tratamento de esgoto, efluentes da produção do etanol, efluentes da suinocultura, dentre outros, incorporando-os à biomassa (Bastos et al., 2004; de-Bashan e Bashan, 2010; Ruiz-Marin et al., 2010; Marques et al., 2013).

O crescimento fotoautotrófico é atualmente o mais utilizado para o cultivo de microalgas, uma vez que se tratam de micro-organismos fotossintetizantes, com algumas espécies especialmente eficientes na conversão da energia solar (Perez-Garcia et al., 2011). Aliado a isso, há o fato da fixação fotossintética do CO<sub>2</sub> atmosférico ser desejável em decorrência dos problemas gerados pelo aquecimento global, tais como os extremos climáticos.

O emprego de efluentes, contudo, nem sempre se mostra simples. Por apresentarem cor e turbidez, limitam a penetração de luz e, conseqüentemente, comprometem o crescimento algal. Nestes casos, espécies mixotróficas ou heterotróficas assumem grande importância, pois na limitação ou ausência de luz são capazes de utilizar a matéria orgânica como fonte de energia para seus processos metabólicos. Contudo, a cor não é o único problema a ser considerado no cultivo de microalgas em águas residuárias. A composição química dos efluentes também pode resultar em toxicidade e, conseqüentemente, inibir o crescimento algal. Além disso, efluentes apresentam elevada carga microbiana, composta especialmente por fungos e bactérias, que também podem afetar o crescimento da microalga cultivada.

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar, com expectativa de produzir na safra 2015/2016 um volume de 28,66 bilhões de litros de álcool (CONAB, 2015). Com essa quantidade de álcool produzida, são gerados de 286 a 344 bilhões de resíduo líquido total, sendo a maior parte constituída por vinhaça, uma vez que este efluente é gerado na proporção de aproximadamente 10 - 12 litros para cada litro de etanol produzido (UNICA, 2011). Dentre todos os resíduos gerados pela indústria sucroalcooleira, a vinhaça representa um grande problema ambiental, pois apresenta elevado potencial eutrofizante.

A composição química da vinhaça varia dependendo da natureza e constituintes da matéria-prima, do sistema utilizado no preparo do mosto, do modo de condução da fermentação e da composição do vinho. A vinhaça apresenta baixo pH, elevados teores de matéria orgânica e sais inorgânicos, como sulfatos e fosfatos de potássio, além de cálcio, sódio e magnésio. Dentre os compostos orgânicos, o glicerol está presente em maior concentração e, em proporções menores, encontram-se ácido aconítico, sorbitol e ácido láctico, além de outros alcoóis e açúcares residuais, células de leveduras, substâncias insolúveis e substâncias voláteis (Larrañondo et al., 2000; Freire e Cortez, 2000; Cazetta e Celligoi, 2005; Medina, 2005; García e Rojas, 2006). A coloração marrom-escura da vinhaça é devida à presença de melanoidinas, polímeros de alta massa molecular formados pela reação de Maillard e compostos fenólicos (ácidos tânico e húmico). Em processos de biotratamentos de efluentes, a presença destas substâncias mostra-se frequentemente tóxica aos micro-organismos (Naik et al., 2008; Romanholo Ferreira et al., 2011).

No Brasil, após proibição do seu despejo em corpos d'água (Decreto Lei 303/1967), a vinhaça passou a ser aplicada em "áreas de sacrifício", locais próximos



às destilarias que se tornavam praticamente inutilizáveis para a agricultura, principalmente pelo efeito de salinização do solo ocasionado pela vinhaça. Com o surgimento do PROÁLCOOL e a conseqüente expansão da indústria sucroalcooleira no país, surgiu a necessidade de se dar um destino adequado ao efluente, que encontrou seu lugar como fonte de nutrientes para a própria cultura da cana-de-açúcar através da fertirrigação. A aplicação de vinhaça no solo fornece uma série de benefícios de natureza química, física e biológica (Freire e Cortez, 2000; Silva et al., 2007; Zayas et al., 2007). Entretanto, seu uso deve ser controlado, já que o excesso pode acarretar efeitos nocivos e queda na produtividade da cultura. Atualmente, a disposição de vinhaça no solo é regulada pelo teor de potássio no resíduo, uma vez que altas concentrações deste íon contribuem para saturação e salinização do solo (CETESB, 2006).

Devido à presença de nutrientes essenciais e à produção abundante no Brasil, o uso de vinhaça como meio nutritivo para o crescimento de microalgas pode ser um aspecto significativo no tocante à redução de custos de produção da biomassa microalgal.

Alguns autores têm relatado a utilização de vinhaça como meio para cultivo de microalgas (Oliveira e Cáceres, 1986; Öztürk e Demir, 2001; Valderrama et al., 2002; Mattos e Bastos, 2015) e cianobactérias (Barrocal et al., 2010; Coca et al., 2014; Santos et al., 2016), demonstrando a habilidade destes micro-organismos em se adaptar a este meio de cultura.

Em comum, a maioria dos estudos utiliza baixa proporção de vinhaça no meio de cultura para suportar crescimento ótimo de microalgas fotoautotróficas. Os motivos dessa diluição são ainda desconhecidos, mas podem estar relacionados à baixa penetração de luz em decorrência da coloração escura da vinhaça ou à presença de constituintes químicos específicos e de fato causadores de toxicidade.

A escassez de discussões mais profundas acerca das dificuldades de crescimento das microalgas em vinhaça e das baixas proporções utilizadas para cultivos microalgais foram as principais motivações desta pesquisa. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em vinhaça oriunda da produção de cana-de-açúcar, com foco na otimização da produção de biomassa.

Embora a coloração escura da vinhaça favoreça cultivos heterotróficos, é sabido que estes apresentam maiores problemas de contaminação e competição por

recursos do que cultivos fotoautotróficos. Em vinhaça, um meio já naturalmente contaminado, isso poderia ser agravado e comprometer a produção final de biomassa, tanto quantitativa quanto qualitativamente. Assim, optou-se pela realização de cultivos fotoautotróficos, conduzidos com uma cepa específica de *C. vulgaris* (LBA 01 – *C. vulgaris* ETE), isolada de uma estação de tratamento de esgoto do distrito de Água Vermelha (São Carlos, SP). Além disso, a escolha de microalga fotossintética teve por fundamento a importância da fixação biológica do CO<sub>2</sub> no contexto do efeito estufa e suas consequências.

*Chlorella vulgaris*, uma Chlorophyta de água doce, é uma das microalgas mais estudadas no tratamento de água residuárias. Pertencente à classe Trebouxiophyceae (AlgaeBase, 2015), apresenta forma de vida unicelular, podendo acumular pigmentos como clorofilas a e b, carotenos e xantofilas. A parede celular é composta por celulose e, tal como vegetais superiores, acumula amido como produto de reserva (Chapman, 1977; Raven et al., 1992; Tomaselli, 2004; Barsanti e Gualtieri, 2006). Sua biomassa é reconhecida pelo teor protéico, além de apresentar teores de nutrientes minerais como fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, cálcio e magnésio (Becker e Venkataraman, 1981).

Neste trabalho, inicialmente foram utilizadas duas vinhaças distintas, uma convencional e uma oriunda de um processamento totalmente agroecológico, denominada vinhaça orgânica, para avaliação do crescimento microalgal. Com base nos resultados obtidos, selecionou-se uma única vinhaça e intensificaram-se os estudos referentes aos aspectos da toxicidade do efluente à microalga, através de uma série de manipulações de natureza físico-química. Essas manipulações tiveram por objetivo alterar a biodisponibilidade de determinados compostos e permitir a inferência sobre qual composto poderia estar exercendo efeito tóxico à microalga. Por fim, partindo-se do princípio de que, em larga escala, a esterilização de efluentes não é viável dos pontos de vista econômico e energético, realizou-se a bioprospecção de micro-organismos associados à vinhaça e ao cultivo microalgal, a fim de isolar e identificar espécies que possam vir a ser utilizadas como estimulantes de crescimento de microalgas em futuros cultivos microalgais.

## Referências

AlgaeBase. Disponível em:

<[http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=27676](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27676)>. Acesso em: 29 dez. 2015.

Barrocal, V. M. et al. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beetvinasse in growth media. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 851-856, 2010.

Bastos, R. G. et al. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica Nægeli* na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 112-116, 2004.

Barsanti, L.; Gualtieri, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Bioengineering**. Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group, 2006. p.1-34.

Becker, E. W.; Venkataraman, L.V. **Biotechnology and Exploration of algae – The India Approach**. IGC/AICPA. Mangalore: Sharada, 1981. p.24-79.

Borowitzka, M. A. High-value products from microalgae - their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 743–756, 2013.

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

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

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

Coca, M. et al. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beetvinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Desenvolvimento (2015). Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2015. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_03\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 04 jan. 2015.

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

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

- García, A. O.; Rojas, C. A. C. Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. **Tecnicaña**, n. 17, v.9, p. 3-13, 2006.
- Harun, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037–1047, 2010.
- Larrahondo, J. E. et al. Compuestos orgánicos en vinaza. **Cenicaña**, v. 22, n. 3, p. 5-6, 2000.
- Madigan, M. T. et al. **Microbiología de Brok**. 10 ed. São Paulo; Prentice Hall Inc., 2004. 608p.
- Marques, S. S. I. et al. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1933–1943, 2013.
- Mattos, L. F. A. de; Bastos, R. G. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 20, 2016.
- Medina, G. B. Usos alternativos de las vinazas de acuerdo con su composición química. **Tecnicaña**, n. 17, v.9, p. 15-19, 2005.
- Naik, N. M. Microbial decolorization of spentwash: a review. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 41-48, 2008.
- Öztürk, L.; Demir, Y. The effects of vinasse on some growth parameters of algae. **Frenesius Environmental Bulletin**, v. 10, n. 1010, p. 766-771, 2001.
- Oliveira, H. T.; Cáceres, O. Resultados preliminares sobre o uso de vinhoto como meio de cultura para 8 espécies de microalgas de água doce. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v.1, p. 601-610, 1986.
- Perez-Garcia, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.
- Pulz, O.; Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635–648, 2004.
- Raven, P. H. et al. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1992. 728p.
- Romanholo Ferreira, L. F. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 2011.
- Ruiz-Marin, A. et al. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 58–64, 2010.

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

Silva, M. A. S. et al. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.

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

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

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 09 nov. 2015.

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

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

## CAPÍTULO 1

### USO DE VINHAÇAS CONVENCIONAL E ORGÂNICA PARA CULTIVO DA *CHLOROPHYTA CHLORELLA VULGARIS*

#### **Resumo**

As microalgas têm sido estudadas visando às mais diversas aplicações. No entanto, seu custo de produção é ainda elevado, tornando-se importante encontrar alternativas para minimizá-lo, tal como o cultivo em águas residuárias. O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar, gerando de 10 a 12 L de vinhaça por L de etanol produzido. A vinhaça é um efluente potencialmente tóxico cujo descarte é regulado pelo governo, e sua aplicação na produção de microalgas poderá contribuir para minimizar sua toxicidade, além de baixar os custos de produção destes microorganismos. Este trabalho avaliou o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em duas vinhaças distintas: uma proveniente de processo convencional de produção de etanol e outra oriunda de um processamento totalmente agroecológico, denominada vinhaça orgânica. Testes laboratoriais foram conduzidos em ambas as vinhaças, utilizando-se diferentes concentrações do efluente (10, 30, 40, 50, 70, 90 e 100%), com e sem adição de nutrientes minerais. Embora tenha crescido nas duas vinhaças, a microalga apresentou maiores taxas de crescimento na vinhaça convencional. Para ambas as vinhaças, a adição de nutrientes foi importante para aumentar a densidade final de células quando utilizada a concentração de 10% dos efluentes, mas não foi essencial para concentrações maiores. Os resultados demonstraram que a utilização de vinhaça é uma alternativa economicamente viável e promissora no tocante ao reuso deste efluente para obtenção de biomassa microalgal.

**Palavras-chave:** Microalga; Águas residuárias; Efluente.

## **CHAPTER 1**

### **USE OF CONVENTIONAL AND ORGANIC VINASSES FOR THE ULTIVATION OF CHLOROPHYTA *CHLORELLA VULGARIS***

#### **Abstract**

Although microalgae are grown around the world, its production cost is still high. In this research we evaluated sugarcane vinasse, the wastewater generated through sugarcane ethanol production, as culture medium for microalgae growth. In Brazil for the production of 1 L of alcohol, about 10 – 12 L of vinasse are generated. Vinasse is harmful if discarded in the environment, so such activity is regulated by specific legislation. The use of such residue to grow microalgae have two advantages, first to remediate the residue that is high in nutrients so decreasing its eutrophication potential, and second to decrease microalgae production costs. Two distinct vinasses, a conventional and another originating from an agroecological processing and named organic vinasse, were tested as culture medium for the microalgae *Chlorella vulgaris*. Laboratory cultures were conducted in both vinasses using different concentrations (10, 30, 50, 70, 90 and 100%) with and without addition of mineral nutrients. The control had no vinasse and consisted of synthetic culture medium. The results showed that the *C. vulgaris* grew in either vinasse, but higher cell yield was achieved in the conventional one. Nutrient addition was important to increase cell density at 10% vinasse concentration, but it was not essential at concentrations above this. The results demonstrated that growing microalgae in vinasse can be an economic and promising alternative for the reuse of the residue, so generating microalgae biomass.

**Keywords:** Microalgae; Wastewater; Stillage.

## 1 Introdução

Microalgas são organismos versáteis que podem ser aplicados para diversos fins, como a remediação de resíduos, utilização para alimentação animal e humana, produção de biocombustíveis e síntese de compostos para as indústrias farmacêutica e de cosméticos (Harun et al., 2010; Priyadarshani e Rath, 2012; Benemann, 2013; Borowitzka, 2013). Embora existam grandes possibilidades e pesquisas com microalgas aconteçam em vários países, o custo de produção destes micro-organismos é ainda elevado. Os meios de cultura sintéticos utilizados para o cultivo de microalgas são complexos e incluem vários elementos minerais, como nitrogênio, fósforo e potássio, além de elementos-traço e, em alguns casos, compostos orgânicos como vitaminas (Andersen, 2005; El Nabris, 2012).

Como forma de reduzir o custo de produção das microalgas, seu cultivo em águas residuárias tem sido proposto na literatura (Tam e Wong, 1996; Martínez et al., 2000; Kim et al., 2010; Feng et al., 2011). Neste sentido, efluentes agroindustriais são particularmente interessantes dada à presença de elementos nutritivos em sua composição. No entanto, estes efluentes podem também apresentar componentes tóxicos e coloração escura, podendo afetar o processo fotossintético durante os cultivos microalgais (Bhatnagar et al., 2011; Heredia-Arroyo et al., 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol a partir de cana-de-açúcar, com previsão de produção de cerca de 28,6 bilhões de L na safra 2015/16 (CONAB, 2015). Dentre todos os resíduos gerados pela indústria sucroalcooleira, a vinhaça se destaca tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo, uma vez que é gerada na proporção de 10 a 12 L para cada litro de etanol produzido. Em virtude dos elevados teores de matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade, altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), além da elevada temperatura com que deixa os destiladores, a vinhaça apresenta alto poder poluente (Freire e Cortez, 2000; Silva et al., 2007). Por isso, seu descarte é proibido em corpos d'água e, em solos, deve ser feito de maneira controlada. No Brasil, a fertirrigação dos solos com vinhaça é uma prática difundida, acarretando benefícios aos solos e aumento da produtividade da cultura da cana-de-açúcar (Freire e Cortez, 2000; Paulino et al., 2002; Silva et al., 2007). No entanto, é essencial que se tenha conhecimento da quantidade de vinhaça a ser disposta no solo, uma vez que o excesso pode acarretar queda na produtividade das culturas devido aos efeitos adversos nas propriedades físico-químicas do solo



(Klein e Libardi, 2002; Paulino et al., 2002; Lyra et al., 2003; Manhães et al., 2003; Uyeda 2009; Paulino et al., 2011). Atualmente, a disposição de vinhaça no solo é regulada com base no teor de potássio (CETESB, 2006), uma vez que altas concentrações deste íon contribuem para a saturação do solo, podendo causar salinização.

Considerando as suas propriedades nutritivas, a vinhaça tem sido estudada como fonte de nutrientes para o crescimento de microalgas, contribuindo para remediar o resíduo ao mesmo tempo em que se obtém uma biomassa passível de utilização. No entanto, o uso de efluentes para o cultivo algal é ainda um desafio e, no caso da vinhaça, devido à sua coloração escura, pode ser necessário trabalhar com baixas concentrações ou realizar um tratamento prévio do efluente. Em estudo pioneiro, Oliveira e Cáceres (1986) investigaram o crescimento de *Chorella vulgaris* em 0,1% de vinhaça. Os autores utilizaram vinhaça liofilizada adicionada ao meio de cultivo e observaram densidade final de células de  $1,6 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup>, cerca de 2,5 vezes maior à observada nos cultivos controle em meio Bristol. Valderrama et al. (2002), objetivando desenvolver um processo biológico para tratamento de efluente oriundo do processamento de etanol e ácido cítrico, utilizaram a microalga *C. vulgaris* e a macrófita *Lemna minuscula*, com o efluente diluído a 10%. Na Espanha, um grupo de pesquisadores tem estudado o crescimento da cianobactéria *Spirulina* sp. em vinhaça a fim de obter proteína celular (*single cell protein* - SCP). González-Benito et al. (2009) avaliaram o crescimento de *S. maxima* em meio Schlösser suplementado com vinhaça e obtiveram 3,3 e 3,7 g L<sup>-1</sup> SCP quando utilizadas 5 e 10 g L<sup>-1</sup> de vinhaça, respectivamente. Barrocal et al. (2010) conduziram testes com *S. maxima* em meio suplementado com 1, 2, 5 e 7 g L<sup>-1</sup> de vinhaça e obtiveram concentração de biomassa de 4,8 g L<sup>-1</sup> e taxa específica de crescimento de 0,17 d<sup>-1</sup> na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> de vinhaça. Por fim, Coca et al. (2014), durante cultivo de *S. platensis* em um fotobioreator do tipo *airlift* contendo 1 g L<sup>-1</sup> de vinhaça, obtiveram máximas concentrações de biomassa e de proteínas de 6,5 g L<sup>-1</sup> e 168 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, respectivamente.

Todos estes estudos sugerem que a diluição de vinhaça é inevitável para se obter satisfatório crescimento microalgal. Na presente pesquisa será avaliado o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) em uma ampla gama de concentrações (0 a 100%) de duas vinhaças distintas. Pela primeira vez um estudo se propõe a comparar o crescimento de *C. vulgaris* em vinhaça convencional e em uma vinhaça oriunda de um processamento totalmente

agroecológico, denominada vinhaça orgânica, com e sem a adição de nutrientes minerais.

## 2 Material e Métodos

A microalga *Chlorella vulgaris* (LBA 01 – *C. vulgaris* ETE) foi isolada de uma estação de tratamentos de esgoto do distrito de Água Vermelha (São Carlos, SP, Brasil). A cultura foi mantida e propagada em condições assépticas na coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia de Algas (CCBS – UFSCar) em meio LC Oligo (AFNOR, 1980). Condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2$  °C) e fotoperíodo (12/12 horas, claro/escuro) foram mantidas tanto para o inóculo quanto para os experimentos, com intensidade luminosa incidente nos frascos de cultivo de  $150 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A microalga foi inoculada em duas vinhaças distintas, uma convencional e uma orgânica. A vinhaça convencional foi coletada diretamente de colunas de destilação da usina Santa Lúcia (Araras, SP), enquanto a vinhaça orgânica foi obtida de tanques de decantação situados imediatamente após as colunas de destilação da usina São Francisco (Sertãozinho, SP).

A vinhaça convencional foi gerada a partir de procedimentos padrões utilizados para o cultivo da cana-de-açúcar, com uso de agroquímicos como pesticidas, herbicidas, inseticidas, fertilizantes e condicionadores do solo, enquanto a vinhaça orgânica foi gerada seguindo os procedimentos nacionais para cultivos orgânicos, sem adição de insumos químicos. Após coletadas, as vinhaças foram encaminhadas ao laboratório e processadas para remoção do material particulado através de filtração em uma sequência de cinco peneiras granulométricas: 0,590; 0,210; 0,177; 0,125 e 0,053 mm de abertura (Telastem, Brasil). As vinhaças foram acondicionadas em garrafas plásticas e mantidas congeladas até o momento da sua utilização. Para os experimentos, as vinhaças foram descongeladas, centrifugadas ( $2516 \times g$ , 10 min; Thermo Scientific, EUA), filtradas em membranas de fibra de vidro ( $\sim 1,0 \mu\text{m}$ , Macherey-Nagel®) e tiveram o pH ajustado para  $7,0 \pm 0,2$ . Previamente ao ajuste do pH, os teores de carbono orgânico total (COT) foram avaliados em ambas as vinhaças (TOC-L, Shimadzu, Japão). A Tabela 1 apresenta a caracterização físico-química das vinhaças utilizadas no estudo após as etapas de peneiramento, centrifugação e filtragem em membranas de fibra de vidro.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química das vinhaças e composição nutricional do meio LC Oligo utilizado para o cultivo de *Chlorella vulgaris*. DBO<sub>5</sub>: demanda bioquímica de oxigênio; DQO: demanda química de oxigênio; COT: carbono orgânico total. Valores em mg L<sup>-1</sup>; \*Valor não determinado.

| Parâmetro <sup>1</sup>                               | Vinhaça convencional | Vinhaça orgânica | LC OLigo |
|--|----------------------|------------------|----------|
| Sólidos suspensos totais                             | 500                  | 700              | *        |
| pH   | 4,25                 | 4,61             | 7,00     |
| DBO <sub>5</sub>                                     | 15735                | 18128            | *        |
| DQO  | 23735                | 27295            | *        |
| COT  | 7429                 | 7926             | 5,634    |
| Nitrogênio nítrico (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )   | <11,4                | <22,8            | 56,3     |
| Nitrogênio nitroso (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )   | <0,3                 | <0,6             | 0        |
| Nitrogênio amoniacal (NH <sub>3</sub> )              | 4,17                 | 5,18             | 0        |
| Nitrogênio amoniacal (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) | *                    | *                | 2,025    |
| Nitrogênio Kjeldahl                                  | 15,7                 | 120,4            | 21,76    |
| Sódio (Na)   | 5,73                 | 6,35             | 4,06     |
| Cálcio (Ca)  | 600                  | 695              | 1,15     |
| Potássio (K)   | 2400                 | 4598             | 8        |
| Magnésio (Mg)  | 237                  | 174              | 0,5      |
| Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )              | 2638                 | 3055             | 8,08     |
| Fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )              | <2,0                 | <4,0             | 11,92    |
| Cobre (Cu)   | *                    | *                | 0,001    |
| Molibdênio (Mo)                                      | *                    | *                | 0,009    |
| Zinco (Zn)   | *                    | *                | 0,0015   |
| Cobalto (Co)   | *                    | *                | 0,0017   |
| Manganês (Mn)  | *                    | *                | 0,002    |
| Boro (B)   | *                    | *                | 0,0009   |
| Ferro (Fe)   | *                    | *                | 0,085    |

Os experimentos consistiram em cultivos de *C. vulgaris* nas vinhaças diluídas em concentração final de 10%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% e 100%, com e sem adição de nutrientes minerais. As vinhaças foram diluídas em água destilada e a adição de nutrientes foi feita de acordo com as concentrações do meio LC Oligo, independentemente da concentração de vinhaça (Tabela 1). O tratamento controle (0%) correspondeu ao meio LC Oligo, sem adição de vinhaça. As culturas de *C. vulgaris* (50 mL) foram mantidas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com inóculo de  $\sim 10^5$  cél mL<sup>-1</sup> composto por células previamente centrifugadas (906 x g, 10 min, Thermo Scientific, EUA) obtidas de uma cultura em fase exponencial de crescimento.

<sup>1</sup> Análises realizadas pela ASL – Análises Ambientais (Rio Claro – SP), exceto COT. Metodologias em anexo.

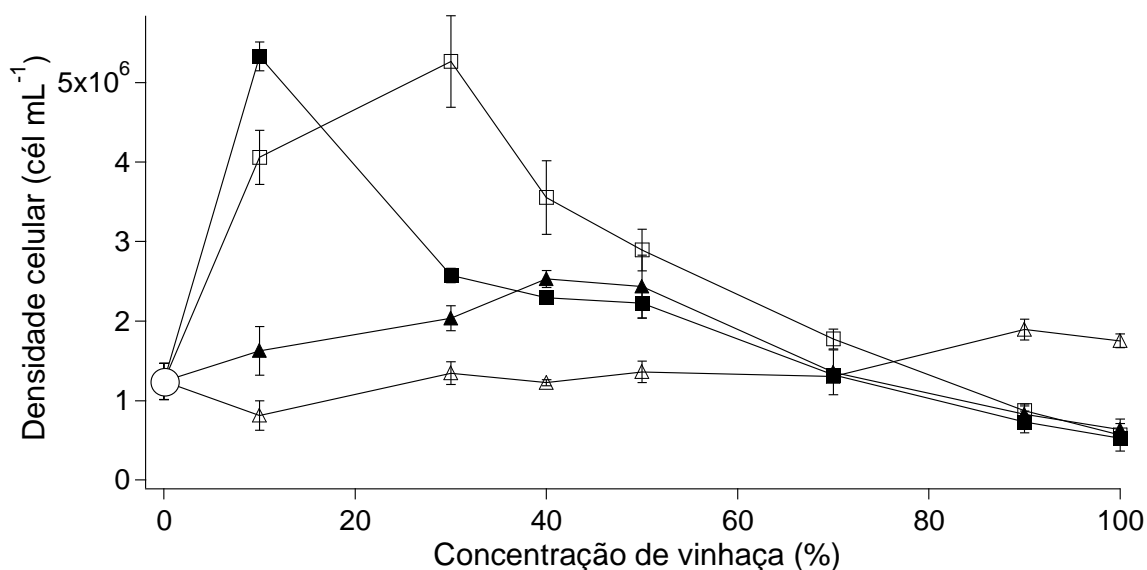
Previamente à inoculação, a viabilidade das células da microalga foi avaliada através do rendimento quântico máximo do fotossistema II usando-se um fluorômetro de pulso e amplitude modulada (Phyto-PAM, Walz, Alemanha). Para esta avaliação, as células foram adaptadas por 20 minutos no escuro e valores entre 0,71 e 0,73 foram considerados como células saudáveis (Juneau et al., 2002; Lombardi e Maldonado, 2011).

Os cultivos experimentais foram conduzidos por 96 horas (ABNT, 1992), com amostragens a cada 24 horas para acompanhamento dos perfis de pH (Logen Scientific LS, Brasil), oxigênio dissolvido (sonda HACH LDO 10101 acoplada ao multianalisador HACH HQ 40d, EUA) e densidade celular, com determinação através de contagem direta das células em microscópio óptico (Biofocus Equipamentos, Brasil) utilizando-se câmara de Fuchs-Rosenthal espelhada. As taxas específicas de crescimento ( $\mu$ , em  $\text{dia}^{-1}$ ) foram obtidas através da representação gráfica do logaritmo natural das densidades de células em função do tempo, obtendo-se a regressão linear para a fase de crescimento exponencial da microalga. O coeficiente angular do ajuste da reta representa a taxa de crescimento específica da microalga.

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata utilizando delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey a 5%, conforme a necessidade.

### 3 Resultados

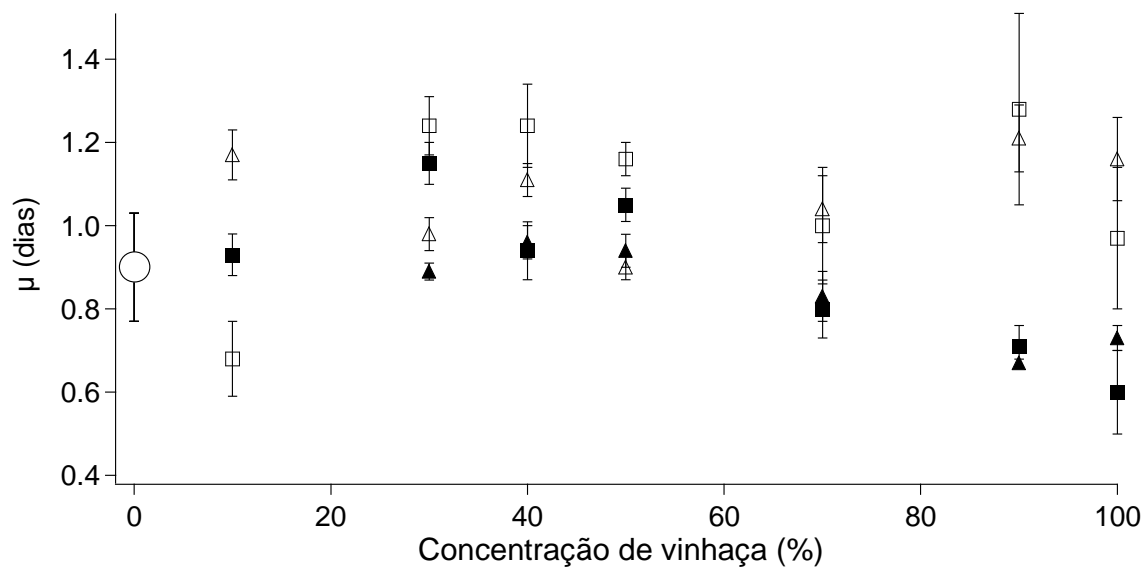
A Figura 1 apresenta as densidades celulares de *C. vulgaris* nas diferentes concentrações de vinhaça após 96 horas de cultivo. Em geral, quanto maior a concentração de vinhaça menor a densidade final de células obtida. Entre os tratamentos controle não houve diferença estatística na densidade final de células da microalga ( $p > 0,05$ ). A adição de nutrientes estimulou a produção de biomassa em 10 – 50% de vinhaça, tanto orgânica quanto convencional, mas não causou incremento significativo nas maiores concentrações do efluente. Na menor concentração avaliada (vinhaça 10%), para ambas a vinhaças, os cultivos suplementados com nutrientes resultaram em densidades de células cerca de 4,5 vezes maiores do que as verificadas nos cultivos não suplementados ou nos tratamentos controle, ao final de 96 horas.



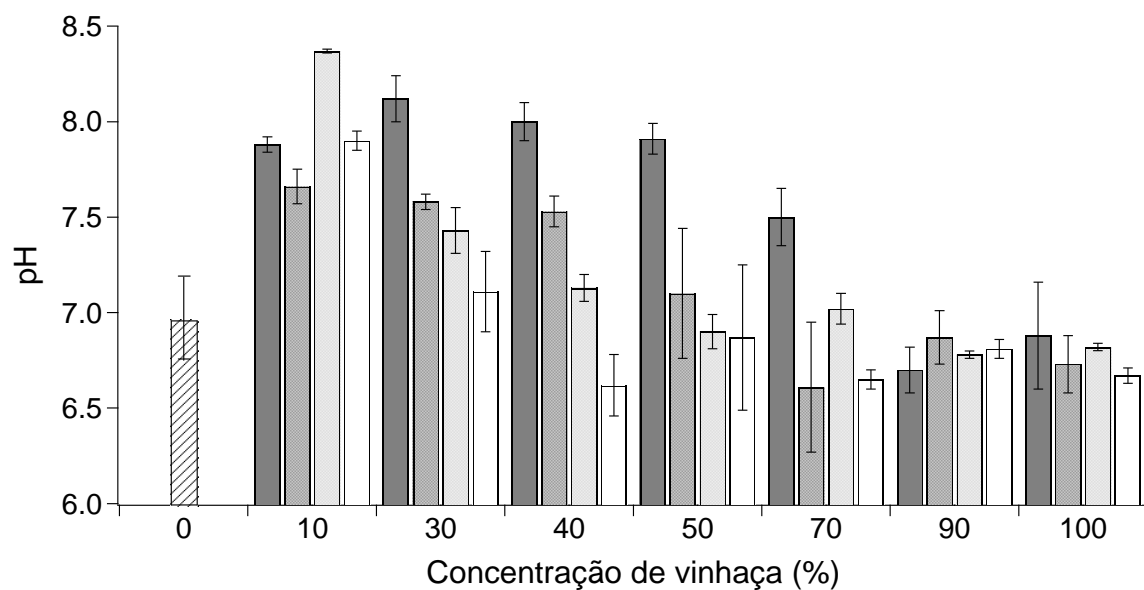
**Figura 1.** Densidades celulares de *Chlorella vulgaris* após 96 horas de cultivo em vinhaça. □ = vinhaça convencional com nutrientes; △ = vinhaça convencional sem nutrientes; ■ = vinhaça orgânica com nutrientes e ▲ = vinhaça orgânica sem nutrientes. ○ = Média dos tratamentos controle ( $1,24 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>; n=12).

A Figura 2 apresenta as taxas específicas de crescimento obtidas durante os cultivos de *C. vulgaris* em vinhaça. Em geral, concentrações de vinhaça entre 10% e 50% resultaram nas maiores taxas específicas de crescimento, especialmente nas culturas suplementadas com nutrientes minerais. Comparando-se a vinhaça convencional com a orgânica, as taxas específicas de crescimento foram estatisticamente similares nas vinhaças <90%, mas nas maiores concentrações (90 e 100%) melhores taxas foram obtidas na vinhaça convencional. As maiores taxas específicas de crescimento ( $\sim 1,25$  d<sup>-1</sup>) foram obtidas quando se utilizou 30, 40 e 90% de vinhaça convencional suplementada com nutrientes. Ao contrário de 30 e 40%, contudo, na condição 90% vinhaça convencional suplementada a alta taxa específica de crescimento não refletiu em elevada densidade de células da microalga. Os tratamentos controles apresentaram taxa específica de crescimento média de  $0,89 \pm 0,13$  d<sup>-1</sup>.

O pH final das culturas de *C. vulgaris* é apresentado na Figura 3. Os maiores valores finais de pH foram obtidos quando a microalga foi cultivada nas menores concentrações de vinhaça (10 – 40%), sugerindo maior atividade fotossintética nestas condições. Nos frascos controle, os maiores valores de pH foram verificados até 48h de cultivo (pH máximo = 8,4), coincidindo com a fase exponencial de crescimento da microalga.



**Figura 2.** Taxas específicas de crescimento ( $\mu$ , dia<sup>-1</sup>) de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça. □ = vinhaça convencional com nutrientes; Δ = vinhaça convencional sem nutrientes; ■ = vinhaça orgânica com nutrientes e ▲ = vinhaça orgânica sem nutrientes. ○ = Média dos tratamentos controle (n=12).



**Figura 3.** Valores de pH após 96 h de cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça. Barra preta: vinhaça convencional com nutrientes; barra cinza escura: vinhaça convencional sem nutrientes; barra cinza clara: vinhaça orgânica com nutrientes; barra branca: vinhaça orgânica sem nutrientes. Barra hachurada = média dos tratamentos controle (n=12).

A concentração de oxigênio dissolvido (OD) nos frascos de cultura foi medida diariamente e observou-se que, após o segundo dia de incubação, houve depleção do oxigênio em todos os tratamentos, exceto no controle, cujo valor foi de  $8,46 \pm 0,09$  mg L<sup>-1</sup> ao final de 96 horas. Como não houve variação na concentração de OD entre os tratamentos contendo vinhaça, os dados não foram aqui apresentados.

#### 4 Discussão

As maiores densidades celulares de *C. vulgaris* nas concentrações 10, 30, 40 e 50% de vinhaça, comparativamente ao controle, demonstram a habilidade desta microalga em crescer neste efluente, que é rico em matéria orgânica (> 7400 mg L<sup>-1</sup> COT). Isso pode estar relacionado à natureza mixotrófica da *C. vulgaris* utilizada, uma vez que foi isolada a partir de uma estação de tratamento de esgoto, ambiente com elevado conteúdo de materiais orgânicos. De fato, a literatura mostra que alguns gêneros de *Chlorella*, como *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa* e *C. minutissima* apresentam metabolismo mixotrófico (Bhatnagar et al., 2011; Abreu et al., 2012; Mitra et al., 2012; Wang et al., 2012). Chojnacka e Marquez-Rocha (2004) avaliaram as relações cinéticas e estequiométricas do metabolismo energético e de carbono em cultivos microalgais e salientam que, embora a presença de luz seja essencial em cultivos mixotróficos, a energia luminosa requerida para a ativação enzimática é menor do que a necessária para o crescimento fotoautotrófico. Além disso, segundo os autores, a adição de substratos orgânicos em cultivos algais mixotróficos resulta em aumento da taxa de crescimento e da concentração final de biomassa, uma vez que ambos os metabolismos, autotrófico e heterotrófico, ocorrem simultaneamente e independentemente. Nossos resultados sugerem que isso pode ter ocorrido nos cultivos de *C. vulgaris* em baixas concentrações de vinhaça (10 - 50%).

Assumindo que todos os nutrientes presentes nos tratamentos controle (LC Oligo) sejam necessários para o crescimento da *C. vulgaris*, pode-se inferir que nem todos os nutrientes presentes no meio sintético estivessem presentes na vinhaça, resultando em limitação nutricional e, conseqüentemente, menor crescimento da microalga quando os nutrientes não foram adicionados. Minerais como boro, cobre, manganês, zinco, molibdênio, cobalto e selênio, considerados elementos traço, participam de reações enzimáticas e biossíntese de compostos específicos durante o

metabolismo microalgal (Grobbelaar, 2004). Embora provavelmente presentes na vinhaça (Freire e Cortez, 2000; Christofolletti et al., 2013; Silva et al., 2013), tais nutrientes foram diluídos na vinhaça 10% e, tendo sua concentração reduzida em 90%, passaram a ser limitantes nos cultivos não suplementados.

Neste estudo as menores densidades de células da microalga foram verificadas nas maiores concentrações de vinhaça (70 – 100%), o que pode, em parte, ser atribuído à menor penetração de luz no interior dos frascos de cultivo. Ramirez et al. (2014), utilizando concentrações crescentes de vinhaça em meio de cultura Guillard modificado, obtiveram melhor crescimento de *Scenedesmus* sp. em diluições inferiores a 40% do efluente, atribuindo o menor crescimento da microalga nas concentrações superiores de vinhaça à baixa penetração de luz nos frascos de cultivo devido à coloração escura do efluente. Entretanto, não se pode descartar a presença de componentes potencialmente tóxicos na vinhaça. A amônia (NH<sub>3</sub>), por exemplo, um composto tóxico para micro-organismos (Collos e Harrison, 2014), foi detectada em concentrações de 4,17 e 5,18 mg L<sup>-1</sup> nas vinhaças convencional e orgânica, respectivamente (Tabela 1), podendo ser responsável pela inibição do crescimento da microalga quando utilizadas as maiores concentrações de vinhaça.

Devido à ausência de agroquímicos, esperava-se um melhor crescimento da *C. vulgaris* na vinhaça orgânica. Porém, com base nos resultados, essa hipótese não foi confirmada. Em geral, observou-se maior crescimento da microalga na vinhaça convencional em comparação com a orgânica, com exceção das concentrações intermediárias de vinhaça sem nutrientes (30 – 50%), que apresentaram crescimentos similares. O melhor desempenho da microalga na vinhaça convencional pode ser devido à introdução de elementos nutritivos em maiores concentrações nesta em relação à vinhaça orgânica devido ao uso intenso de agroquímicos. Os agroquímicos podem ter adicionado à vinhaça elementos-traço ou outros nutrientes benéficos para a microalga. Embora a concentração destes elementos não tenha sido determinada nas vinhaças utilizadas, a literatura tem relatado sua presença em vinhaça (Freire e Cortez, 2000; Christofolletti et al., 2013; Silva et al., 2013).

Taxas específicas de crescimento de 1,24 d<sup>-1</sup> e ~1,0 d<sup>-1</sup> foram obtidas para a vinhaça convencional 30 e 40% com e sem adição de nutrientes, respectivamente. Estes valores são maiores do que os relatados na literatura para *C. vulgaris* cultivada em resíduos orgânicos. Ruiz-Marin et al. (2010), investigando o crescimento e remoção de nutrientes por células livres e imobilizadas de *C. vulgaris* e *Scenedesmus*



sp. em efluente sintético, obtiveram máxima taxa de crescimento de  $0,38 \text{ d}^{-1}$  para *C. vulgaris*, valor cerca de 3 vezes menor do que o que obtivemos. Abreu et al. (2012), utilizando resíduo lácteo (soro de queijo) para cultivo de *C. vulgaris*, obtiveram máxima taxa de crescimento de  $0,47 \text{ d}^{-1}$ , ou seja, 2,6 vezes menor do que a obtida neste trabalho. Cultivando *C. zoofingiensis* em efluente da suinocultura, Zhu et al. (2013) observaram máxima taxa de crescimento de  $0,34 \text{ d}^{-1}$ , enquanto Gan et al. (2014) verificaram taxa de  $0,16 \text{ d}^{-1}$ . Kumar et al. (2010) avaliaram a influência de nutrientes, frequência de alimentação e fonte de inóculo no crescimento de *C. vulgaris* em meio mineral enriquecido com efluente da suinocultura e obtiveram máxima taxa de crescimento de  $0,4 \text{ d}^{-1}$  na concentração 2% do efluente. Esses autores obtiveram densidade de células máxima de  $\sim 1,2 \times 10^6 \text{ céls mL}^{-1}$  após 6 dias de cultivo. No presente estudo, foi obtida densidade celular de  $5,3 \times 10^6 \text{ céls mL}^{-1}$  após 5 dias de cultivo em vinhaça orgânica 10% (taxa de crescimento =  $0,93 \text{ d}^{-1}$ ) e em vinhaça convencional 30% (taxa de crescimento =  $1,24 \text{ d}^{-1}$ ), ambas suplementadas com nutrientes. Marques et al. (2013) cultivaram *C. vulgaris* em vinhaça biodigerida e obtiveram máxima taxa de crescimento de  $0,76 \text{ d}^{-1}$ . Taxas de crescimento tão elevadas quanto  $1,24 \text{ d}^{-1}$  equivalem a quase duas duplicações por dia, demonstrando a possibilidade de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça oriunda da produção de cana-de-açúcar, embora ainda seja necessário diluir o efluente.

Em nosso estudo, vale ressaltar que altas taxas de crescimento nem sempre corresponderam à elevadas densidades de células da microalga. Em vinhaça convencional suplementada, a taxa específica de crescimento obtida em vinhaça 90% ( $1,28 \text{ d}^{-1}$ ) foi 2x maior que a verificada em vinhaça 10% ( $0,68 \text{ d}^{-1}$ ). As altas taxas de crescimento podem ser, em parte, atribuídas à vitalidade das células da microalga no momento da inoculação, uma vez que só foram utilizados inóculos cujas células apresentaram rendimento quântico máximo do fotossistema II  $\geq 0,70$ . Uma vez que o rendimento quântico máximo do PS II representa a capacidade das células converterem energia luminosa em química (Juneau et al., 2002), a utilização de células saudáveis resultou em elevadas taxas de crescimento mesmo quando não se obteve densidades celulares tão elevadas. Além disso, enquanto na concentração 10% vinhaça convencional suplementada a microalga não apresentou fase lag, em 90% houve fase lag de 48 horas. Como as taxas específicas foram calculadas sempre durante a fase exponencial de crescimento, e esta não correspondeu ao período total

de cultivo da microalga, isso poderia explicar a não correspondência entre a taxa de crescimento e a densidade de células nestas condições.

No presente estudo, o pH 8,4 observado em vinhaça orgânica 10% suplementada com nutrientes não coincidiu com a maior taxa específica de crescimento, como poderia ser esperado em situação de meio inorgânico. Isto se deve ao fato de que a fixação fotossintética do CO<sub>2</sub> resulta em deslocamento do pH para a alcalinidade. Nesta condição, contudo, foi verificada a maior densidade de células de *C. vulgaris*, indicando a presença de metabolismo fotoautotrófico na microalga, com consumo de CO<sub>2</sub> (Chojnacka e Marquez-Rocha, 2004). Por outro lado, a redução de pH de 7,0 para 6,6 obtida em várias concentrações de vinhaça pode estar relacionada ao metabolismo heterotrófico ou à atividade de bactérias e leveduras no interior dos frascos de cultivo, uma vez que os cultivos foram feitos em vinhaça não estéril. Segundo Molinuevo-Salces et al. (2013), a redução do pH em cultivos microalgais mantidos em resíduos orgânicos é um indicativo da presença de atividade bacteriana. Os autores investigaram a degradação de efluente da suinocultura por *Oocystis* sp. e *Scenedesmus* sp. e relacionaram a redução do pH dos cultivos com a atividade nitrificante das bactérias presentes no efluente. Nossos resultados relativos aos cultivos em vinhaça 40 e 50%, onde não se detectou variação do pH, concordam com os de Chojnacka e Marquez-Rocha (2004) e Kong et al. (2011). Esses autores argumentam que, normalmente, em cultivos mixotróficos o pH final dos ensaios dependerá do metabolismo dominante, autotrófico ou heterotrófico, mantendo-se usualmente constante ao longo dos cultivos (Chojnacka e Marquez-Rocha, 2004; Kong et al., 2011).

A depleção de oxigênio dissolvido observada nos cultivos de *C. vulgaris* resulta, possivelmente, da intensa atividade microbiana concomitante ao crescimento da microalga. Uma vez que a vinhaça apresenta em sua composição, além de compostos orgânicos como glicerol, sorbitol, ácido láctico, alcoóis e açúcares residuais, restos de células de leveduras (Larrañondo et al., 2000; Freire e Cortez, 2000; Medina, 2005; García e Rojas, 2006) e bactérias associadas (España-Gamboa et al., 2011), o consumo de oxigênio era esperado. Contudo, as baixas concentrações de oxigênio dissolvido, bem como a presença da microbiota não algal, não parece ter comprometido o crescimento da *C. vulgaris* nas concentrações de 10-50% de vinhaça. Segundo Haas et al. (2014), algumas espécies de algas são capazes de tolerar concentrações de oxigênio dissolvido tão baixas quanto 2 – 4 mg L<sup>-1</sup>. Similar ao nosso

estudo, Mezzari et al. (2013) avaliaram as interações entre *Chlorella* sp. e bactérias durante o tratamento de efluente da suinocultura e observaram teores de oxigênio dissolvido de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  e, ainda assim, crescimento satisfatório da microalga. Além disso, a literatura mostra que a presença de bactérias pode ser benéfica para o crescimento de organismos fotossintéticos. Liang et al. (2013) verificaram estímulo ao crescimento de *C. vulgaris* quando a microalga foi mantida em efluente contaminado com *Bacillus licheniformis*. Os autores destacaram que a bactéria pode ter atuado como promotora de crescimento da microalga, sugerindo seu consórcio como um sistema potencial para o tratamento de efluentes. Zhao et al. (2014) adotaram um consórcio de *C. pyrenoidosa* e bactérias nativas para tratamento de um resíduo composto por efluente municipal e lixiviado de aterro sanitário e verificaram remoção de 90% do nitrogênio total, bem como de substâncias húmicas presentes no lixiviado. Investigando efluente municipal, de-Bashan et al. (2004, 2008) relataram associação benéfica entre bactérias e as microalgas *C. vulgaris* e *C. sorokiniana*, com significativo incremento no crescimento algal. De acordo com Zhang et al. (2012), o resultado benéfico do consórcio alga-bactéria consiste em, à medida que as algas oferecem nutrientes e materiais orgânicos para as bactérias, estas devolvem íons resultantes da decomposição destes materiais, contribuindo para um melhor desenvolvimento da microalga.

Este estudo demonstrou a viabilidade de cultivo da microalga *C. vulgaris* tanto em vinhaça orgânica quanto convencional diluídas. Baixas concentrações de vinhaça (10%) necessitaram da adição de nutrientes minerais para suportar o crescimento algal, mas isso não foi necessário quando se utilizou maiores concentrações dos efluentes, especialmente o convencional. Estes resultados são promissores quando se considera o alto custo de produção dos meios sintéticos normalmente utilizados para cultivo de microalgas (Bhatnagar et al., 2011; Abreu et al., 2012), bem como a importância de se dispor adequadamente a vinhaça gerada nas usinas de produção de etanol brasileiras. É importante ressaltar, contudo, que a biomassa produzida é composta tanto por algas quanto bactérias contaminantes, vetando sua utilização para determinados propósitos, como o de suplemento alimentar. Entretanto, a biomassa é passível de utilização para outras diversas finalidades, como a produção de biocombustíveis, fertilização do solo ou alimentação animal, constituindo-se em uma alternativa promissora tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.

## 5 Referências

Abreu, A.P. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–66, 2012.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Projeto NBR 12.648**. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*). In: Norma Brasileira nº 12.648. Rio de Janeiro, 1992.

Andersen, R.A. **Algal culturing techniques**. California, USA: Academic Press, Elsevier Science, 2005.

AFNOR – Association Française de Normalisation. **Norme experimental T90-304**. Essais d'écotoxicité. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. AFNOR: 1980.

Barrocal, V.M. et al. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, v. 27, p. 851-856, 2010.

Benemann, J. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. **Energies**, v. 6, p. 5869-5886, 2013.

Bhatnagar, A. et al. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, p. 3425–3431, 2011.

Borowitzka, M. A. High-value products from microalgae - their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 743–756, 2013.

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

Chojnacka, K.; Marquez-Rocha, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, p. 21-34, 2004.

Christofolletti, C.A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, p. 2752–2761, 2013.

Coca, M. et al. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2014.

Collos, Y.; Harrison, P. J. Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 80, p. 8–23, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Desenvolvimento (2015). Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2015. Disponível em:

<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_03\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 04 jan. 2015.

de-Bashan, L. E. et al. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. **Water Research**, v. 38, p. 466–474, 2004.

de-Bashan, L.E. et al. Involvement of indole-3-acetic acid production by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 44, p. 938–947, 2008.

El Nabris, K. J. A. Development of cheap and simple culture medium for the microalgae *Nannochloropsis* sp. based on agricultural grade fertilizers available in the local market of Gaza Strip (Palestine). **Journal of AL-Azhar University – Gaza (Natural Sciences)**, v. 14, p. 61-76, 2012.

España-Gamboa, E. et al. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 0, p. 1-16, 2011.

Feng, Y. et al. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 101-105, 2011.

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

Gan, K. et al. Application of ozonated piggery wastewater for cultivation of oil-rich *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 285–290, 2014.

García, A.O.; Rojas, C. A. C. Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. **Tecnicaña**, v. 17, p. 3-13, 2006.

González-Benito, G. et al. Valorisation of by-products from food industry, for the production of single cell protein (SCP) using microalgae. **New Biotechnology**, v. 25, S262, 2009.

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

Haas, A. F. et al. Effects of reduced dissolved oxygen concentrations on physiology and fluorescence of hermatypic corals and benthic algae. **Peer J**, v. 2, e235, 2014. doi: 10.7717/peerj.235, 2014.

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

Juneau, P. et al. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper.

**Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 155–164, 2002.

Kim, J. et al. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, v. 15, n. 4, p. 391-396, 2010.

Klein, V. A.; Libardi, P. L. Densidade e distribuição do diâmetro dos poros de um Latossolo vermelho sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 857-867, 2002.

Kong, W. et al. The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 11620-11630, 2011.

Kumar, M. S. et al. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6012–6018, 2010.

Larrahondo, J. E. Compuestos orgánicos em vinaza. **Cenicña**, v. 22, n 3, p. 5-6, 2000.

Liang, Z. et al. Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*. **Chemosphere**, v. 92, p. 1383–1389, 2013.

Lombardi, A.T.; Maldonado, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, p. 77-87, 2011.

Lyra, M. R. C. C. Toposeqüência de solos fertirrigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 525-532, 2003.

Manhães, M. D. et al. Acúmulo de potássio em solos de áreas canavieiras fertirrigadas no norte fluminense. **Agronomia**, v. 37, n 1, p. 64 - 68, 2003.

Marques, S. S. I. et al. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of an aerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1933–1943, 2013.

Martínez, M. E. et al. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263-272, 2000.

Medina, G. B. Usos alternativos de lãs vinazas de acuerdo com su composición química. **Tecnicaña**, v. 17, p. 15-19, 2005.

Mezzari, M. P. et al. Bacteria-microalgae interactions during nitrification/denitrifications process in a photobioreactor treating swine wastewater. In: SIGERA – Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 3, 2013, São Pedro, SP.

Mitra, D. et al. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, p. 40–48, 2012.

Molinuevo-Salces, B. et al. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5144-5149, 2010.

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

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

Paulino, J. et al. Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo. II. Características da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 244–249, 2011.

Priyadarshani, I.; Rath, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, p. 89–100, 2012.

Ramirez, N. N. V. et al. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 630-635, 2014.

Ruiz-Marin, A. et al. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 58–64, 2010.

Silva, M. A. S. et al. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 108-114, 2007.

Silva, M. A. S. Effects of vinasse irrigation on effluent ionic concentration in Brazilian Oxisols. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 5664-5672, 2013.

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

Uyeda, C. A. **Influência da aplicação de vinhaça na condutividade hidráulica do solo saturado e no escoamento superficial**. 2009. 66p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Valderrama, L.T. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. **Water Research**, v. 36, p. 4185–4192, 2002.

Wang, H. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 215–220, 2012.

Zhao, X. et al. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 322–328, 2014.

Zhang, Y. et al. The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from the production of soybean products. **Water Research**, v. 46, p. 5509-5516, 2012.

Zhu, L. Scale-up potential of cultivating *Chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 318–325, 2013.



## CAPÍTULO 2

### **AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (TIE) DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO À PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *CHLORELLA VULGARIS***

#### **Resumo**

O cultivo de microalgas em águas residuárias tem sido proposto como forma de, concomitantemente à produção de biomassa, reduzir o potencial poluente destes efluentes. Além disso, esta prática contribui para reduzir os custos de produção da biomassa microalgal, uma vez que dispensa a adição de nutrientes minerais e poupa-se água de boa qualidade para outros fins. No entanto, a composição normalmente complexa dos efluentes mostra-se inibitória ao crescimento algal, obrigando efetuar-se a diluição ou tratamento prévio dos efluentes. Os estudos de Identificação e Avaliação da Toxicidade (TIE) envolvem um conjunto de manipulações que visam identificar compostos potencialmente tóxicos presentes num dado efluente. Neste trabalho, procedimentos de TIE foram aplicados à vinhaça, um efluente abundante no Brasil, com objetivo de identificar possíveis agentes causadores da toxicidade que, se removidos, possibilitariam maior produção de biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* e uso do efluente com pouca ou nenhuma diluição. Testes laboratoriais foram conduzidos durante 96 horas com diferentes concentrações de vinhaça (30, 50, 70 e 100%) previamente manipuladas, com acompanhamento dos perfis de crescimento, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e pH. Os resultados demonstraram que a manipulação de pH para 3,0 resultou em maior densidade celular da microalga, independentemente da concentração de vinhaça. O tratamento da vinhaça com tiosulfato de sódio, EDTA e resina XAD-8 reduziram o crescimento microalgal, possivelmente devido à limitação nutricional. Para os demais tratamentos, concentrações intermediárias de vinhaça (30 – 70%) suportaram crescimento satisfatório da *C. vulgaris*, sugerindo a possibilidade de utilização deste efluente como forma de reduzir os custos de produção da biomassa microalgal.

**Palavras-chave:** Microalgas; Cultivo; Água residuária.

## CHAPTER 2

### **TOXICITY IDENTIFICATION AND EVALUATION (TIE) OF SUGARCANE VINASSE AIMING TO PRODUCE BIOMASS OF *CHLORELLA VULGARIS***

#### **Abstract**

The cultivation of microalgae in wastewater has been proposed in order to reduce the pollution potential of the effluents concomitantly to production useful biomass. However the cultivation of microalgae in wastewater is difficult. Vinasse is a dark brown color and complex residue generated in large scale by ethanol production. Literature shows that raw vinasse does not support the growth of photoautotrophic microalgae, however, the reasons for this are unknown. Most published research so far has reported that microalgae can grow in highly diluted vinasse, at concentrations around 5 – 10%. The Toxicity Identification and Evaluation (TIE) procedure involves a set of manipulations aimed at identifying potentially toxic compounds present in an effluent. In this work TIE procedures were applied to the vinasse in order to identify potential causative agents of toxicity to microalgae that if removed, would allow increased production of biomass. Laboratory tests using *Chlorella vulgaris* were carried out during 96 hours with different concentrations of vinasse (30, 50, 70 and 100%) previously TIE manipulated. Microalgae growth profiles, electric conductivity, dissolved oxygen and pH were monitored. The results demonstrated that TIE manipulation pH=3.0 resulted in higher cell density of microalgae, independently of the vinasse concentration. TIE manipulations as addition of sodium thiosulfate, EDTA and XAD-8 resin to vinasse reduced microalgal growth, possibly due to nutritional limitation. The other TIE manipulations resulted in growth of *C. vulgaris* similar to the control at intermediate vinasses concentrations (30 - 70%), suggesting the possibility of using this effluent, after treatment, for the reduction of costs in the production of microalgal biomass and remediating the effluent.

**Keywords:** Microalgae; Cultivation; Wastewater; Stillage.

## 1 Introdução

Microalgas têm sido cultivadas objetivando produzir biomassa para diversos fins, como alimentação humana e animal, obtenção de metabólitos de interesse, fertilização dos solos e produção de biocombustíveis (Spolaore et al., 2006; Harun et al., 2010; Borowitzka, 2013). Entretanto, a produção de microalgas possui elevado custo, de modo que o uso de efluentes tem sido sugerido como forma de ajudar na minimização destes custos.

A utilização de efluentes para o cultivo microalgal assume especial importância quando se considera que o custo de produção dos meios sintéticos é elevado especialmente devido à variedade de nutrientes necessários para suportar adequado crescimento microalgal (El Nabris, 2012). Além disso, o Brasil vem enfrentando uma marcante escassez hídrica, com redução da pluviosidade e consequente impacto na oferta de água para abastecimento público, irrigação e geração de energia elétrica (ANA, 2014).

A literatura mostra que cultivos microalgais em águas residuárias possibilitam, concomitantemente à redução do potencial poluente dos efluentes, a obtenção de elevada concentração de biomassa, muitas vezes superior àquelas obtidas em cultivos em meios sintéticos (Li et al., 2011; Wang et al., 2012; Olgúin et al., 2015). Contudo, tal prática tem encontrado algumas limitações. Quando se trabalha com efluentes, a presença de turbidez elevada dificulta a penetração de luz de maneira homogênea nos sistemas (Heredia-Arroyo et al., 2011). Além disso, devido à maior complexidade dos efluentes em comparação aos meios de cultivo sintéticos e à presença de agentes potencialmente tóxicos, pode haver limitação do crescimento microalgal.

A toxicidade depende da concentração e propriedades da substância à qual o organismo é exposto, do tempo de exposição e do estado fisiológico do organismo-alvo (Lombardi e Maldonado, 2011). Logo, a fim de se direcionar um eventual tratamento prévio dos efluentes para que possam suportar o crescimento e produção algal, os agentes causadores da toxicidade devem ser conhecidos. Uma das maneiras de se fazê-lo é através da aplicação de testes de Identificação e Avaliação da Toxicidade (TIE; USEPA, 1991). Iniciados nos EUA na década de 80, os primeiros estudos relativos ao TIE tinham como objetivo identificar fontes responsáveis pela toxicidade de determinados efluentes, possibilitando a adoção de medidas eficientes

de controle previamente ao seu lançamento nos corpos receptores (Buratini et al., 2007; Furley, 2009). O mesmo conceito pode ser adotado ao se utilizar efluentes como meio para o cultivo de microalgas, buscando-se identificar e isolar os componentes tóxicos presentes em determinada amostra de modo a possibilitar e/ou otimizar a produção de biomassa. Nos estudos de TIE a identificação e isolamento dos compostos potencialmente tóxicos de um efluente é feita através de uma série de manipulações físico-químicas que têm por finalidade alterar a biodisponibilidade de determinados compostos ali presentes (Pelletier et al., 2001; Buratini et al., 2007; Furley, 2009). Posteriormente às manipulações, avalia-se o crescimento dos organismos, que, no presente estudo, consistiu na microalga *Chlorella vulgaris*.

A vinhaça é o principal resíduo gerado pelas usinas sucroalcooleiras. Na safra 2015/16, estima-se uma produção de mais de 300 bilhões de litros deste efluente que, normalmente, é utilizado nos canaviais como fertirrigação (Freire e Cortez, 2000; Silva et al., 2007; CONAB, 2015).

Devido à sua abundância e riqueza nutricional, a vinhaça tem sido avaliada como meio para o cultivo de microalgas. Contudo, a proporção sugerida é normalmente baixa, com maiores concentrações de biomassa obtidas quando utilizadas concentrações inferiores a 5% do efluente (Oliveira e Cáceres, 1986; Kadioglu e Algur, 1992; Öztürk e Demir, 2001; González-Benito et al., 2009; Barrocal et al., 2010; Coca et al., 2014). Esta baixa proporção de vinhaça capaz de suportar adequado crescimento microalgal pode ser atribuída à toxicidade do efluente, podendo estar relacionada à presença de constituintes químicos específicos ou mesmo à sua coloração escura, que acarreta em menor penetração de luz quando utilizados cultivos fotoautotróficos.

Tendo como base o TIE, este trabalho pretende elucidar quais fatores/compostos presentes na vinhaça são responsáveis por causar toxicidade à microalga *Chlorella vulgaris*. Uma vez que não existem na literatura relatos referentes à aplicação dos procedimentos de TIE em vinhaça, a metodologia proposta pela USEPA (1991) foi adaptada visando contemplar as características deste efluente. Assim, pretende-se identificar qual(is) componentes presentes na vinhaça são responsáveis pela inibição do crescimento microalgal, de modo que, se removidos, uma produtividade ótima de biomassa de *Chlorella vulgaris* possa ser obtida.

## 2 Material e Métodos

Os testes de Identificação e Avaliação da Toxicidade (TIE) foram conduzidos com vinhaça convencional oriunda da Usina Santa Lúcia, no município de Araras/SP, coletada diretamente de colunas de destilação a uma temperatura aproximada de 90° C. A vinhaça foi encaminhada ao Laboratório de Biotecnologias de Algas (CCBS - UFSCar), onde foi passada por uma sequência de cinco peneiras granulométricas (0,590; 0,210; 0,177; 0,125 e 0,053 mm de abertura; Telastem, Brasil) a fim de remover o material particulado. Após resfriamento natural, a vinhaça foi dividida em alíquotas, acondicionada em garrafas de polietileno e mantida congelada até o momento da sua utilização. Para realização dos experimentos, as vinhaças foram descongeladas, centrifugadas (2516 x g, 10 min, Thermo Scientific, USA), passadas por membranas de fibra de vidro (~1 µm de diâmetro, Macherey-Nagel®) e, em seguida, submetidas às manipulações específicas referentes aos procedimentos de TIE. A caracterização físico-química da vinhaça após as etapas de peneiramento, centrifugação e filtragem em membranas de fibra de vidro está apresentada na Tabela 1.

Os testes de toxicidade consistiram numa série de manipulações da vinhaça, baseando-se no protocolo estabelecido pela USEPA (1991) e buscando-se contemplar as características do efluente. As manipulações referentes aos procedimentos TIE estão apresentadas na Tabela 2. Após cada uma das manipulações, o pH da vinhaça foi sempre ajustado para  $7,0 \pm 0,2$  para o cultivo da *C. vulgaris* e a vinhaça foi diluída em água destilada nas proporções de 30, 50, 70 e 100%. O controle (0%) consistiu em meio LC Oligo ( $4,7 \times 10^{-4}$  NaNO<sub>3</sub>,  $5 \times 10^{-4}$  NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>,  $1,7 \times 10^{-4}$  Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O,  $1,2 \times 10^{-4}$  MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O,  $2,3 \times 10^{-4}$  K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  $6 \times 10^{-8}$  CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O,  $2,4 \times 10^{-8}$  (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O,  $1 \times 10^{-7}$  ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O,  $1,26 \times 10^{-7}$  CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O,  $1,2 \times 10^{-7}$  Mn(SO<sub>4</sub>).H<sub>2</sub>O,  $4,9 \times 10^{-7}$  H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,  $3,14 \times 10^{-6}$  FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O,  $2,24 \times 10^{-6}$  FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O,  $2,9 \times 10^{-6}$  C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>.5H<sub>2</sub>O e  $1,79 \times 10^{-4}$  NaHCO<sub>3</sub>.mol L<sup>-1</sup>; AFNOR, 1980), com pH ajustado para 7,0.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química da vinhaça previamente às manipulações referentes aos procedimentos de TIE. Teores de  $K_2O$  em  $kg\ m^{-3}$ ; condutividade elétrica em  $\mu S\ cm^{-1}$  e demais valores em  $mg\ L^{-1}$ .

| Parâmetro <sup>1</sup>                      | Valor  |
|---|--------|
| Sólidos suspensos totais                    | 500    |
| Dureza calculada                            | 2474   |
| Condutividade elétrica                      | 9910   |
| N nítrico ( $NO_3^-$ )                      | < 11,4 |
| N nitroso ( $NO_2^-$ )                      | < 0,3  |
| N amoniacal ( $NH_3$ )                      | 4,17   |
| N Kjeldahl                                  | 15,7   |
| Sódio                                       | 5,73   |
| Cálcio                                      | 600    |
| Potássio                                    | 2400   |
| Magnésio                                    | 237    |
| Sulfato                                     | 2638   |
| Fosfato                                     | < 2,0  |
| DBO 5 dias (demanda bioquímica de oxigênio) | 15735  |
| DQO (demanda química de oxigênio)           | 23735  |
| Teor de $K_2O$                              | 2,88   |
| COT (carbono orgânico total)                | 7429   |
| NT (nitrogênio total)                       | 133,7  |
| pH  | 4,25   |

**Tabela 2.** Manipulações (não sequenciais) e agentes-alvo a serem removidos com os procedimentos de TIE em vinhaça.

| Manipulação  | Efeito  |
|--|---|
| Ajuste de pH para valores extremos (3,0 e 11,0) <sup>2</sup>       | Precipitação de compostos afetados por mudanças extremas de pH (sulfetos, cianetos)                                   |
| Ajuste de pH + aeração (pH inicial, pH=3,0 e pH=11,0) <sup>1</sup> | Perda de compostos voláteis (solventes orgânicos), oxidáveis (cloro) ou flotáveis (surfactantes)                      |
| Extração em fase sólida (Coluna $C_{18}$ )                         | Remoção de compostos orgânicos não polares (solventes, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares)          |
| Extração em fase sólida (Resina XAD-8)                             | Remoção de substâncias húmicas (porção hidrofóbica)   |
| Adição de EDTA (quelante de íons)                                  | Complexação de metais catiônicos (Fe, Cu, Zn, Pb, Cd, Ni, e outros)   |
| Adição de $Na_2S_2O_3$ (oxidante de íons)                          | Redução de substâncias oxidantes (cloro, peróxidos) e formação de complexos com alguns metais catiônicos (Cu, Cd, Hg) |

<sup>1</sup> Análises realizadas pela ASL – Análises Ambientais (Rio Claro – SP), exceto COT e NT. Metodologia em anexo.

<sup>2</sup> Antes da realização do teste ecotoxicológico o pH das amostras foi ajustado para 7,0.

A microalga utilizada como organismo-teste foi a *Chlorella vulgaris* (LBA 01 – *C. vulgaris* ETE), isolada de uma planta de tratamento de efluentes do distrito de Água Vermelha (São Carlos, SP). A microalga foi mantida na coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia de Algas – UFSCar em meio de cultura LC Oligo (AFNOR, 1980) em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2$  °C), fotoperíodo (12/12 horas, claro-escuro) e intensidade luminosa incidente na superfície dos frascos de  $150 \pm 10$   $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . As mesmas condições foram adotadas para os cultivos da microalga em vinha\u00e7a.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de cultura (vinha\u00e7a/\u00e1gua destilada) e  $\sim 10^5$   $\text{c\u00e9l mL}^{-1}$  de in\u00f3culo algal composto por c\u00e9lulas previamente centrifugadas ( $906 \times g$ ) obtidas durante fase exponencial de crescimento da *C. vulgaris*. Posteriormente \u00e0 centrifuga\u00e7\u00e3o, a viabilidade do in\u00f3culo foi confirmada atrav\u00e9s do rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo do fotossistema II, utilizando-se um fluor\u00f4metro de pulso e amplitude modulada (Phyto-PAM, Walz, Alemanha). Para isso, as c\u00e9lulas foram adaptadas por 20 minutos no escuro e in\u00f3culos com valores superiores a 0,70 foram considerados como saud\u00e1veis (Juneau et al. 2002; Lombardi e Maldonado 2011) e, quando inferiores, foram inutilizados.

Os cultivos foram mantidos durante 96 horas (ABNT, 1992) com amostragens a cada 24 horas para acompanhamento dos perfis de pH (Logen Scientific LS, Brasil), condutividade e oxig\u00eanio dissolvido (multianalisador HACH HQ 40d, com eletrodo HACH LDO 10101 para detec\u00e7\u00e3o do oxig\u00eanio dissolvido), al\u00e9m de contagem direta das c\u00e9lulas em microsc\u00f3pio \u00f3ptico (Biofocus Equipamentos, Brasil) utilizando c\u00e2mara de Fuchs-Rosenthal. As taxas espec\u00edficas de crescimento ( $\mu$ , em  $\text{d}^{-1}$ ) foram obtidas atrav\u00e9s da representa\u00e7\u00e3o gr\u00e1fica do logaritmo natural das densidades de c\u00e9lulas em fun\u00e7\u00e3o do tempo, obtendo-se a regress\u00e3o linear para a fase de crescimento exponencial da microalga. Neste caso, a taxa espec\u00edfica de crescimento \u00e9 representada pela inclina\u00e7\u00e3o da reta, ou seja, o coeficiente angular da equa\u00e7\u00e3o de regress\u00e3o linear.

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata utilizando delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos \u00e0 an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA) e testes de Tukey a 5%, conforme a necessidade

As manipula\u00e7\u00f5es referentes ao TIE foram realizadas conforme descrito a seguir:

### **Ajuste de pH (3,0 e 11,0)**

Alíquotas de vinhaça descongelada tiveram seus valores de pH ajustados para 3,0 ou para 11,0 com adição de HCl 0,1 e 1,0 M e NaOH 0,1; 1,0 e 12 M, respectivamente. Tomou-se o cuidado para que o volume adicionado de ácido e/ou base não ultrapassasse 5% do volume total da amostra. Após um período de repouso de 2 horas (Barbosa, 2010; Melo, 2012), a vinhaça foi coletada com auxílio de pipeta, de modo a evitar que tocasse nas bordas e fundo do recipiente, onde verificou-se formação de precipitado. Os valores de pH foram corrigidos para  $7,0 \pm 0,1$ .

A mudança de pH para valores extremos altera propriedades físico-químicas de determinados compostos catiônicos e aniônicos, como a solubilidade, polaridade, volatilidade, estabilidade e especiação. Desta forma, a biodisponibilidade destes elementos é alterada e, conseqüentemente, sua toxicidade pode ser diminuída (Matos, 2011; Spadotim, 2015).

### **Ajuste de pH + aeração (pH inicial, 3,0 e 11,0)**

Alíquotas de vinhaça descongelada tiveram seus valores de pH ajustados para 3,0 ou para 11,0 com adição de HCl 0,1 e 1,0 M e NaOH 0,1; 1,0 e 12 M, respectivamente, sem que o volume adicionado de ácido e/ou base ultrapassasse 5% do volume total da amostra. Estas alíquotas, bem como outra em pH natural, foram colocadas em cones de decantação e aeradas durante o período de 1 hora e 30 minutos (Barbosa, 2010; Melo, 2012), ao término do qual foram coletadas com auxílio de pipetas a fim de evitar o contato do efluente com a parede interna do recipiente. As alíquotas tiveram, então, seus pHs ajustados para  $7,0 \pm 0,1$ .

A aeração da amostra tem por objetivo identificar a toxicidade causada pela presença de compostos voláteis, subláteis ou oxidáveis. É realizada com ajuste de pH pois diferentes compostos podem ser removidos ou oxidados mais facilmente em valores distintos de pH (Matos, 2011).

### **Extração em fase sólida (coluna C18 e resina XAD-8)**

Para extração em fase sólida foram utilizados dois materiais adsorventes: resina XAD-8 e sílica C18. Para ambos, buscou-se encontrar o ponto de saturação, acompanhando a densidade óptica de amostras diluídas de vinhaça (1:50) em espectrofotômetro a 270 nm. O comprimento de onda foi previamente definido através de varredura completa de diferentes diluições do efluente tendo como base os



trabalhos de Padilha et al. (2013) e Souza et al. (2013). Com relação à sílica C18, foram empregados cartuchos de fase-reversa preenchidos com sílica C18 (1000 mg/6 mL, Macherey-Nagel) adaptados a um frasco tipo kitassato conectado a uma bomba de vácuo. Os cartuchos foram previamente ativados através da passagem de 20 mL de metanol seguidos de 20 mL de água deionizada (Barbosa, 2010; Melo, 2012). Posteriormente, passou-se pelos cartuchos volumes crescentes de vinhaça, a partir de 0,5 mL, sendo cada alíquota coletada para monitoramento da densidade óptica.

A resina XAD-8 foi utilizada diretamente na vinhaça em suspensão, adicionando-se concentrações crescentes da resina a um volume fixo de vinhaça e mantendo os frascos sob agitação constante (250 rpm) em incubadora refrigerada a 25 °C (MA 830, Marconi, Brasil). Para estes testes avaliou-se tanto a concentração da resina (de 0 a 80%) quanto o tempo de agitação (15 a 180 minutos), com monitoramento da densidade óptica das amostras a fim de acompanhar qualquer eventual saturação da resina. Selecionados o tempo e a concentração ideal de resina, os mesmos foram aplicados à vinhaça a ser utilizada nos cultivos, sendo a resina separada da vinhaça através de filtração em membranas de fibra de vidro e tendo, por fim, seu pH ajustado para  $7,0 \pm 0,1$ .

A extração em coluna de octadecil (C18) tem por objetivo identificar compostos orgânicos e complexos metálicos relativamente não polares. Na passagem pela coluna, os compostos presentes na amostra interagem em função da polaridade e solubilidade com o octadecil e são extraídos da amostra para o sorvente (Matos, 2011). Já a resina XAD-8 atua removendo substâncias húmicas presentes na amostra, representadas principalmente pelos ácidos húmico e fúlvico. Dentre os compostos removidos pela adsorção com a resina, pode-se citar substâncias polares, coloridas, ácidos orgânicos e algumas enzimas (Hayes et al., 1989, Malcom e McCarthy, 1992; IHSS, 2015; Sigma-Aldrich, 2015).

#### **Adição de agente oxidante - Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )**

Os testes com tiosulfato de sódio têm por finalidade identificar a toxicidade devida a compostos oxidantes presentes na amostra, como cloro, ozônio, brominas, íons de manganês, iodo e alguns orgânicos hidrofílicos. Estes compostos são, frequentemente, menos tóxicos na sua forma reduzida do que na oxidada. Além disso, o tiosulfato de sódio pode formar complexos metálicos com alguns metais catiônicos,

como Cd, Cu, Hg, Ag e Se, diminuindo sua biodisponibilidade (Matos, 2011; Spadotim, 2015).

Previamente à adição do agente oxidante à vinhaça foi necessário verificar a concentração a ser utilizada a fim de não causar toxicidade à microalga. Para isto foi realizado um pré-teste utilizando a técnica de adição gradativa do tiosulfato de sódio, conforme proposto pela USEPA (1991), adicionando-se alíquotas de uma solução estoque  $20 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Synth®) a alíquotas de meio de cultura. Foram avaliadas cinco concentrações de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , variando entre  $2 \times 10^{-3}$  e  $7 \times 10^{-5}$  M, tendo como controle o meio LC Oligo (AFNOR, 1980). Para o pré-teste utilizou-se a mesma metodologia adotada nos cultivos com vinhaça, com frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio/solução estoque, inóculo de  $\sim 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$  de células saudáveis de *C. vulgaris* em fase exponencial de crescimento, fotoperíodo de 12/12 h horas (claro/escuro),  $150 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidade luminosa, temperatura de  $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e duração de 96 horas. Amostragens foram feitas a cada 24 horas com retirada de alíquotas para acompanhamento dos perfis de crescimento e avaliação da viabilidade celular. Por tratar-se de um pré-teste com meio de cultura e não com efluente, os perfis de crescimento foram monitorados com base na densidade óptica das células em espectrofotômetro a 684 nm (FEMTO 800 XI, Brasil) e teor de clorofila *a* (*in vivo*), determinada em um fluorômetro (Turner Designs Trilogy, EUA). A viabilidade das células da microalga foi avaliada através do rendimento quântico do fotossistema II, a partir de um fluorômetro de pulso e amplitude modulada (Phyto-PAM, Walz®, Alemanha), com adaptação das células por 20 minutos no escuro.

Selecionada a concentração ótima de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  para o cultivo da *C. vulgaris*, a mesma concentração foi adicionada à vinhaça que, após um período de 2 horas em repouso (Barbosa, 2010; Melo, 2012), teve seu pH ajustado para  $7,0 \pm 0,1$ .

#### **Adição de agente quelante – Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)**

Assim como para o agente oxidante, para o quelante também foi necessário determinar a concentração ótima a ser utilizada visando não causar toxicidade às células da microalga. O pré-teste foi realizado da mesma forma que o anterior, mas a partir de uma solução estoque  $5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Mallinckrodt Bio Technology). Foram avaliadas quatro concentrações de EDTA, variando entre  $6 \times 10^{-5}$  e  $2 \times 10^{-6}$ , tendo como controle o meio LC Oligo (AFNOR, 1980). Selecionada a concentração ótima de EDTA para o cultivo da *C. vulgaris*, a mesma concentração foi

adicionada à vinhaça que, após um período de 2 horas (Barbosa, 2010; Melo, 2012), teve seu pH ajustado para  $7,0 \pm 0,1$ .

O tratamento da amostra com EDTA tem por objetivo identificar a toxicidade devido à presença de metais como Al, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Sr e Zn, uma vez que o reagente forma complexos insolúveis com estes elementos. O EDTA tem baixa especificidade para Ag, Cr e Tl e não forma complexos com metais aniônicos (Matos, 2011; Spadotim, 2015).

### **3 Resultados**

#### **3.1 Ensaios preliminares visando selecionar as concentrações de tiosulfato de sódio, EDTA, resina XAD-8 e sílica C18 para os experimentos com vinhaça**

As tabelas 3 e 4 apresentam os valores de clorofila, densidade óptica e rendimento quântico máximo do fotossistema II obtidos nos pré-testes realizados em meio LC Oligo visando selecionar as concentrações de tiosulfato de sódio e EDTA, respectivamente, a serem utilizadas nos procedimentos de TIE em vinhaça. Destes pré-testes, foram selecionadas as concentrações de  $3,6 \times 10^{-4}$  M de tiosulfato de sódio e  $5 \times 10^{-6}$  M de EDTA, uma vez que estas foram as máximas concentrações dos agentes oxidante e quelante, respectivamente, que não afetaram os parâmetros de crescimento da alga.

As figuras 1 e 2 apresentam os valores de densidade óptica obtidos após a adição de diferentes concentrações de resina XAD-8 a alíquotas de vinhaça e da passagem de vinhaça por cartuchos de sílica C18, respectivamente.

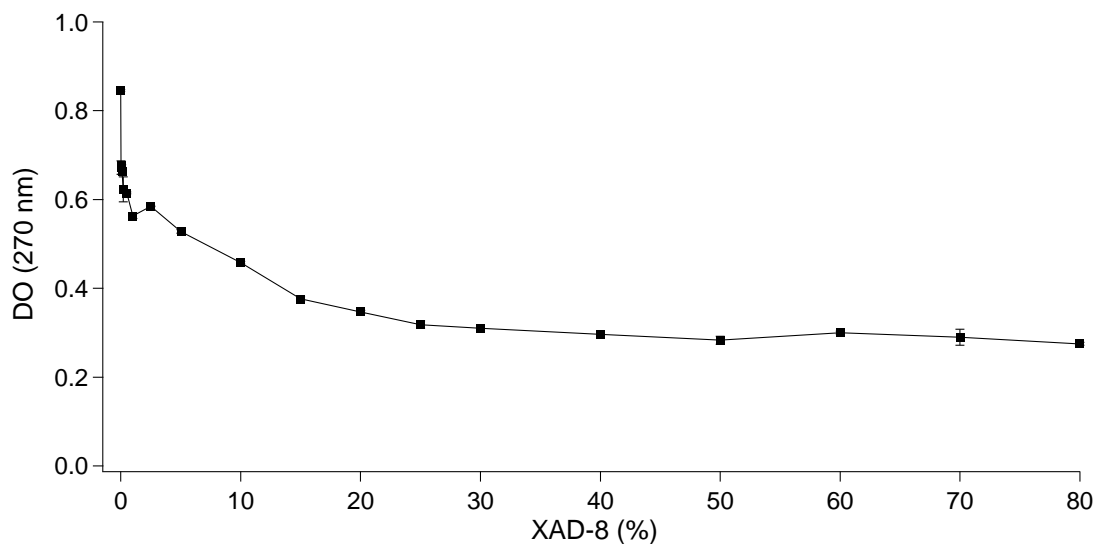
Nas condições experimentais, adotou-se 40% como ponto de saturação da resina XAD-8 e, a partir desta concentração, foi realizado o experimento referente ao TIE em vinhaça. Com relação à sílica C18, optou-se por não prosseguir os testes referentes ao TIE, uma vez que os resultados apontaram 0,5 mL como ponto de saturação da coluna, tornando inviável o tratamento de volumes maiores para realização dos testes.

**Tabela 3.** Valores médios de clorofila *a*, densidade óptica e rendimento quântico máximo do fotossistema II em 96 horas de cultivo de *C. vulgaris* em diferentes concentrações de tiosulfato de sódio. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

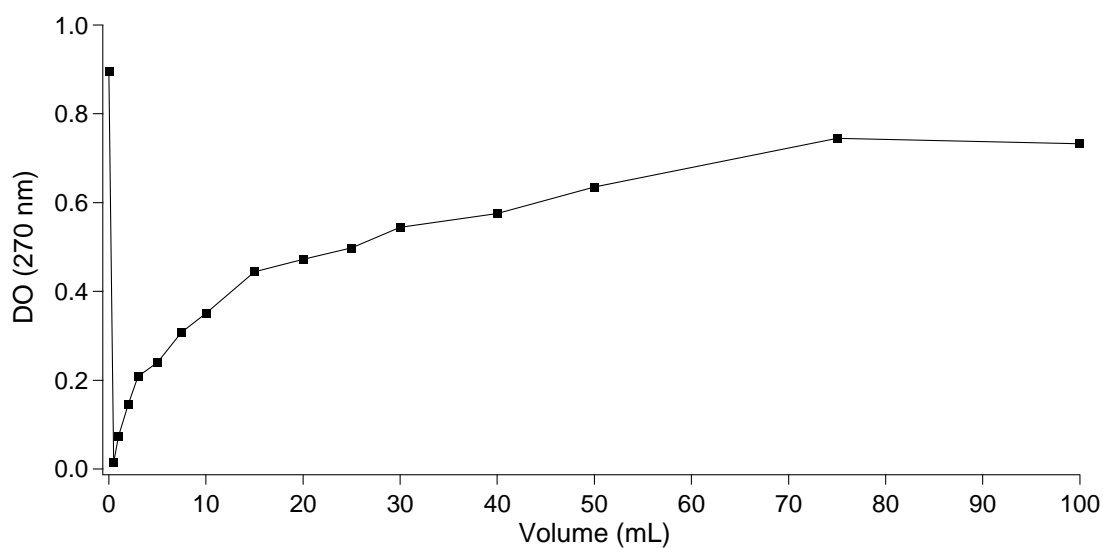
| Concentração de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O (M) | Clorofila <i>a</i> (mg L <sup>-1</sup> ) | DO (684 nm)    | Rendimento quântico máximo PSII |
|--|--|----------------|---------------------------------|
| 0 (Controle)   | 0,36 ± 0,01 ab                           | 0,18 ± 0,00 a  | 0,70 ± 0,01                     |
| 7x10 <sup>-5</sup>   | 0,34 ± 0,00 a                            | 0,17 ± 0,01 ab | 0,70 ± 0,00                     |
| 1,9x10 <sup>-4</sup>   | 0,37 ± 0,01 ab                           | 0,16 ± 0,01 b  | 0,71 ± 0,01                     |
| 3,6x10 <sup>-4</sup>   | 0,38 ± 0,01 b                            | 0,16 ± 0,00 ab | 0,70 ± 0,01                     |
| 1,34x10 <sup>-3</sup>  | 0,29 ± 0,02c                             | 0,11 ± 0,00 c  | 0,71 ± 0,01                     |
| 2x10 <sup>-3</sup>   | 0,23 ± 0,01 d                            | 0,08 ± 0,00 d  | 0,72 ± 0,01                     |

**Tabela 4.** Valores médios de clorofila *a*, densidade óptica e rendimento quântico máximo do fotossistema II em 96 horas de cultivo de *C. vulgaris* em diferentes concentrações de EDTA. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

| Concentração de C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (M) | Clorofila <i>a</i> (mg L <sup>-1</sup> ) | DO (684 nm)    | Rendimento quântico máximo PSII |
|--|--|----------------|---------------------------------|
| 0 (Controle)   | 0,49 ± 0,12 a                            | 0,27 ± 0,06 a  | 0,72 ± 0,01                     |
| 2x10 <sup>-6</sup>   | 0,31 ± 0,03 bc                           | 0,17 ± 0,02 bc | 0,73 ± 0,01                     |
| 5x10 <sup>-6</sup>   | 0,44 ± 0,04 ab                           | 0,24 ± 0,02 ab | 0,73 ± 0,01                     |
| 1,3x10 <sup>-5</sup>   | 0,18 ± 0,04 cd                           | 0,10 ± 0,02 cd | 0,70 ± 0,01                     |
| 6x10 <sup>-5</sup>   | 0,08 ± 0,00 d                            | 0,03 ± 0,00 d  | 0,13 ± 0,01                     |



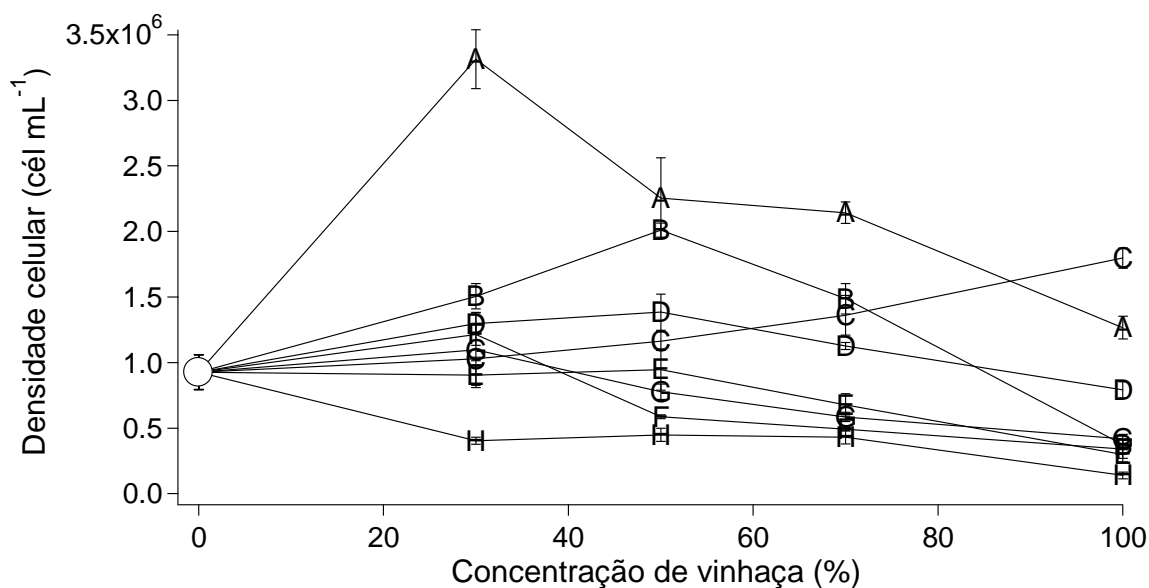
**Figura 1.** Densidade óptica (DO) de amostras de vinhaça tratadas com diferentes concentrações de resina XAD-8. A concentração 0 (zero) refere-se ao tratamento controle.



**Figura 2.** Densidade óptica (DO) de volumes crescentes de vinhaça passados por cartuchos de C18. A concentração 0 (zero) refere-se ao tratamento controle.

### 3.2 Ensaios referentes aos procedimentos de TIE

A figura 3 apresenta os valores de densidade celular obtidos em 96 h de cultivo de *C. vulgaris* nas vinhaças submetidas às diferentes manipulações do TIE.



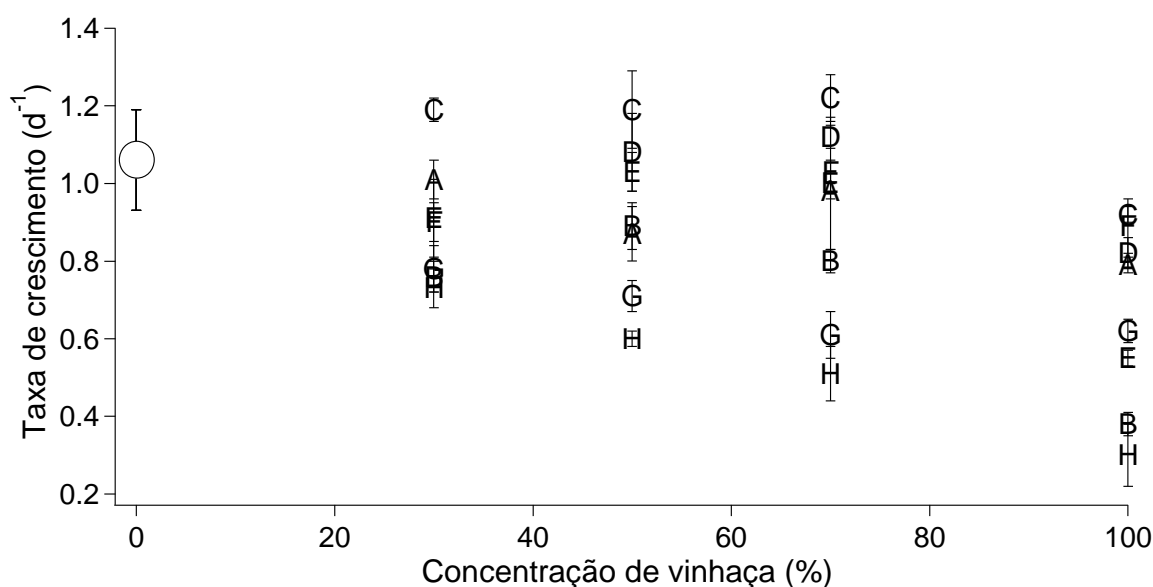
**Figura 3.** Densidade celular (cél mL<sup>-1</sup>) de *Chlorella vulgaris* após 96 h de cultivo em vinhaça. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pH inicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle ( $9,3 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>; n=24).

A maior densidade de células após 96 h de cultivo de *C. vulgaris* foi obtida quando se utilizou a manipulação pH=3,0 e 30% de vinhaça, atingindo  $3,3 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>. Nesta condição (pH=3,0) as densidades celulares da microalga foram sempre superiores às obtidas nos tratamentos controle, independentemente da concentração de vinhaça utilizada. Densidades celulares superiores ao controle também foram obtidas quando se utilizou pH=11,0, com exceção da concentração 100% de vinhaça. Na máxima concentração de vinhaça utilizada (100%), as maiores densidades celulares foram verificadas nos tratamentos pH=3,0 e pH=3,0 + aeração, sendo superiores a densidade celular média obtida nos tratamentos controle. Nas concentrações intermediárias de vinhaça (50 e 70%), todas as manipulações de pH refletiram em densidades celulares superiores ao controle ( $p < 0,05$ ), exceto pH=11,0 + aeração para 70%, enquanto as manipulações envolvendo adição de tiosulfato de sódio, EDTA e adsorção pela resina XAD-8 refletiram em valores sempre inferiores ao controle.

Independentemente da concentração de vinhaça utilizada, a manipulação com resina XAD-8 resultou sempre nas menores densidades de células das microalga, não ultrapassando  $5 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>. Resultados similares foram obtidos nos tratamentos envolvendo adição de EDTA e tiosulfato de sódio, ambos com densidades celulares de  $\sim 1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> em vinhaça 30%. Nas maiores concentrações de vinhaça (> 50%),

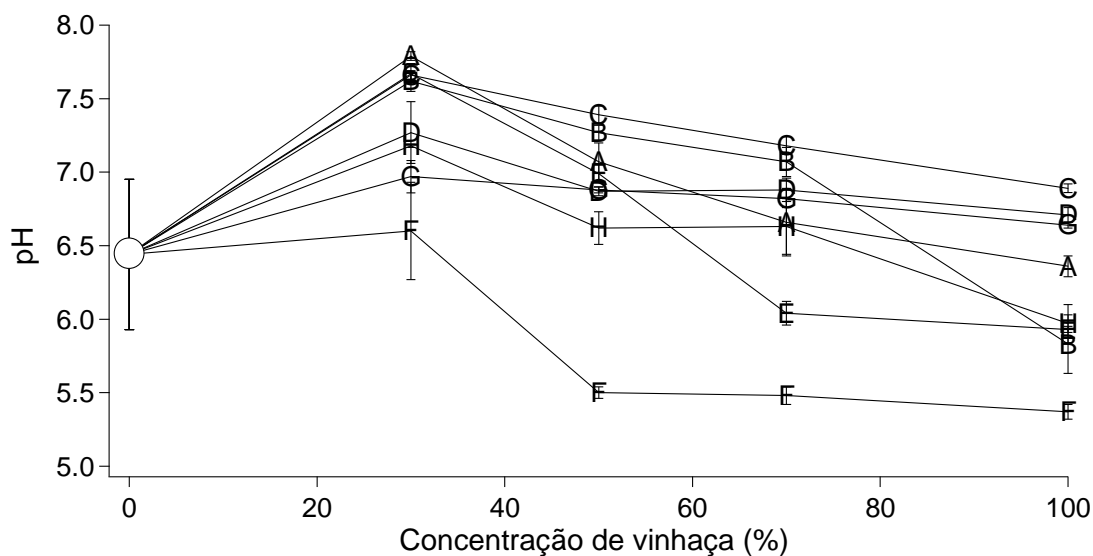
as densidades celulares foram inferiores às do controle, com redução gradual no número de células diretamente relacionada ao aumento da concentração dos agentes quelante e oxidante.

A figura 4 apresenta as taxas específicas de crescimento obtidas durante os cultivos de *C. vulgaris* em vinhaça submetida aos tratamentos do TIE. Os maiores valores foram verificados nas concentrações intermediárias de vinhaça (30 – 70%) no tratamento TIE pH=3,0 + aeração ( $\sim 1,2 \text{ d}^{-1}$ ), sendo superiores à taxa específica de crescimento obtida no controle ( $1,06 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ ). As menores taxas específicas de crescimento foram obtidas quando se utilizou a resina XAD-8, sendo que, nesta condição, foram verificados os únicos valores inferiores a  $0,6 \text{ d}^{-1}$ .



**Figura 4.** Taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ,  $\text{d}^{-1}$ ) de *Chlorella vulgaris* durante cultivos em vinhaça. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pH inicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle (n=24).

A figura 5 apresenta os valores finais de pH das culturas de *C. vulgaris* nos diversos tratamentos TIE. Em geral, observa-se uma tendência de diminuição dos valores de pH com o aumento das concentrações de vinhaça. Os menores valores finais de pH foram registrados nos cultivos realizados em vinhaça adicionada de tiosulfato de sódio, sendo inferiores a 5,5 a partir da concentração 50%, enquanto os maiores valores (pHs 7,6 – 7,8) foram detectados nas manipulações TIE pH=3,0, pH=11,0 e pH=11,0 + aeração, nos cultivos em vinhaça 30%. Nos frascos controle o pH final médio foi de  $6,44 \pm 0,51$ .

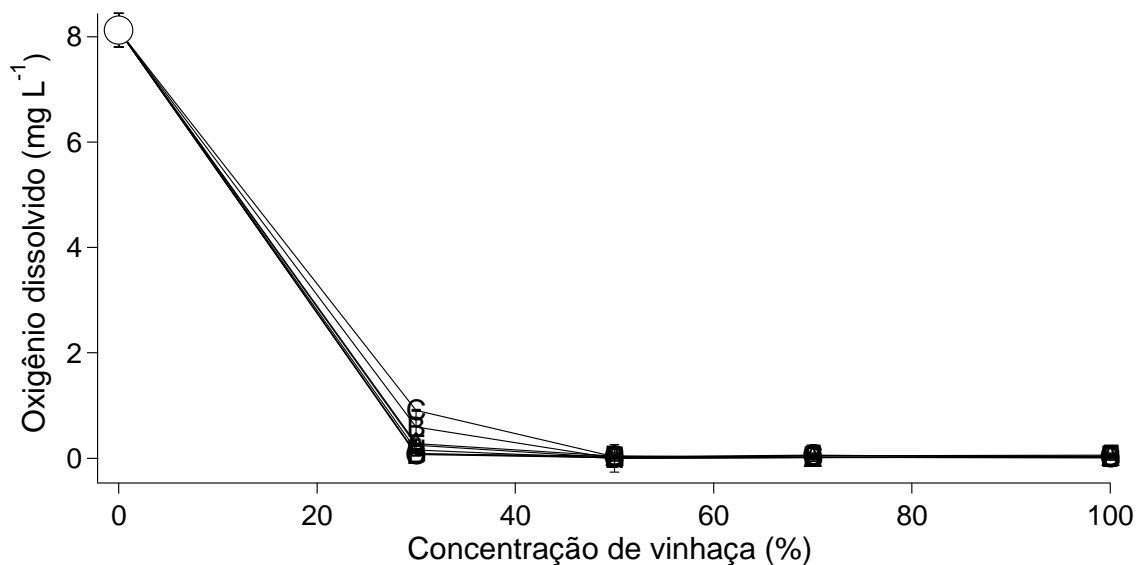


**Figura 5.** Valores finais de pH após 96 h de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça submetida aos tratamentos TIE. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pH inicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8.  $\circ$  = Média dos tratamentos controle (n=24).

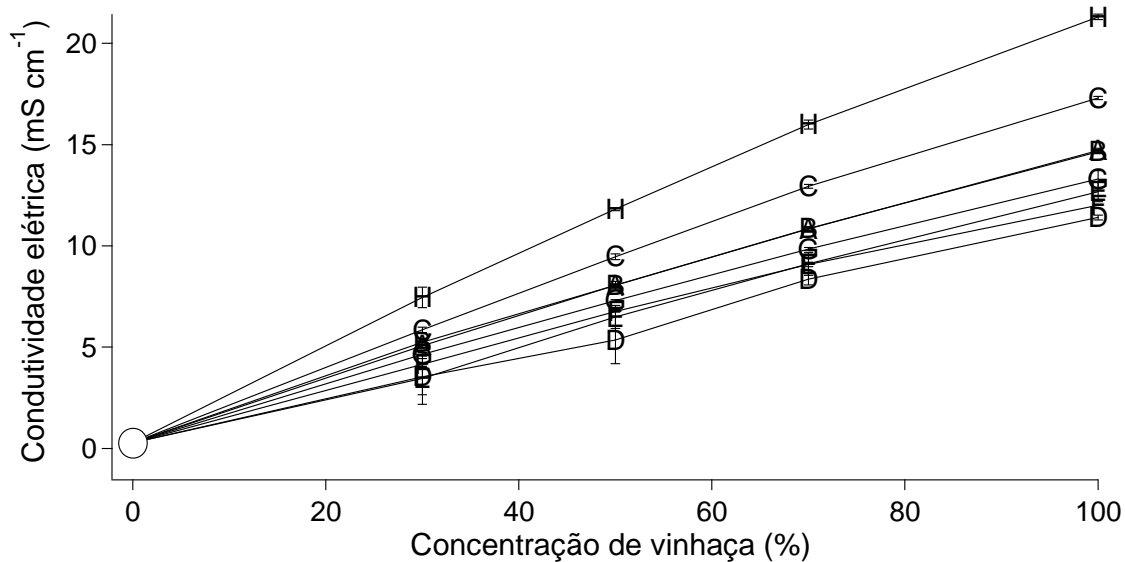
A concentração final média de oxigênio dissolvido no controle foi de 8,12 mg L<sup>-1</sup>, enquanto nos frascos contendo vinhaça observou-se drástica redução da concentração de O<sub>2</sub> após as primeiras 24 h de cultivo, atingindo valores médios de 0,29 mg L<sup>-1</sup> em vinhaça 30% e aproximando-se de zero nas concentrações superiores do efluente (figura 6).

Nos frascos controle houve redução da condutividade elétrica do meio durante o cultivo da *C. vulgaris*, atingindo  $0,29 \pm 0,08$  mS cm<sup>-1</sup> ao fim de 96 h. Já nos cultivos em vinhaça não se verificou uma tendência de redução ou aumento da condutividade elétrica, com oscilação dos valores durante o período total de cultivo. O aumento dos valores de condutividade elétrica com o aumento das concentrações de vinhaça deve-se à maior concentração de sais presentes nas maiores concentrações do efluente (Figura 7).





**Figura 6.** Concentração de oxigênio dissolvido após 96 horas de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pHinicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle (n=24).



**Figura 7.** Condutividade elétrica (CE) após 96 h de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça. Tratamentos: A: pH=3,0; B: pH=11,0; C: pH=3,0+aeração; D: pHinicial+aeração; E: pH=11,0+aeração; F: Tiosulfato de sódio; G: EDTA; H: XAD-8. ○ = Média dos tratamentos controle (n=24).

## 4 Discussão

### 4.1 Ensaios preliminares visando selecionar as concentrações de tiosulfato de sódio, EDTA, resina XAD-8 e sílica C18 para os experimentos com vinhaça

Nos pré-testes realizados com tiosulfato de sódio os valores de clorofila *a* e densidade óptica obtidos quando se utilizou  $3,6 \times 10^{-4}$  M do agente oxidante não diferiram dos valores observados no tratamento controle ( $p > 0,05$ ), o que demonstra que não houve efeito tóxico para a microalga. Ao se utilizar maiores concentrações, contudo, constatou-se toxicidade do reagente, com valores de clorofila *a* e densidade óptica inferiores ao controle ( $p < 0,05$ ). De fato, concentrações da ordem de  $10^{-3}$  M de tiosulfato de sódio tem se mostrado tóxicas para o gênero *Chlorella* sp., inibindo o crescimento e estimulando o acúmulo de lipídios na microalga (Feng et al. 2005; Singh e Mallick, 2014). O mesmo comportamento foi verificado para o EDTA, com redução significativa dos valores de clorofila *a* e densidade óptica quando utilizadas concentrações de  $10^{-5}$  M do agente quelante. Na maior concentração avaliada ( $6 \times 10^{-5}$  M) houve efeito expressivo também no rendimento quântico máximo do fotossistema II, que apresentou valores decrescentes já a partir do segundo dia de cultivo (dados não apresentados).

No ponto de saturação da resina XAD-8 (40%) adotado para o cultivo da *C. vulgaris* a densidade óptica das amostras de vinhaça foi reduzida de 0,85 para 0,30 (Figura 1). A coloração escura da vinhaça resulta da presença de compostos fenólicos, como ácidos húmico e tânico, melanoidinas, furfurais oriundos da hidrólise ácida e compostos caramelados gerados pelo superaquecimento de açúcares durante o processo de destilação do etanol (Pant e Adholeya, 2007; España-Gamboa et al. 2011). Logo, a redução da densidade óptica das amostras com o aumento da concentração de resina XAD-8 confirma a adsorção e remoção do material húmico presente na vinhaça.

### 4.2 Ensaios referentes aos procedimentos de TIE

A manipulação de pH para valores extremos como 3,0 ou 11,0 afeta a solubilidade, polaridade, estabilidade e especiação de determinados compostos, além

de afetar a taxa de ionização e, conseqüentemente, as propriedades físico-químicas dos elementos. Com isso, estes compostos têm sua biodisponibilidade alterada (USEPA 1991, USEPA, 1992; Buratini et al. 2007). Para Buratini et al. (2007), os extremos de pH afetam compostos como sulfetos e cianetos, enquanto SAIC (2003), ao estabelecer um guia para planejamento e realização do TIE em sedimentos aquáticos, ressalta que o aumento do pH remove a toxicidade devido a sulfetos, enquanto sua diminuição remove a toxicidade devido à presença de amônia.

Em ambientes aquáticos a amônia se apresenta sob duas formas, uma ionizada (íon amônio -  $\text{NH}_4^+$ ) e uma não ionizada (amônia -  $\text{NH}_3$ ), cujo equilíbrio depende principalmente do pH. Destas, a amônia livre ( $\text{NH}_3$ ) é a forma mais tóxica devido à ausência de carga e sua propriedade lipofílica, que possibilita grande permeabilidade através da membrana celular e rápida difusão para o meio interno (Collos e Harrison, 2014). A forma  $\text{NH}_3$  predomina em pHs elevados ( $> 8,0$ ), enquanto o íon amônio predomina em pHs mais baixos (Hargreaves e Tucker, 2004; Pereira e Mercante, 2005; Collos e Harrison, 2014) e é um nutriente às microalgas.

A vinhaça utilizada nos estudos apresentou uma concentração inicial de  $4,17 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal (Tabela 1). Contudo, após as manipulações referentes ao TIE o pH da vinhaça foi reajustado para 7,0 para o cultivo da *C. vulgaris*, faixa em que praticamente todo o nitrogênio amoniacal está presente na forma do íon nutritivo  $\text{NH}_4^+$  (Hargreaves e Tucker, 2004; Collos e Harrison, 2014). Após o carbono, nitrogênio é o elemento mais importante para o crescimento microalgal, podendo ser assimilado nas formas de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Grobbelaar, 2004). Para Collos e Harrison (2014),  $\text{NH}_4^+$  seria a forma ideal de nitrogênio para as microalgas, uma vez que seu estado de oxidação elimina a necessidade de redução no interior da célula, podendo então ser imediatamente utilizado para a síntese de aminoácidos. Isso pode ter ocorrido nas manipulações de  $\text{pH}=3,0$  e  $\text{pH}=11,0$ , resultando nas maiores densidades celulares da microalga em 96 h de cultivo mesmo quando utilizadas altas concentrações de vinhaça. Segundo Grobbelaar (2004), o uso de  $\text{NH}_4^+$  como fonte de N em cultivos microalgais pode acarretar redução do pH do meio devido à liberação de íons  $\text{H}^+$ . Xin et al. (2010), avaliando o efeito de três fontes de nitrogênio (uréia,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) no crescimento e remoção de nutrientes em efluente doméstico pela microalga *Scenedesmus* sp., verificaram menor densidade celular e menores remoções de N e P quando a fonte utilizada foi  $\text{NH}_4^+$ , fato atribuído ao efeito inibitório causado pela liberação de  $\text{H}^+$  no meio. No caso da vinhaça, provavelmente há um equilíbrio

entre as várias formas do N e, por isso, não observamos queda de pH com o crescimento algal.

Embora a manipulação TIE de pH=11,0 faça com que praticamente todas as formas de N-amoniacal presentes na vinhaça transformem-se na forma tóxica ( $\text{NH}_3$ ), o reajuste do pH para 7,0 ao início do cultivo tende a deslocar a especiação do N para a forma nutritiva,  $\text{NH}_4^+$ . Essa manipulação (TIE pH=11,0) resultou em densidades celulares de *C. vulgaris* superiores ao tratamento controle, exceto em vinhaça 100%, e superiores às demais manipulações do TIE, exceto TIE pH=3,0. A caracterização físico-química da vinhaça utilizada neste estudo não especifica a presença ou ausência de sulfetos, uma vez que segue a norma P4.231 da CETESB, cujo objetivo é estabelecer critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça no solo (CETESB, 2006). Contudo, é relatada a presença de sulfato ( $2638 \text{ mg L}^{-1}$ ) e nitrogênio amoniacal ( $4,17 \text{ mg L}^{-1}$ ). Sabendo que sulfetos se formam a partir da redução de sulfatos e, além disso, tanto sulfetos quanto nitrogênio amoniacal têm origem nos processos de decomposição da matéria orgânica, é provável que o derivado de enxofre estivesse presente na vinhaça e, conseqüentemente, tenha sido afetado com a alteração do pH. Tal como o amônio, a especiação química dos sulfetos está intimamente relacionada ao pH. A forma mais tóxica,  $\text{H}_2\text{S}$ , facilmente difundida através de membranas celulares devido à ausência de carga elétrica, encontra-se presente somente em  $\text{pH} < 7,0$ , enquanto a forma  $\text{HS}^-$  predomina na amplitude de pH 7 – 14 e, em pH 7,0, há equilíbrio entre as duas formas químicas (Lewis, 2010; Sousa et al.; 2010; Lazzerini, 2013). Na presença de cloro, o sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) pode ser convertido a sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Vilmain et al., 2014), um importante nutriente para as microalgas. A presença de cloro em vinhaça tem sido relatada na literatura (Elia Neto e Nakahondo, 1995; Rolim et al., 2013). Desta forma, após o ajuste do pH da vinhaça para 7,0, passariam a estar presentes na amostra somente as formas  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{HS}^-$ , ambas não causadoras de toxicidade, justificando o melhor crescimento da microalga nas manipulações de pH=3,0 e pH=11,0.

Uma vez que o efeito dos íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  foi semelhante em pH=3,0 e em pH=11,0, a maior densidade de células de *C. vulgaris* em pH=3,0 pode estar relacionada ao efeito da matéria orgânica. Substâncias húmicas existem sob diferentes formas: ácido húmico, ácido fúlvico e humina. Segundo Lombardi (1995), ácido húmico corresponde à fração da substância húmica insolúvel em  $\text{pH} < 2,0$  e solúvel em pH básico, enquanto ácido fúlvico corresponde à fração solúvel em qualquer condição

de pH e humina refere-se à fração insolúvel em qualquer condição de pH. Em meio ácido, o ácido húmico se precipita na forma de produtos escuros e amorfos, podendo combinar-se com elementos metálicos e formar humatos de cálcio ou de magnésio, por exemplo. O ácido fúlvico, por sua vez, apresenta alto conteúdo de grupos carboxílicos e menor massa molecular do que o húmico, podendo formar compostos estáveis com Fe, Cu, Ca e Mg (Silva Filho e Silva, 2002; Görger, 2014).

Ácidos húmico e fúlvico encontram-se presentes na vinhaça (Arafat e Yassen, 2002; Tejada et al., 2007; Van Hoorn e Horst, 2014) e, em pH=11,0, ambos encontram-se solúveis. Em pH=3,0, contudo, o ácido fúlvico encontra-se solúvel, mas há um início de polimerização do ácido húmico. Uma vez que ácido húmico apresenta estrutura complexa e ligação com metais mais forte do que ácido fúlvico, sua polimerização em pH=3,0 pode ter contribuído para o melhor crescimento da *C. vulgaris* nesta condição.

O menor crescimento de *C. vulgaris* após manipulação TIE XAD-8 pode ser devido à remoção de elementos traço ligados aos materiais orgânicos dissolvidos que foram removidos pela resina, independentemente da concentração de vinhaça utilizada. A resina XAD-8 exerce uma adsorção preferencial pela fração hidrofóbica do material orgânico dissolvido (Grzybowski e Pempkowiak, 1992; IHSS, 2015), representada pelos ácidos húmico e fúlvico (Malcom e MacCarthy, 1992; Peña-Méndez et al. 2005). Estes ácidos, presentes na vinhaça (Arafat e Yassen, 2002; Tejada et al., 2007; Van Hoorn e Horst, 2014), possuem estrutura composta principalmente por C, H, O, N e S, que são, basicamente, os mesmos elementos envolvidos no metabolismo das microalgas. Em pH 7,0, como foi ajustada a vinhaça antes do início dos experimentos, os grupos carboxílicos (COOH) dos ácidos fúlvicos encontram-se desprotonados (COO<sup>-</sup>) e, portanto, na forma em que aceitam com maior facilidade os íons metálicos (Lombardi e Jardim, 1999). Por encontrarem-se na fração coloidal, os ácidos húmico e fúlvico apresentam elevada reatividade (Silva Filho e Silva, 2002), disponibilizando cátions e ânions de maneira constante ao longo do tempo e garantindo equilíbrio nutricional satisfatório para suportar o crescimento microalgal. Ao se adicionar a resina XAD-8 estes ácidos foram provavelmente removidos, levando consigo os nutrientes a eles complexados e, conseqüentemente, acarretando o pior crescimento microalgal dentre todas as manipulações TIE avaliadas.

O comportamento semelhante da *C. vulgaris* quando da adição de EDTA e tiosulfato de sódio à vinhaça deve-se ao fato de que ambos os reagentes têm efeito similar na vinhaça, removendo metais catiônicos e, no caso do tiosulfato de sódio, agentes oxidantes como cloretos, brometos, iodetos e sulfetos (Ayres, 1970; USEPA, 1991 e 1992; Buratini et al., 2007; Resgala Jr. et al., 2012). Assim como para a resina XAD-8, as baixas densidades celulares da *C. vulgaris* obtidas quando da adição de EDTA e tiosulfato de sódio podem ser justificadas pela ausência de elementos-traço importantes para o metabolismo microalgal, possivelmente presentes na vinhaça bruta e removidos com a adição dos reagentes quelante e oxidante. Quantidades traço de metais catiônicos como Fe, Mn, Zn, Cu, Cr e Ni já foram detectados em vinhaça (Freire e Cortez, 2000; Christofolletti et al., 2013; Silva et al., 2013). Esses elementos são importantes como componentes estrutural e ativador de enzimas envolvidas em diversas vias metabólicas das microalgas. O elemento Cu, por exemplo, é constituinte fundamental da citocromo oxidase, enzima associada ao transporte de elétrons durante a fotossíntese (Lourenço, 2006; Lombardi e Maldonado, 2011). O elemento Mo, por sua vez, é constituinte da nitrato redutase, enzima responsável pela redução do nitrato em nitrito. O Zn é componente da anidrase carbônica, envolvida no transporte e fixação de CO<sub>2</sub>, e de outras enzimas envolvidas na transcrição do DNA e da fosfatase alcalina, enquanto o Mn compõe tilacóides, cloroplastos e a superóxido-dismutase, responsável pela remoção de radicais superóxidos tóxicos do interior das células, além de atuar como co-fator de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e no ciclo de Krebs (Lourenço, 2006). Nas manipulações envolvendo adição de EDTA e tiosulfato de sódio as maiores densidades de células foram verificadas em vinhaça 30% ( $1,1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>), diminuindo gradualmente com o aumento da concentração do efluente (50% > 70% > 100%). Pode-se racionalizar com base em duas hipóteses: uma da falta de nutrientes e outra de que um eventual componente tóxico tenha sido removido e, com base na concentração de vinhaça, maiores concentrações de EDTA e/ou tiosulfato de sódio seriam necessárias para que a concentração do elemento tóxico fosse reduzida até a concentração presente na vinhaça 30% e, então, teoricamente, crescimento celular da microalga fosse obtido. Além disso, a limitação por luz parece ter sido evidente nas vinhaças mais concentradas.

As taxas específicas de crescimento obtidas nos cultivos em vinhaça foram, em geral, superiores às relatadas na literatura durante o cultivo de microalgas em diferentes efluentes. Yang et al. (2015), avaliando a remoção de nutrientes e produção

de lipídios de *C. pyrenoidosa* em efluentes da produção de amido e etanol, obtiveram taxa de crescimento máxima de  $0,56 \text{ d}^{-1}$ . Os autores apontam que a adição do efluente de etanol possibilitou reduzir o tempo de retenção hidráulica das células da microalga no biorreator, quando comparado aos resultados obtidos durante cultivo somente no efluente de amido. Também Olguín et al. (2015), cultivando a clorofícea *Neochloris oleoabundans* em um efluente biodigerido de vinhaça, obtiveram taxa de crescimento de  $0,28 \text{ d}^{-1}$ , mesmo utilizando baixa concentração do efluente (6%) e suplementando o meio com  $\text{NaHCO}_3$ . Trabalhando com efluentes municipais, Wang et al. (2009) cultivaram *Chlorella* sp. em amostras coletadas de diferentes pontos do processo de tratamento. Os autores obtiveram taxas de crescimento de  $\sim 0,4 \text{ d}^{-1}$  nos cultivos em efluentes prévio e posterior ao tanque de decantação primária, e de  $0,34 \text{ d}^{-1}$  após passagem pelo tanque de lodo ativado. No centrato, um resíduo rico em nutrientes gerado após centrifugação do lodo, os autores obtiveram taxa de  $0,95 \text{ d}^{-1}$ , valor comparável aos obtidos no presente estudo com vinhaça.

O maior valor final de pH (7,79) registrado na concentração 30% de vinhaça manipulada TIE pH=3,0 corrobora a maior densidade de células obtida nesta condição de cultivo. No entanto, pH similar foi verificado nas manipulações TIE pH=11,0 e pH=11,0 + aeração quando utilizada a mesma concentração de vinhaça (30%) e, sob estas condições, menores densidades de células e taxas de crescimento-foram obtidas. A redução do pH verificada com o aumento da concentração de vinhaça pode estar relacionada ao metabolismo heterotrófico de micro-organismos contaminantes, além da reduzida atividade fotossintética da *C. vulgaris* em decorrência de menor penetração de luz. Esses resultados estão de acordo com os de Molinuevo-Salces et al. (2013), que durante cultivo das microalgas *Oocystis* sp. e *Scenedesmus* sp. em efluente da suinocultura, observaram crescimento de organismos heterotróficos contaminantes. Nos cultivos em vinhaça com tiosulfato de sódio foram verificados os valores finais de pH mais baixos dentre todos os cultivos, sendo inferiores a 5,5 a partir da concentração 50% de vinhaça. Neste caso, os baixos valores de pH podem ser atribuídos não somente à contaminação bacteriana e de outros heterótrofos, mas também ao baixo crescimento da microalga frente à limitação de nutrientes possivelmente causada pela adição do reagente.

A rápida depleção de oxigênio nos cultivos de *C. vulgaris* se deve à intensa atividade microbiana no interior dos frascos, uma vez que a vinhaça traz em sua composição, além de elementos minerais, compostos orgânicos, células de leveduras

(Larrahondo et al., 2000; Freire e Cortez, 2000; García e Rojas, 2006; Medina, 2005) e bactérias associadas (Espana-Gamboa et al., 2011). Assim como as microalgas, estes micro-organismos podem rapidamente crescer na vinhaça, uma vez que encontram ambiente favorável devido principalmente ao conteúdo orgânico (Sue et al., 2011). Assim, o oxigênio liberado pelas microalgas é consumido pelas bactérias, que decompõem a matéria orgânica presente no meio produzindo dióxido de carbono, N e P inorgânicos que, por sua vez, poderão ser assimilados pelas microalgas (Valderrama et al., 2002; Travieso et al., 2006). As baixas concentrações de oxigênio dissolvido no interior dos frascos não afetaram o crescimento da *C. vulgaris*. Haas et al. (2014), avaliando o comportamento de 18 espécies de algas e 18 espécies de corais frente a concentrações ambientais ( $6 - 8 \text{ mg L}^{-1}$ ), reduzidas ( $4 - 6 \text{ mg L}^{-1}$ ) e baixas ( $2 - 4 \text{ mg L}^{-1}$ ) de oxigênio, verificaram que as algas mostraram-se extremamente tolerantes, suportando baixas concentrações de oxigênio sem efeitos deletérios sobre a saúde e fisiologia celular. Segundo Banti et al. (2013), tanto algas quanto vegetais superiores respondem a baixas concentrações de oxigênio redefinindo seu metabolismo. Uma vez que a privação de oxigênio compromete a produção de ATP e suprimento de energia, sob condições de hipóxia (deficiência de oxigênio) e anóxia (ausência total de oxigênio) uma série de respostas moleculares e metabólicas são ativadas nos organismos fotossintetizantes, principalmente relacionadas à alteração do metabolismo respiratório mitocondrial para fermentação. A clorófitica *Chlamydomonas reinhardtii*, por exemplo, é capaz de codificar uma série de proteínas específicas, normalmente associadas a organismos anaeróbios estritos, relacionadas ao metabolismo fermentativo (Banti et al., 2013). *Chlorella vulgaris*, por sua vez, foi capaz de produzir ácidos láctico, acético e fórmico, além de pequenas quantidades de dióxido de carbono e hidrogênio, através da fermentação de glicose (Syrett e Wong, 1963). Do ponto de vista da aplicação industrial, a baixa demanda de oxigênio pela cepa de *C. vulgaris* usada nesta pesquisa pode ser um fator favorável uma vez que, conforme ressaltam Bastos et al. (2009), os aspectos de mistura e agitação podem ser limitantes para o escalonamento de processos.

A diminuição dos valores de condutividade elétrica em função do tempo nos cultivos de *C. vulgaris* era esperada, uma vez que com o crescimento microalgal há consumo dos nutrientes do meio. Nos cultivos em vinhaça, entretanto, não foi detectada redução da condutividade, o que pode ser atribuído ao consumo e produção de íons concomitantemente, tanto pela microalga quanto pelos micro-organismos



contaminantes. De acordo com Firstenberg-Eden e Eden (1984), bactérias causam aumento da condutividade elétrica devido à geração de metabólitos carregados, como ácidos orgânicos, e da decomposição de moléculas. A relação entre condutividade e atividade microbiana é tão estreita que Maurer e Guger (1995) e Lyew e Sheppard (2001) sugerem ser a condutividade uma medida indireta da quantificação destes micro-organismos. A vinhaça inicial apresentou condutividade elétrica de 9,91 mS cm<sup>-1</sup> (Tabela 1), similar aos valores encontrados na literatura para este mesmo efluente (Ferreira et al., 2011; Gariglio et al., 2014; Silva et al., 2014). O aumento da condutividade elétrica com o aumento da concentração de vinhaça é devido, basicamente, à maior concentração de sais nas maiores concentrações do efluente.

Uma vez que, após separação da biomassa microalgal, uma finalidade adequada deverá ser dada à vinhaça, o valor da condutividade elétrica é especialmente importante já que, normalmente, a vinhaça é aplicada nas lavouras da cana-de-açúcar como fertirrigação. O cultivo da microalga em vinhaça pode levar à redução da condutividade, pois parte dos nutrientes será transformado em biomassa algal, ainda que a condutividade seja posteriormente alterada pela comunidade microbiana presente na vinhaça. Isso pode favorecer o uso do resíduo pós-cultivo algal no solo. No Brasil a aplicação de vinhaça no solo é regulamentada pela portaria P4.231 da CETESB, que estabelece um volume máximo de vinhaça a ser aplicado com base no seu teor de potássio e nos teores atuais deste elemento no solo (CETESB, 2006) A aplicação de vinhaça no solo pode levar ao aumento da concentração de cátions (Silva et al., 2006; Bebé et al., 2009). Contudo, as propriedades do solo nem sempre são afetadas (Brito et al., 2009; Silva et al., 2014), estando o maior ou menor efeito da vinhaça relacionado à sua concentração e às características do solo em si.

O maior crescimento de *C. vulgaris* obtido nos cultivos em pH=3,0 deveu-se, possivelmente, à maior disponibilidade de nutrientes nessa condição, na forma dos íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, além do efeito da matéria orgânica com predominância de ácido fúlvico, diferentemente do que ocorreu quando se utilizou tiosulfato de sódio, EDTA ou a resina XAD-8. Assim, nas condições experimentais avaliadas, não se pode afirmar que a vinhaça apresenta elementos efetivamente tóxicos à microalga, podendo o baixo crescimento nas maiores concentrações de vinhaça estar relacionado à outros fatores, como pressão osmótica, presença de melanoidinas ou efeito direto da baixa intensidade luminosa penetrante nas elevadas concentrações do resíduo. Ramirez et al. (2014), durante cultivo de *Scenedesmus* sp., verificaram maior crescimento da

microalga em concentrações de vinhaça de até 40%, atribuindo o menor crescimento em concentrações superiores à limitação de luz causada pela coloração escura do efluente. Também Valderrama et al. (2002) atribuem o cultivo de *C. vulgaris* em somente 10% de um efluente oriundo da produção de vinhaça e ácido cítrico ao efeito deletério que a coloração escura provoca no crescimento microalgal. Pant e Adholeya (2007) e Romanholo-Ferreira et al. (2011) apontam que as melanoidinas, compostos recalcitrantes de alta massa molecular responsáveis pela coloração escura da vinhaça, são frequentemente tóxicas aos microorganismos. Neste sentido, Romanholo Ferreira et al. (2011) utilizaram o fungo *Pleurotus sajor-caju* para tratamento da vinhaça, obtendo reduções de ~ 83% da DQO, 99% da coloração e ~ 100% da turbidez do efluente. Posteriormente, os autores conduziram testes de toxicidade com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* nas vinhaças pura e tratada e observaram uma concentração de inibição 9 vezes maior quando utilizado o efluente puro, sugerindo que o tratamento com *P. sajor-caju* foi efetivo para a redução do efeito tóxico da vinhaça. Conforme ressaltam Hirano et al. (1994) e Horikoshi e Gomyo (2014), as melanoidinas se precipitam em  $\text{pH} < 2,5$ . Logo, ao se ajustar o pH da vinhaça para 3,0 pode ter havido um início de polimerização destes compostos, o que também poderia contribuir para o melhor crescimento da microalga nesta condição.

Por fim, é possível que altas concentrações de vinhaça tenham exercido um efeito deletério no crescimento microalgal devido à elevada condutividade, podendo resultar em problemas de pressão osmótica à célula. Segundo Andrade et al. (2008), a concentração de sais dissolvidos contribui para a pressão osmótica do meio, influenciando a fisiologia celular da microalga e a composição da biomassa final. Uma vez que a condutividade elétrica constitui-se em medida indireta da concentração total de sais solúveis presentes numa solução (Nunes Filho et al., 2000) e que a vinhaça ( $14,45 \pm 2,92 \text{ mS cm}^{-1}$  – vinhaça 100%) apresentou valores de condutividade até 44 vezes maiores do que o meio de cultura LC Oligo ( $0,33 \pm 0,06 \text{ mS cm}^{-1}$ ), pode-se inferir que, ao ser transferida de um meio sintético para um efluente com elevada condutividade, a *C. vulgaris* tenha sofrido efeitos deletérios. Em um estudo acerca do efeito do incremento salino na integridade de ecossistemas naturais, Gonçalves (2006) avaliou três espécies de algas clorofíceas (*Pseudokirchneriella subcaptata*, *Chlorella vulgaris* e *Pandorina murum*). As microalgas foram cultivadas em meio MBL (marine biological culture) com concentrações crescentes de NaCl (de 0 a  $14 \text{ g L}^{-1}$ ) e, embora *C. vulgaris* tenha se mostrado mais halotolerante do que as demais espécies, todas

mostraram-se sensíveis às concentrações crescentes de NaCl. Hiremath e Mathad (2010) avaliaram o impacto da salinidade na fisiologia e composição bioquímica de *C. vulgaris*. Para isso, cultivaram a microalga em meio Bold suplementando com NaCl (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 M) durante 30 dias. Os autores observaram inibição dos teores de proteína e carotenóides em todas as concentrações, aumento no conteúdo de clorofila em 0,1 e 0,2 M de NaCl e aumento do conteúdo de carboidratos até 0,3 M de NaCl. Kadioglu e Algur (1992) estudaram o efeito de diferentes concentrações de vinhaça (1; 2,5; 5; 10 e 25%) nos parâmetros de crescimento da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Os autores verificaram aumento nos teores de clorofila a e b, carotenóides e número de células quando utilizadas concentrações de até 5% do resíduo, mas redução significativa do número de células nas concentrações maiores. Segundo os autores, tal efeito pode ser atribuído à pressão osmótica ou, ainda, à presença de metais tóxicos nos meios contendo vinhaça. Segundo Bohnert et al. (1995 citado por Hiremath e Mathad, 2010), sob condições de estresse, as células desenvolvem uma série de estratégias adaptativas, incluindo alterações nos padrões morfológicos e de crescimento, bem como nos processos bioquímicos e fisiológicos, levando ao acúmulo de solutos orgânicos em seu interior. De fato, nesta pesquisa observou-se que, quando cultivada nas maiores concentrações de vinhaça, *C. vulgaris* apresentou, aparentemente, maior volume celular do que quando cultivada em meio LC Oligo ou sob baixas concentrações de vinhaça.

O presente estudo demonstrou que o ajuste de pH foi o principal responsável, dentre os tratamentos avaliados, pelo maior crescimento de *Clorella vulgaris* quando cultivada em vinhaça. As manipulações TIE de pH=3,0 e pH=11,0 refletiram em densidades de células da microalga sempre superiores ao tratamento controle, independentemente da concentração de vinhaça utilizada, com exceção da concentração 100% de vinhaça submetida a pH=11,0. Considerando a importância da vinhaça como fonte de nutrientes para as lavouras de cana-de-açúcar, o cultivo microalgal poderia ser realizado previamente ao descarte do efluente nos canaviais, não comprometendo o fornecimento de água e nutrientes para a cana-de-açúcar. O comportamento da *C. vulgaris* nas concentrações intermediárias de vinhaça (30 – 70%) demonstra a potencialidade de aplicação deste efluente pré-tratado para o cultivo microalgal, com geração de biomassa de elevado potencial biotecnológico concomitantemente ao reúso deste abundante efluente.

## 5 Referências

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Projeto NBR 12.648**. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*). In: Norma Brasileira nº 12.648. Rio de Janeiro, 1992.
- AFNOR – Association Française de Normalisation. **Norme experimental T90-304**. Essais d'évaluation. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. AFNOR: 1980.
- ANA – Agência Nacional de Águas. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil - Encarte especial sobre a crise hídrica. 2014. Disponível em <<http://conjuntura.ana.gov.br/docs/crisehidrica.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2015.
- Andrade, M. R. et al. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2031-2034, 2008.
- Arafat, S.; Yassen, A. E. Agronomic evaluation of fertilizing efficiency of vinasse. In: WCSS (World Congress of Soil Science), 17., 2002, Tailândia. **Anais...** Bangkok: WCSS, 2002. p. 1-6.
- Ayres, G. H. **Análisis químico cuantitativo**. [Quantitative chemical analysis]. Santiago Vicente Perez (Trad.). New York: Harper, 1970. 740 p.
- Banti, V. et al. Low oxygen response mechanisms in green organisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 4734-4761, 2013.
- Barbosa, D. S. **Avaliação e Identificação da Toxicidade (Fase I) em nascentes da bacia do rio Mogi-Guaçu, município de Bom Repouso/MG**. 2010. 108p. Dissertação (Mestre em Ciências)- Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- Barrocal, V.M. et al. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, v. 27, p. 851-856, 2010.
- Bastos, R. G. et al. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica Nægeli* na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 112-116, 2004.
- Bastos, R. G. et al. Consumo de oxigênio por cianobactéria em vinhaça a diferentes temperaturas. In: SHEB – Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 9, 2009, Maringá, PR.
- Bebé, F. V. et al. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.6, p.781–787, 2009.
- Borowitzka, M. A. High-value products from microalgae - their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 743–756, 2013.

Brito, F. L.; Rolim, M. M.; Pedrosa, E. M. R. Efeito da aplicação de vinhaça nas características químicas de solos da zona da mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, n.4, p.456-462, 2009.

Buratini, S. V. et al. Avaliação e identificação da toxicidade no rio Baquirivu-Guaçu (Alto Tietê). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 257-262, 2007.

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

Christofolletti, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, p. 2752–2761, 2013.

Coca, M. et al. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2014.

Collos, Y.; Harrison, P. J. Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 80, p. 8–23, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Desenvolvimento (2015). Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2015. Disponível em:  
<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_03\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 04 jan. 2015.

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

El Nabris, K. J. A. Development of cheap and simple culture medium for the microalgae *Nannochloropsis* sp. based on agricultural grade fertilizers available in the local market of Gaza Strip (Palestine). **Journal of AL-Azhar University – Gaza (Natural Sciences)**, v. 14, p. 61-76, 2012.

Elia Neto, A.; Nakhondo, T. **Caracterização físico-química da vinhaça**. Projeto nº 9500278. Relatório técnico da seção de tecnologia de tratamento de águas do Centro de Tecnologia Copersucar. Piracicaba, 1995. 26p.

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

Feng, F-Y et al. Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1315–1318, 2005.

Firstenberg-Eden, R.; Eden, G. **Impedance Microbiology**. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 1984.

- Freire, W. J.; Cortez, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Série Engenharia Agrícola, v. 1. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 203p.
- Furley, H. T. Identificação da causa da toxicidade de efluentes de fábricas de celulose e papel da America Latina. **O Papel**. Artigo Técnico, p. 34-41, 2009.
- García, A. O.; Rojas, C. A. C. Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. **Tecnicaña**, n. 17, v.9, p. 3-13, 2006.
- Gariglio, H. A. Q. et al. Alterações físicas e químicas em três solos que receberam doses crescentes de vinhaça. **Irriga**, v. 19, n. 1, p. 14-24, 2014.
- Gonçalves, A. M. S. M. **Efeitos ecológicos em espécies de água doce sob stress salino**. 116p. Dissertação (Mestrado em Ecologia)- Universidade de Coimbra, Coimbra, 2006.
- González-Benito, G. et al. Valorisation of by-products from food industry, for the production of single cell protein (SCP) using microalgae. **New Biotechnology**, v. 25, S262, 2009.
- Görge, C. A. Ácidos húmicos e fúlvicos com *Trichoderma*. **Revista Campo & Negócios**, 2014. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/acidoshumicos-e-fulvicos-com-trichoderma/>>. Acesso em: 21 maio 2015.
- Grobbelaar, J. U. Algal Nutrition: Mineral nutrition. In: Richmond, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004. p. 97-115.
- Grzybowski, W.; Pempkowiak, J. Application of Amberlite XAD resins to the isolation of humic substances from sea water. **Oceanologia**, n. 33, p. 105-109, 1992.
- Haas, A. F. et al. Effects of reduced dissolved oxygen concentrations on physiology and fluorescence of hermatypic corals and benthic algae. **Peer J**, v. 2, e235, 2014. doi: 10.7717/peerj.235, 2014.
- Hargreaves, J. A.; Tucker, C. S. **Managing Ammonia in Fish Ponds**. Southern Regional Aquaculture Center Publication, v. 4603, 2004. 8p.
- Harun, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037-1047, 2010.
- Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L., Swift, R. S. (Eds). **Humic Substances II: In Search of Structure**. Wiley-Interscience, New York, 1989.
- Heredia-Aroyo, T. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245-2253, 2011.

Hirano, M. et al. Melanoidin as a novel trypsin inhibitor. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 940-941, 1994.

Hiremath, S.; Mathad, P. Impact of salinity on the physiological and biochemical traits of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. **Journal of algal biomass utilization**, v. 1, n. 2, p. 51-59, 2010.

Horikoshi, M.; Gomyo, T. Precipitation of protein in the presence of melanoidin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 1531-1537, 2014.

IHSS – International Humic Substances Society. **Isolation of IHSS samples**. Disponível em: <<http://www.humicsubstances.org/isolation.html>>. Acesso em: 25 maio 2015.

Juneau, P.; El Berdey, A.; Popovic, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 155–164, 2002.

Kadioglu, A.; Algur, O. F. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution. **Bioresource Technology**, v. 42, p. 1-5, 1992.

Lazzerini, F. T. **Fontes hidrominerais do Brasil: componentes naturais biologicamente ativos**. 388 p. Tese (Doutorado em Geologia Regional)- UNESP, Rio Claro, 2013.

Lewis, A. Review of metal sulfide precipitation. **Hydrometallurgy**, v. 104, p. 222–234, 2010.

Li, Y. et al. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5138–5144, 2011.

Lima, R. P. et al. Atributos químicos de um Neossolo Regolítico distrófico em função das doses e tempos de aplicação de vinhaça. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n. 3, p. 261-268, 2013.

Loffredo E. et al. **Humic substances: versatile components of plants, soils and water**. In: Ghabbour, E. A.; Davies, G. (Eds.). RSC, Cambridge, 2000.

Lombardi, A. T. **Caracterização fluorimétrica da matéria orgânica de origem natural e sua complexação com íons cobre**. 205p. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

Lombardi, A. T.; Jardim, W. F. Fluorescence spectroscopy of high performance liquid chromatography fractionated marine and terrestrial organic materials. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 512-520, 1999.

Lombardi, A. T.; Maldonado, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, p. 77–87, 2011.

Lourenço, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606p.

Lyew, D.; Shepard, J. Use of conductivity to monitor the treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria. **Water Research**, v. 35, n. 8, p. 2081–2086, 2001.

Malcolm, R. L.; MacCarthy, P. Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-resins used in tandem for removing organic solutes from water. **Environment International**, v. 18, p. 597-607, 1992.

Matos, M. de F. **Avaliação e Identificação da Toxicidade de amostras de água e sedimentos do Reservatório de Funil, RJ**. 2011. 59p. Dissertação (Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos)- Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2011.

Maurer, M.; Guger, W. Monitoring of microbial phosphorus release in batch experiments using electric conductivity. **Water Research**, v. 29, n. 11, p. 2613-2617, 1995.

Medina, G. B. Usos alternativos de las vinazas de acuerdo con su composición química. **Tecnicaña**, n. 17, v. 9, p. 15-19, 2005.

Melo, E. D. de. **Avaliação e Identificação da Toxicidade de efluentes líquidos de uma indústria de cosméticos**. 2012. 99 f. Dissertação (*Magister Scientiae* em Engenharia Civil)- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

Molinuevo-Salces, B.; García-González, M. C.; González-Fernández, C. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5144–5149, 2010.

Nunes Filho, J. et al. Relações entre a concentração de íons e a salinidade de águas subterrâneas e superficiais, visando à irrigação, no sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 2, p. 189-193, 2000.

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

Olguín, E. J. et al. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. **Journal of Applied Phycology**, 2015. DOI 10.1007/s10811-015-0540-6.

Öztürk, L.; Demir, Y. The effects of vinasse on some growth parameters of algae. **Frenesius Environmental Bulletin**, v. 10, n. 1010, p. 766-771, 2001.



Padilha, R. S. et al. Evaluation of ZnO Catalyst Supported on Zeolite NaA in the Photocatalytic Degradation of Vinasse Pretreated by Coagulation/Flocculation. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 823-828, 2013.

Pant, D.; Adholeya, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2321–2334, 2007.

Pelletier, M. C. et al. Use of *Ulva lactuca* to identify ammonia toxicity in marine and estuarine sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 12, p. 2852–2859, 2001.

Peña-Mendez, E. M.; Havel, J.; Patocka, J. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 3, p. 13-24, 2005.

Pereira, L. P. F.; Mercante, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, n. 1, p. 81-88, 2005.

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

Ramirez, N. N.; Farenzena, M.; Trierweiller, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp. in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 57, n. 5, p. 630-635, 2014.

Resgala Jr., C. et al. Evaluation of effectiveness of EDTA and sodium thiosulfate in removing metal toxicity toward sea urchin embryo-larval applying the TIE. **Chemosphere**, 89, p. 102–107, 2012.

Rolim, M. M. et al. Influência de uma lagoa de distribuição de vinhaça na qualidade da água freática. **Ambi-Agua**, v. 8, n. 1, p. 155-171, 2013.

Romanholo Ferreira, L. F. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 2011.

SAIC – Science Applications International Corporation. Guide for planning and conducting sediment pore water toxicity identification evaluations (TIE) to determine causes of acute toxicity at navy aquatic sites. User`s Guide UG-2052-ENV. Naval Facilities Engineering Service Center, Port Hueneme, CA, USA. Prepared by SAIC, Newport, RI, USA.

Sigma-Aldrich. **Supelite™ DAX-8**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/20278?lang=pt&region=BR>>

. Acesso em: 25 fev. 2015.

Silva, A. J. N. et al. Alterações físicas e químicas de um Argissolo amarelo sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 1, p. 76–83, 2006.

Silva, M. A. S. et al. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.

Silva, M. A. S. et al. Effects of vinasse irrigation on effluent ionic concentration in Brazilian Oxisols. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 45, p. 5664-5672, 2013.

Silva, W. P. et al. Monitoramento da salinidade de águas subterrâneas em várzea cultivada com cana-de-açúcar fertirrigada com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 394–401, 2014.

Silva Filho, A. V.; Silva, M. I. V. Importância das substâncias húmicas para a Agricultura. In: Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro, 2., 2002. João Pessoa, PB. **Anais... EMEPA - PB**, 2002. v. 2, 234 p.

Singh, D. K.; Mallick, N. Accumulation potential of lipids and analysis of fatty acid profile of few microalgal species for biodiesel feedstock. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 4, n. 1, p. 37-44, 2014.

Sousa, K. A.; Cammarota, M. C.; Sérvulo, E. F. C. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 273-278, 2010.

Souza, R. P. et al. Vinasse treatment using a vegetable-tannin coagulant and photocatalysis. **Acta Scientiarum Technology**, v. 35, n. 1, p. 89-95, 2013.

Spadotim, R. F. **Avaliação Ecotoxicológica e Identificação da Toxicidade no Ribeirão Pires, Limeira – SP**. 2015. 110p. Dissertação (Mestre em Tecnologia)-Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2015.

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

Sue, T. et al. Monitoring microbial contamination in microalgae fermentation process using metabolic footprint analysis – an exometabolomics approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7605-1610, 2011.

Syrett, P. J.; Wong, H-A. The fermentation of glucose by *Chlorella vulgaris*. **Biochemical Journal**, v. 89, p. 308-315, 1963.

Tejada, M. et al. Application of two beet vinasse forms in soil restoration: effects on soil properties in an arid environment in southern Spain. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 119, p. 289–298, 2007.

Travieso, L. et al. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 158–165, 2006.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I toxicity characterization procedures. EPA/600/6-91/003. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, Duluth, MN. 1991. 87p.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Sediment Classification Methods Compendium. EPA 923-R-92\_006. EPA Work Assignment Managers, Office of Science and Technology, Washington, DC. 1992. 229p.

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

Van Hoorn, M.; Horst, R. T. Composition and method for improving survival of bee colonies. United States Patent Applications Publication: US 20140045407 A1, 09 ago. 2013, 13 fev. 2014. Disponível em:  
<<http://www.google.com/patents/US20140045407>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

Vilmain, J-B. et al. Kinetic study of hydrogen sulfide absorption in aqueous chlorine solution. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 2, p. 191-204, 2014.

Wang, L. et al. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 62, n. 4, p. 1174-1179, 2009.

Wang, H. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 215–220, 2012.

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

Yang, L. et al. Nutrients removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 54–61, 2015.

## CAPÍTULO 3

### **CARACTERIZAÇÃO DE *CHLORELLA VULGARIS* E DO CONSÓRCIO MICROBIANO CULTIVADO EM VINHAÇA PRÉ-TRATADA**

#### **Resumo**

O cultivo de microalgas em águas residuárias tem sido proposto como alternativa para reduzir os custos de produção da biomassa e, concomitantemente, diminuir o potencial poluente dos efluentes. Em grande escala, no entanto, a esterilização de efluentes não é viável. Isso leva à ocorrência de interações, benéficas ou não, entre microalgas, fungos e bactérias. O objetivo deste estudo foi cultivar a microalga *Chlorella vulgaris* em vinhaça pré-tratada e em meio de cultura sintético e realizar a bios prospecção de micro-organismos heterotróficos durante o cultivo microalgal. Os isolados foram caracterizados quanto à produção de ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato inorgânico e fixação de nitrogênio, apresentando resultados promissores no tocante à sua futura utilização como organismos promotores de crescimento. A microalga apresentou crescimento 4 vezes maior em vinhaça do que em meio sintético, atingindo  $3,5 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> em 96 horas de cultivo. O crescimento de micro-organismos associados parece não ter afetado negativamente o crescimento microalgal. A biomassa produzida (alga + bactérias) apresentou produtividade protéica de 15,57 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> e houve diminuição dos teores de nitrogênio, sulfato, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) da vinhaça inicial. Os resultados demonstram possibilidade de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça, apesar da elevada carga microbiana associada ao efluente.

**Palavras-chave:** Efluente; Contaminação; Bactérias; Promotores de crescimento.

## CHAPTER 3

### **CHARACTERIZATION OF THE *CHLORELLA VULGARIS* AND THE MICROBIAL CONSORTIUM CULTURED IN PRETREATED VINASSE**

#### **Abstract**

The cultivation of microalgae in wastewaters has been proposed as an alternative to reduce the production costs of biomass and concomitantly reduce the polluting potential of the effluents. Considering that the sterilization of effluents is not feasible on a large scale, interactions involving microalgae, fungi and bacteria can occur and these interactions can be beneficial or not. The aim of this work was to cultivate the microalgae *Chlorella vulgaris* in pretreated vinasse and in synthetic culture medium and perform the biosprospection of heterotrophic microorganisms during the microalgal cultivation. The isolates were characterized regarding its potential for the production of indole acetic acid (IAA), solubilization of inorganic phosphate and nitrogen fixation, with promising results concerning its future use as growth promoters organisms. The microalga achieved 4 times more biomass in vinasse compared to the synthetic medium, reaching  $3.5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  in 96 hours cultivation. The growth of associated microorganisms did not affect the microalgal growth. The produced biomass (algae + bacteria) showed protein productivity of  $15.57 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$  and a decrease in the contents of nitrogen, sulfate, biochemical oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) of the vinasse were obtained. The results demonstrate the possibility of growth of *C. vulgaris* in vinasse despite the high microbial load associated to the effluent.

**Keywords:** Wastewater; Contamination; Bacteria; Growth promotion.

## 1 Introdução

Nas últimas décadas, o cultivo de microalgas em águas residuárias tem sido sugerido como forma de, concomitantemente à redução dos custos de produção destes micro-organismos, obter elevadas densidades de células e reduzir o potencial poluente dos efluentes (Ruiz-Marin et al., 2010; Li et al., 2011; Wang et al., 2012; Olguín et al., 2015). O uso de águas residuárias para cultivos microalgais mostra-se sugestivo pelo fato de que estes efluentes, especialmente os de origem agroindustrial, apresentam elevado conteúdo de nitrogênio e fósforo, bem como outros elementos importantes para o crescimento microalgal (Wang et al., 2008; Maroneze et al., 2013). Efluentes, contudo, tendem a apresentar maior complexidade física, química e biológica do que meios de cultura sintéticos, podendo exigir tratamentos prévios ou diluições para suportar adequado crescimento microalgal (Kadioglu e Algur, 1992; Valderrama et al., 2002; Wang et al., 2012; Candido, 2015).

Uma vez que a esterilização de efluentes não é viável dos pontos de vista econômico e energético, a presença de micro-organismos heterotróficos como bactérias, fungos e leveduras é inevitável em cultivos microalgais. Assim, dependendo do tipo de micro-organismo, poderão ocorrer interações benéficas ou não, que podem interferir no crescimento da microalga cultivada. Fungos e bactérias tendem a apresentar maior velocidade de crescimento do que microalgas (Cho et al., 2011; Sue et al., 2011), podendo tornar o meio de cultivo opaco e, conseqüentemente, reduzir a penetração de luz no sistema. Neste sentido, espécies de algas mixotróficas assumem especial importância, uma vez que sob baixa luminosidade ou na ausência de luz são capazes de utilizar a matéria orgânica como fonte de energia para seus processos metabólicos (Chojnacka e Marquez-Rocha, 2004; Perez-Garcia et al., 2011). No tocante aos micro-organismos associados ao cultivo microalgal, se por um lado a coexistência pode levar à competição por recursos (Tuchman et al., 2006; Cho et al., 2011; Sue et al., 2011), por outro há trabalhos que sugerem uma relação benéfica entre os micro-organismos. À medida que os heterótrofos decompõem a matéria orgânica, há liberação de CO<sub>2</sub> e nutrientes, que são assimilados pela microalga. Esta, por sua vez, libera O<sub>2</sub> durante o processo fotossintético, possibilitando a atividade de degradação bacteriana e, conseqüentemente, levando à diminuição da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) do efluente original (Shantala et al., 2009). Além disso, bactérias e microalgas podem utilizar diferentes substratos para seus processos

metabólicos, de modo a reduzir os efeitos adversos da competição (Tuchman et al., 2006).

Em agricultura, é frequente a utilização de bactérias como inoculantes visando aumentar a produtividade vegetal. Estas bactérias, conhecidas como bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), desenvolvem uma associação íntima com a planta hospedeira e são especialmente eficientes em adquirir nutrientes, seja através da fixação biológica de nitrogênio (Baldani e Baldani, 2005), da solubilização de fosfatos (Nautiyal, 1999; Hara e Oliveira, 2005; Verma et al., 2011) ou pela produção de auxinas reguladoras do crescimento vegetal (Pedrinho et al., 2010; Verma et al., 2011; Andrade et al., 2014). Recentemente, esta prática tem sido avaliada em cultivos microalgais, possibilitando aumentar a quantidade de biomassa produzida através da inoculação de bactérias dos gêneros *Bacillus* sp. (Hernández et al., 2009) e, especialmente, *Azospirillum* sp. (Gonzalez e Bashan, 2000; de-Bashan et al., 2002, 2004, 2008).

A vinhaça é o principal resíduo gerado durante o processo de produção de etanol. Estima-se que, na safra atual, sejam produzidos 28,66 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2015) e um volume de aproximadamente 360 bilhões de litros de vinhaça. A vinhaça apresenta elevados teores de matéria orgânica e sais inorgânicos como sulfatos e fosfatos, além de cálcio, sódio e magnésio (Larrahondo et al., 2000; Freire e Cortez, 2000; Cazetta e Celligoi, 2005; Medina, 2005; García e Rojas, 2006). Devido à sua abundância e riqueza nutricional, este efluente tem sido estudado como meio para o cultivo e produção microalgal, sendo possível obter, com baixas concentrações de vinhaça, concentrações de células próximas ou superiores às verificadas em cultivos convencionais em meios sintéticos (Oliveira e Cáceres, 1986; Kadioglu e Algur, 1992; Oztürk e Demir, 2001; Barrocal et al., 2010; Coca et al., 2014).

Na literatura, são escassos trabalhos que avaliam o perfil da comunidade heterotrófica associada aos cultivos de microalgas em efluentes. Ao contrário da biomassa utilizada para aplicações industriais e farmacêuticas, biofertilizantes e biocombustíveis não exigem culturas puras de microalgas (Cho et al., 2011; Marchello et al., 2015), possibilitando a utilização de efluentes para a produção microalgal. No entanto, o monitoramento microbiano é necessário, uma vez que fungos e bactérias podem afetar a qualidade e segurança do produto final (Mahadevaswamy e Venkataraman, 1981). Mahadevaswamy e Venkataraman (1981)

cultivaram a clorofícea *Scenedesmus acutus* em tanques abertos e quantificaram bactérias, fungos e leveduras. Segundo os autores, a população bacteriana aumentou com o tempo de cultivo microalgal, especialmente quando se introduziu melão (100 mg L<sup>-1</sup>) e CO<sub>2</sub> (30 L h<sup>-1</sup>) ao meio. Os autores identificaram 8 espécies de bactérias do gênero *Micrococcus* sp. e 9 espécies do gênero *Bacillus* sp. Seis isolados não foram identificados e micro-organismos patogênicos, como *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* sp., não foram detectados. Mezzari et al. (2013) avaliaram as interações entre bactérias nativas de um efluente da suinocultura e a microalga *Chlorella vulgaris* durante processo de biodigestão anaeróbica do efluente. Os autores relacionaram a maior redução de nitrato com a fase de maior crescimento das bactérias, além de diminuição nos teores de oxigênio dissolvido no reator. Os autores, no entanto, não buscaram isolar e identificar a microbiota nativa envolvida no processo. Recentemente, Marino-Marmolejo et al. (2015) avaliaram a microbiota associada ao lodo final gerado durante processo de biogestão anaeróbia de vinhaça de tequila. Os autores constataram presença exclusiva de bactérias ácido-tolerantes do gênero *Clostridium* sp.; contudo, esse trabalho não envolveu cultivo microalgal. Mesmo em cultivos não residuais, bactérias têm sido relatadas como intimamente associadas às microalgas. Le Chevanton et al. (2013) isolaram e identificaram 48 espécies bacterianas em diferentes culturas de microalgas marinhas. Os isolados foram classificados em 6 classes distintas e, durante o cocultivo com *Dunaliella* sp., observou-se efeitos inibitórios ou estimulantes à microalga, dependendo do isolado utilizado. Kim et al. (2014) identificaram bactérias dos gêneros *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Shinella* sp., *Flavobacterium* sp. e *Pseudomonas* sp. intimamente associadas a culturas de *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Botryococcus braunii*. Os autores também verificaram aumento de 72% no crescimento de *C. vulgaris* quando cocultivada com *Rhizobium* sp. previamente isolada. Em se tratando de microalgas, os promotores de crescimento são ainda pouco estudados e, nesse sentido, esta pesquisa vem contribuir com informações importantes para a elucidação de problemas e viabilização do cultivo de microalgas em vinhaça.

O objetivo deste trabalho foi cultivar a clorofícea *Chlorella vulgaris* em vinhaça pré-tratada e realizar a bioprospecção dos micro-organismos heterotróficos associados aos cultivos microalgais em meio sintético e em vinhaça. Com isso,



pretende-se identificar espécies microbianas que possam ser usadas como promotoras de crescimento de microalgas em futuros cultivos microalgais.

## 2 Material e Métodos

### Cultivo em vinhaça pré-tratada

A vinhaça utilizada no estudo foi gentilmente cedida pela Usina São João (Araras, SP), sendo coletada diretamente de colunas de destilação a aproximadamente 90°C. Após resfriamento natural a vinhaça foi filtrada em uma sequência de peneiras granulométricas (0,590; 0,210; 0,177; 0,125 e 0,053 mm de abertura; Telastem, Brasil), acondicionada em garrafas plásticas (polietileno) e congelada. No momento da sua utilização a vinhaça foi descongelada, centrifugada (2516 x g, 10 min, Thermo Scientific, USA), filtrada em membranas de fibra de vidro (~1,0 µm, Macherey-Nagel®) e teve seu pH ajustado para  $3,0 \pm 0,1$  (Logen Scientific LS, Brasil), com base nos resultados obtidos em experimentos prévios de Avaliação e Identificação da Toxicidade (TIE) de vinhaça para *Chlorella vulgaris* (Capítulo 2). Após um período de repouso de 2 horas (Barbosa, 2010; Melo, 2012), os valores de pH foram ajustados para  $7,0 \pm 0,1$  e a vinhaça foi usada em concentração de 30%, diluída em água destilada previamente autoclavada. A caracterização físico-química da vinhaça utilizada no estudo, após ajuste do pH para 7,0, está apresentada na Tabela 1.

O ensaio consistiu em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de cultura da microalga *Chlorella vulgaris* em vinhaça 30% e em meio LC Oligo (AFNOR, 1980). A microalga foi mantida e propagada no Laboratório de Biotecnologia de Algas da UFSCar em meio de cultura LC Oligo, em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2$  °C) e luminosidade ( $150 \pm 10$  µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), com fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro). As mesmas condições foram adotadas para o cultivo em vinhaça. Em cada frasco, foram inoculadas  $10^5$  células mL<sup>-1</sup> de *C. vulgaris*, a partir de uma cultura em fase exponencial de crescimento previamente centrifugada (906 x g) e cuja viabilidade foi avaliada em fluorômetro de pulso e amplitude modulada (Phyto-PAM, Walz, Alemanha), através do rendimento quântico máximo do fotossistema II com adaptação das células por 20 minutos no escuro.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química da vinhaça antes e após cultivo de *C. vulgaris*. DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; DQO: Demanda química de oxigênio; COT: Carbono orgânico total; NT: Nitrogênio orgânico total. Teores de K<sub>2</sub>O em kg m<sup>3</sup>; condutividade elétrica em  $\mu\text{S cm}^{-1}$  e demais valores em mg L<sup>-1</sup>.

| Parâmetro <sup>1</sup>                    | Antes cultivo | Após cultivo |
|---|---------------|--------------|
| Sólidos suspensos totais                  | 175           | 160          |
| Dureza calculada                          | 669,7         | 651,5        |
| Condutividade elétrica                    | 5658          | 5317         |
| N nítrico (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) | < 11,4        | < 11,4       |
| N nitroso (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) | < 0,3         | < 0,3        |
| N amoniacal (NH <sub>3</sub> )            | 0,178         | 0,108        |
| N Kjeldahl                                | 43,7          | 29,1         |
| Sódio                                     | 533           | 525          |
| Cálcio                                    | 179           | 175          |
| Potássio                                  | 683           | 660          |
| Magnésio                                  | 54,1          | 52,1         |
| Sulfato                                   | 912           | 756          |
| Fosfato                                   | < 2,0         | < 2,0        |
| DBO 5 dias                                | 5084          | 3137         |
| DQO                                       | 6988          | 5564         |
| Teor de K <sub>2</sub> O                  | 0,82          | 0,80         |
| COT                                       | 2143          | 1878         |
| NT  | 34,72         | 21,88        |
| pH  | 6,61          | 7,07         |

### Monitoramento do crescimento microbiano

O experimento foi conduzido durante 96 horas, com amostragens diárias para acompanhamento dos perfis de crescimento microbiano. O crescimento de *C. vulgaris* foi monitorado por contagem direta em microscópio óptico (Biofocus, Brasil) utilizando câmara de Fuchs-Rosenthal. Para acompanhamento da microbiota heterotrófica associada aos cultivos, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas em meios de cultura PCA (Plate Count Agar - Tryptone glucose yeast Agar, OXOID, Inglaterra) e Sabouraud (Sabouraud dextrose agar, HiMedia, Índia), com incubação durante 24 e 96 horas a 30 °C (Quimis, Brasil). O plaqueamento foi feito tanto para os cultivos em vinhaça como para os frascos controle (LC Oligo), utilizando diferentes diluições conforme a necessidade. Dos cultivos em vinhaça foram também plaqueadas alíquotas em meio PCA para crescimento em jarra de anaerobiose (Anaerobac, Probac, Brasil), no primeiro e no último dia de experimento, com incubação a 25 °C durante 96 horas.

<sup>1</sup> Análises realizadas pela ASL – Análises Ambientais (Rio Claro – SP), exceto COT e NT. Metodologia em anexo.

O crescimento microbiano foi avaliado através de contagem direta do número de colônias, com auxílio de contador de colônias (Phoenix Lufenco CP 602, Brasil). A caracterização físico-química da vinhaça após o cultivo microalgal encontra-se na Tabela 1.

### **Caracterização da microbiota cultivada em vinhaça**

Alíquotas dos cultivos de *C. vulgaris* foram coletadas na fase exponencial de crescimento da microalga e no último dia de cultivo para serem caracterizadas quanto aos teores de proteínas (Bradford, 1976) e carboidratos (Albalasmeh et al., 2013). Colônias distintas observadas nas placas PCA e Sabouraud foram identificadas e caracterizadas visualmente, isoladas em meio PCA e novamente crescidas em tubos invertidos contendo meios TSA (Tryptone soya Agar) ou Sabouraud, conforme a procedência do isolado, para conservação. Para os testes de caracterização fisiológica os isolados foram previamente crescidos em meio TSB (Tryptone soya broth, OXOID, Inglaterra) durante 48 horas e inoculados nos meios específicos para avaliação da produção de ácido indolacético (AIA), fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato inorgânico. Para avaliação da produção de AIA adaptou-se a metodologia proposta por Bric et al. (1991), com crescimento dos isolados em meio TSB 10% contendo 5 mM de L-triptofano durante 72 horas a 28 °C, sob agitação constante (Incubadora refrigerada MA 830, Marconi, Brasil). A quantificação do AIA produzido se deu através do método colorimétrico, com adição do reagente de Salkovski (Gordon e Weber, 1951) e, após incubação por 30 minutos no escuro, leitura em espectrofotômetro a 520 nm. Os isolados foram classificados como baixos produtores de AIA ( $< 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), produtores intermediários ( $20 - 70 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e altamente produtores ( $> 70 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para o teste de fixação de nitrogênio utilizou-se meio NFb semi-sólido (Döbereiner et al., 1995), com incubação dos micro-organismos durante 72 horas a 28 °C. A presença de anel de crescimento, associada ou não à mudança de coloração do meio de cultivo, foi adotada como indicativa da capacidade do micro-organismo fixar nitrogênio. Para o teste de solubilização de fosfato utilizou-se meio contendo fosfato insolúvel, baseando-se nas metodologias propostas por Nautiyal (1999) e Verma et al. (2001), com incubação dos micro-organismos durante 15 dias a 28 °C. Os diâmetros ( $\Phi$ ) das colônias e dos halos de inibição, percebidos como áreas translúcidas ao redor das colônias, foram medidos

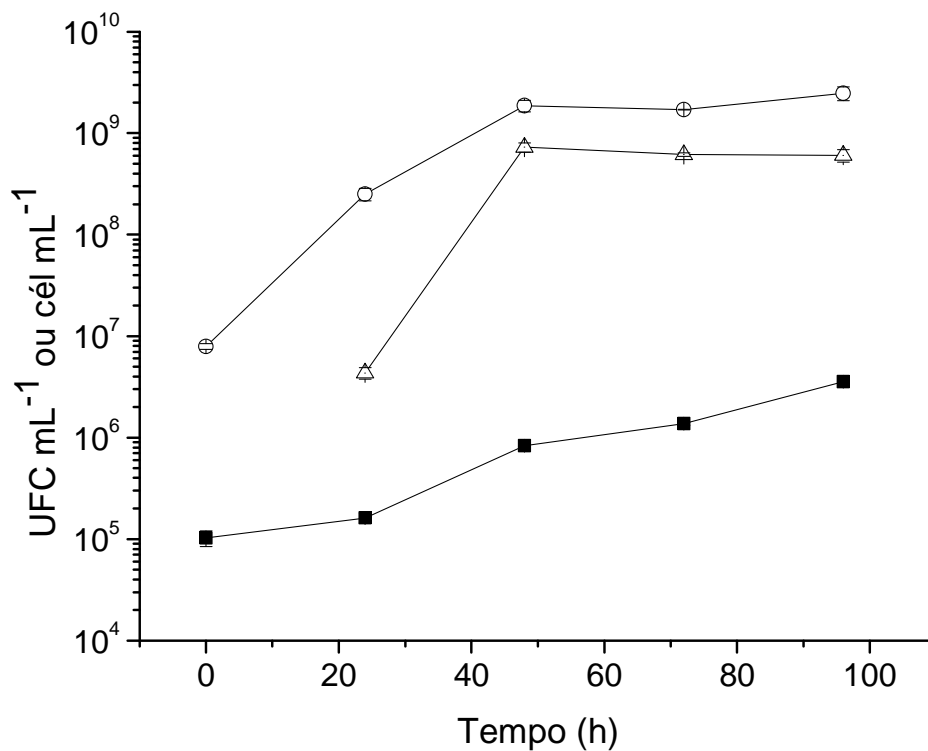
aos 5, 10 e 15 dias. A partir destas medidas foram obtidos Índices de Solubilização [IS =  $\Phi$  halo (mm) /  $\Phi$  colônia (mm)] para cada isolado (Hara e Oliveira, 2005) e, com base nos valores de IS, os isolados foram classificados por potencial de solubilização como não solubilizadores (NS; IS = 0), pouco solubilizadores (IS < 2,0) e altamente solubilizadores de fosfato inorgânico (IS  $\geq$  2,0).

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata utilizando delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey a 5%, conforme a necessidade.

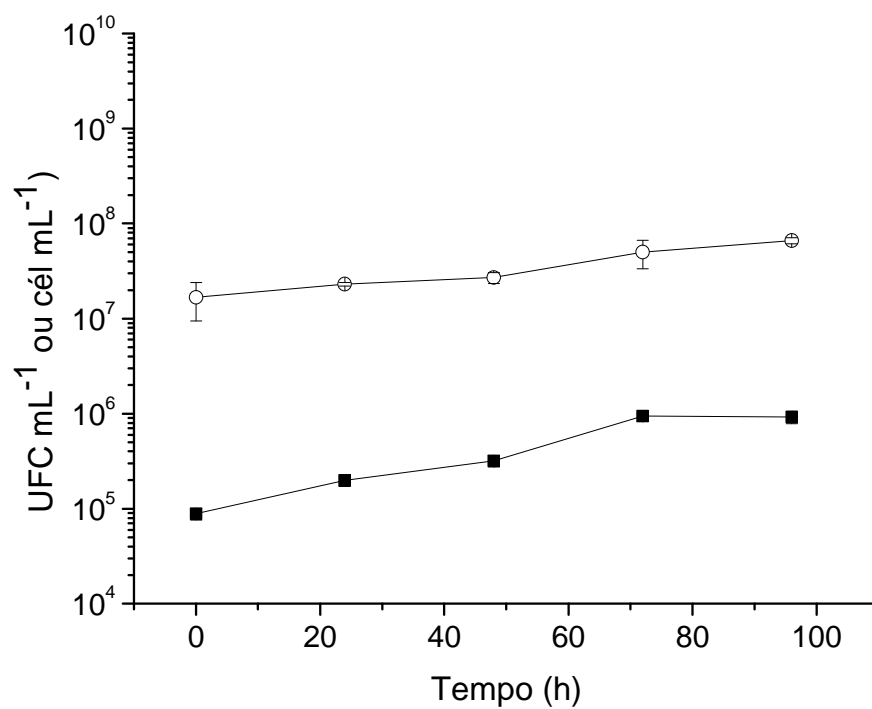
### 3 Resultados

As Figuras 1 e 2 apresentam os perfis de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* e dos micro-organismos associados ao cultivo microalgal em vinhaça e em meio LC Oligo. Ao final de 96 h, o cultivo em vinhaça resultou em maior densidade celular de *C. vulgaris*, atingindo  $3,5 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, aproximadamente 4 vezes mais do que o valor observado no cultivo controle em meio sintético. Na fase exponencial de crescimento a microalga apresentou taxas de crescimento de  $0,98 \pm 0,03$  d<sup>-1</sup> e  $0,79 \pm 0,06$  d<sup>-1</sup> para os cultivos em vinhaça e em meio LC Oligo (controle), respectivamente.

Em meio LC Oligo o número de colônias microbianas obtidas em placas contendo PCA aumentou aproximadamente 4x ( $1,7 - 6,6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) durante o período de cultivo (Figura 2), enquanto no cultivo em vinhaça esse aumento foi de 316x ( $7,9 \times 10^6 - 2,5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>; Figura 1). Em 24 h, não houve crescimento microbiano nas placas Sabouraud oriundas do cultivo em meio LC Oligo (Figura 2), enquanto o cultivo em vinhaça apresentou valores da ordem de  $7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a partir do terceiro dia de cultivo (Figura 1). Nos ensaios com vinhaça o crescimento de micro-organismos heterotróficos, tanto em placa PCA quanto em Sabouraud, foi maior nos três primeiros dias de cultivo e, a partir daí, a contagem de bactérias se manteve em  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> e a de bolores e leveduras em  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Figura 1).

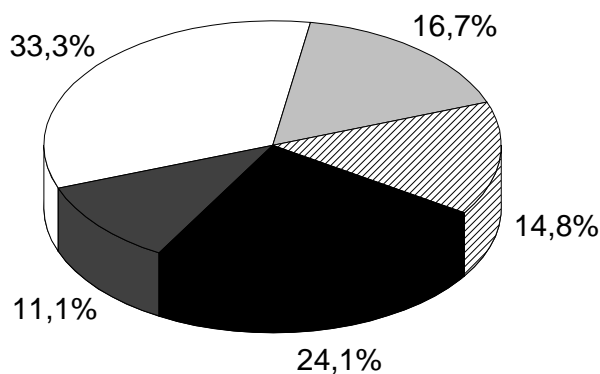


**Figura 1.** Crescimento de *C. vulgaris* (■; cél mL<sup>-1</sup>) e de micro-organismos associados ao seu cultivo em meios PCA (○; UFC mL<sup>-1</sup>) e Sabouraud (Δ; UFC mL<sup>-1</sup>) durante cultivo em vinhaça pré-tratada.



**Figura 2.** Crescimento de *C. vulgaris* (■; cél mL<sup>-1</sup>) e de micro-organismos associados ao seu cultivo em meio PCA (○; UFC mL<sup>-1</sup>) durante cultivo em meio LC Oligo.

Foram identificadas 54 morfologias distintas de micro-organismos nas placas PCA e Sabouraud oriundas dos cultivos em vinhaça e em meio LC Oligo (Figura 3). Contudo, uma vez que a identificação foi somente visual, não se pode afirmar que todos os isolados são de fato diferentes. O maior número de isolados foi proveniente das placas PCA inoculadas com vinhaça (33,3%), enquanto o menor número foi obtido nas placas Sabouraud inoculadas com o meio LC Oligo (11,1%). Neste caso, verificou-se contagem microbiana somente após 96 h de incubação, ao contrário dos demais tratamentos, sugerindo a presença de micro-organismos de crescimento lento e não mensuráveis com 24 h de incubação.



**Figura 3.** Porcentagem de isolados microbianos obtidos do plaqueamento em meios PCA e Sabouraud de alíquotas de vinhaça e meio LC Oligo cultivados com *Chorella vulgaris*. Branco: PCA Vinhaça; Preto: PCA Controle; Cinza claro: Sabouraud vinhaça; Cinza escuro: Sabouraud Controle; Hachurado: PCA Vinhaça em jarra de anaerobiose.

Do total de isolados, 10 não se mostraram cultiváveis nos meios de cultura utilizados. Baseando-se nas características fisiológicas, os isolados cultiváveis foram classificados em 18 grupos (Tabela 2), predominando os produtores intermediários de AIA, fixadores de nitrogênio e medianamente solubilizadores de fosfato inorgânico (20,4%), seguido dos micro-organismos com baixa produção de AIA, não fixadores de nitrogênio e pouco solubilizadores de fosfato inorgânico (15,91%). Nenhum dos isolados procedentes de placas Sabouraud (bolores e leveduras) foi capaz de fixar nitrogênio e solubilizar fosfato inorgânico, no entanto, 50% destes isolados foram classificados como altamente produtores de AIA. Os isolados oriundos das placas mantidas em jarra de anaerobiose mostraram-se como anaeróbios facultativos.

Nenhum destes isolados foi capaz de fixar nitrogênio e todos foram classificados como baixos solubilizadores de fosfato inorgânico ( $IS < 2,0$ ).

Em 96 h de cultivo, o crescimento de *C. vulgaris*, bem como dos micro-organismos associados ao cultivo microalgal, resultou em redução dos teores de nitrogênio total (33,4%) e amoniacal (39,3%), sulfato (17%), DBO (38,2%), DQO (20,4%), COT (12,4%) e NT (37%), contribuindo para melhoria da qualidade do efluente final (Tabela 1).

**Tabela 2.** Caracterização fisiológica dos micro-organismos cultiváveis isolados de meios PCA e Sabouraud a partir de vinhaça e de meio LC Oligo cultivados com *Chlorella vulgaris*.

| Grupo | AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Fixação N | Solubilização P | Isolados (%) |
|-------|-------------------------------|-----------|-----------------|--------------|
| G1    | < 20                          |           | NS              | 0            |
| G2    |                               | +         | $IS < 2,0$      | 0            |
| G3    |                               |           | $IS \geq 2,0$   | 2,3          |
| G4    |                               |           | NS              | 6,8          |
| G5    |                               | -         | $IS < 2,0$      | 15,9         |
| G6    |                               |           | $IS \geq 2,0$   | 0            |
| G7    | 20 – 70                       |           | NS              | 0            |
| G8    |                               | +         | $IS < 2,0$      | 20,5         |
| G9    |                               |           | $IS \geq 2,0$   | 13,6         |
| G10   |                               |           | NS              | 0            |
| G11   |                               | -         | $IS < 2,0$      | 6,8          |
| G12   |                               |           | $IS \geq 2,0$   | 6,8          |
| G13   | >70                           |           | NS              | 0            |
| G14   |                               | +         | $IS < 2,0$      | 2,3          |
| G15   |                               |           | $IS \geq 2,0$   | 2,3          |
| G16   |                               |           | NS              | 9,1          |
| G17   |                               | -         | $IS < 2,0$      | 11,4         |
| G18   |                               |           | $IS \geq 2,0$   | 2,3          |

A biomassa produzida em vinhaça, composta por *Chlorella vulgaris* e pelos micro-organismos heterotróficos, apresentou menor teor de carboidratos e conteúdo protéico semelhante nas fases exponencial e final de crescimento da microalga, com razões proteína/carboidrato (P:C) de 2,75 e 3,25, respectivamente. No meio LC Oligo a biomassa final apresentou maior concentração de carboidratos e teor protéico semelhante nas fases exponencial e final do crescimento microalgal, com razões P:C de 2,01 e 0,68, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3.** Composição bioquímica da biomassa produzida durante cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça e em meio LC Oligo. Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Valores em  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ .

| Tratamento   | Vinhaça          |            | LC Oligo         |            |
|--------------|------------------|------------|------------------|------------|
|              | Fase exponencial | Fase final | Fase exponencial | Fase final |
| Proteínas    | 26,22 a          | 19,51 ab   | 12,79 bc         | 9,48 c     |
| Carboidratos | 9,68 a           | 6,00 b     | 6,36 b           | 13,89 c    |
| Razão P:C    | 2,75 ab          | 3,25 a     | 2,01 b           | 0,68 c     |

#### 4 Discussão

A maior densidade de células de *C. vulgaris* obtida em vinhaça pré-tratada, comparativamente ao cultivo em meio sintético, demonstra a habilidade desta espécie crescer em um meio rico em matéria orgânica. Uma vez que a vinhaça apresenta coloração escura, isso sugere a possibilidade da microalga ter utilizado mecanismos mixotróficos ou heterotróficos para seu crescimento. De fato, a literatura tem demonstrado que alguns gêneros de *Chlorella*, como *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa* e *C. minutissima* apresentam metabolismo mixotrófico, sendo possível obter maior crescimento nestas condições do que em cultivos fotoautotróficos. Bhatnagar et al. (2011) avaliaram o potencial de crescimento mixotrófico de três espécies de microalgas (*Chlorella minutissima*, *Chlamydomonas globosa* e *Scenedesmus bijuga*) em um efluente líquido obtido a partir de cama de frango e obtiveram 180% mais biomassa das microalgas utilizando o efluente do que quando utilizado meio BG11. Abreu et al. (2012), avaliando parâmetros de crescimento e composição bioquímica de *Chlorella vulgaris* em cultivos mixotróficos em soro de queijo, observaram maiores taxa de crescimento, biomassa final e produtividades lipídica e protéica da microalga em comparação com condições fotoautotróficas. Também Wang et al. (2012), investigando o cultivo mixotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* em efluente da suinocultura, verificaram maior concentração de biomassa microalgal no efluente do que em meio Bristol, além de produtividade lipídica de  $6,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  e redução dos teores de DQO, amônia, nitrogênio e fósforo totais.

O maior crescimento de bactérias, bolores e leveduras nas placas oriundas dos cultivos em vinhaça em relação àquelas oriundas do meio LC Oligo era esperado



considerando-se a natureza do efluente. Além de elementos minerais, a vinhaça apresenta compostos orgânicos em sua composição, como glicerol, sorbitol, ácido láctico, alcoóis e açúcares residuais, bem como células de leveduras (Larrañondo et al., 2000; Freire e Cortez, 2000; Medina, 2005; García e Rojas, 2006) e bactérias associadas (Espanña-Gamboa et al., 2011). Devido à riqueza orgânica, estes micro-organismos encontram condições ideais para o crescimento em vinhaça e, pelo fato de apresentarem maior velocidade de crescimento do que as microalgas, tendem a rapidamente ultrapassar o crescimento dos autotróficos e atingir elevadas concentrações celulares. No meio LC Oligo a presença de micro-organismos heterotróficos se deve à utilização de uma cultura unialgal, porém não axênica.

O menor crescimento de micro-organismos heterotróficos a partir do terceiro dia de cultivo da *C. vulgaris* em vinhaça coincide com a fase exponencial de crescimento da microalga, o que também foi verificado por Candido (2015) durante cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça filtrada biodigerida. Pode-se inferir que, numa competição direta por recursos, o aumento do crescimento microalgal tende a estabilizar o crescimento dos micro-organismos associados. Zhang et al. (2012) afirmam que algas podem competir com bactérias por fontes energéticas e de carbono e, na presença de elevadas concentrações de matéria orgânica, como é o caso da vinhaça, inibir o crescimento bacteriano. Além disso, é possível que, devido à fotossíntese microalgal, variações nos teores de oxigênio e pH possam ter exercido efeito inibitório na comunidade bacteriana ali presente (Marchello et al., 2015).

Em nosso trabalho, a quantificação de micro-organismos heterotróficos nos cultivos algais foi superior à verificada por Mahadevaswamy e Venkataraman (1981) durante cultivo da microalga *Scenedesmus acutus* em fotobiorreator aberto. Os autores verificaram concentrações bacterianas entre  $10^5$  e  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> em cultivos heterotrófico e mixotrófico suplementados com 100 mg L<sup>-1</sup> de melaço e 30 L h<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>. Em nosso estudo, a presença destes micro-organismos, contudo, não parece ter afetado o crescimento da *Chlorella vulgaris*, que atingiu densidades celulares aproximadamente 9 e 35 vezes superiores às verificadas no momento da inoculação em meio LC Oligo e em vinhaça, respectivamente. Cho et al. (2011), cultivando *Chlorella* sp. em efluente secundário oriundo de uma estação de tratamento de efluentes municipais, verificaram efeito negativo das bactérias e protozoários no crescimento microalgal. Por outro lado, diversos autores têm relatado efeitos benéficos da interação com bactérias durante cultivos microalgais. Gonzalez e Bashan

(2000), realizando co-cultivo de *Chlorella vulgaris* e *Azospirillum brasilense* em alginato, observaram aumento de biomassa seca e fresca, número de células e conteúdo de pigmentos da microalga, sugerindo a co-imobilização como meio efetivo para aumentar a população microalgal em ambientes fechados. Também Hernandez et al. (2009), avaliando meios com e sem nitrogênio e a presença da bactéria *Bacillus pumilus* em consórcio com *C. vulgaris*, verificaram estímulo ao crescimento microalgal somente quando o nitrogênio não foi adicionado ao meio, atribuindo o melhor crescimento da microalga à fixação deste elemento pela bactéria. Visando aplicar os benefícios do consórcio alga-bactéria no tratamento de águas residuárias, de-Bashan et al. (2004) co-imobilizaram duas espécies de microalgas, *C. vulgaris* e *C. sorokiniana*, com a bactéria *Azospirillum brasilense*. Os autores verificaram, concomitantemente ao estímulo no número de células das microalgas, maior remoção de amônio, nitrato e fósforo de um efluente municipal quando se utilizou o consórcio microbiano, comparativamente ao efeito das microalgas cultivadas sem a bactéria. Assim, os autores sugerem a co-imobilização de micro-organismos como alternativa para o tratamento de águas residuárias. Trabalhando com bactérias nativas, ou seja, não inoculadas propositalmente, Zhang et al. (2012) avaliaram os impactos da comunidade bacteriana na produção de biomassa, conteúdo lipídico e eficiência de tratamento de um efluente oriundo da produção de soja pela microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Os autores não verificaram alterações na produtividade de biomassa da microalga quando co-existindo com as bactérias contaminantes, mas observaram menores conteúdo e produtividade lipídica, além de maior degradação de glicose, DQO, nitrogênio e fósforo totais. Segundo os autores, os resultados benéficos do consórcio alga-bactéria consistem em, à medida que as algas fornecem nutrientes e materiais orgânicos para as bactérias, estas devolvem ao meio íons resultantes da decomposição destes materiais, contribuindo para um melhor desenvolvimento da microalga.

Em plantas superiores, aproximadamente 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir auxinas reguladoras de crescimento vegetal (Andrade et al., 2014). Em nosso trabalho, 75% dos isolados foram, pelo menos, medianamente produtores de AIA ( $\geq 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 40,9% foram capazes de fixar nitrogênio. Uma vez que a vinhaça apresentou maior diversidade microbiana (64,8% dos isolados) do que o meio LC Oligo, estas características podem estar diretamente relacionadas ao melhor crescimento da microalga quando cultivada no efluente.

Alguns de nossos isolados apresentaram produções de AIA superiores a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , valor superior ao obtido por Andrade et al. (2014) com a bactéria *Bacillus* sp. isolada da rizosfera de bananeiras ( $48 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e comparável às produções máximas obtidas por Pedrinho et al. (2010) com espécies de *Bacillus* sp. isoladas de raízes de milho.

Considerando a relação N:P = 16:1 como ótima para o crescimento microalgal (Hillebrand e Sommer, 1999; Falkowski, 2000), a vinhaça apresenta teores limitantes de fósforo (Tabela 1). Este elemento, juntamente com o nitrogênio, é considerado um dos principais limitantes para o crescimento microalgal, participando da regulação celular através da síntese de lipídios e carboidratos, bem como no fornecimento de fosfatos para geração de energia e constituição de moléculas estruturais, como ATP (adenosina trifosfato), ácidos nucleicos, fosfoenzimas e açúcares fosfatados (Lourenço, 2006). Kozłowska-Szerenos et al. (2000) avaliaram a deficiência de fósforo no crescimento de *Chlorella vulgaris* e verificaram crescimento 30 – 40% menor da microalga em meio P-deficiente comparativamente ao cultivo normal em meio Knop. Também Ji e Sherrell (2008), avaliando o efeito da biodisponibilidade de fosfato em *Chlorella* sp. e na cianobactéria *Microcystis* sp., observaram redução das taxas de crescimento e aumento da atividade da fosfatase alcalina, exoenzima relacionada com a disponibilização de P inorgânico nos cultivos P-limitantes (Jonsson e Aoyama, 2010). Em nosso trabalho, 84,1% dos isolados foram classificados como solubilizadores de fosfato inorgânico, com índices de solubilização comparados aos obtidos por Hara e Oliveira (2005) durante caracterização de isolados de rizóbios oriundos de solos da Amazônia. Novamente, o fato de 64,8% dos isolados serem provenientes dos cultivos em vinhaça pode ter contribuído para o maior crescimento da *C. vulgaris* no efluente quando comparado ao cultivo controle em meio sintético.

Os menores teores de nitrogênio total e amoniacal, sulfato, DBO, DQO, COT e NT, como resultado do crescimento microalgal e da comunidade heterotrófica, contribuem para diminuir o potencial poluente da vinhaça. De fato, o cultivo de *C. vulgaris* visando melhorar a qualidade final de efluentes tem sido relatado por diversos autores (González et al., 1997; Martínez et al., 2000; Lim et al., 2010; Ruiz-Marín et al., 2010; Feng et al., 2011), tornando esta prática interessante sob os pontos de vista econômico e ambiental.

Em culturas microalgais, a razão P:C está diretamente relacionada ao estado fisiológico e nutricional do organismo cultivado (Ganf et al., 1986; Montanhim et al., 2014). Em nosso trabalho, a biomassa cultivada em meio LC Oligo apresentou menor

razão P:C ao final do cultivo (0,68) do que na fase exponencial de crescimento (2,01), o que sugere acúmulo de material de reserva, como lipídios e carboidratos, tradicionalmente observado em culturas em fase de declínio do crescimento. Montanhim et al. (2014), trabalhando com duas espécies de clorofíceas para obtenção de biomassa a ser usada em processo de peletização de sementes de *Boowdichia virgilioides*, uma planta nativa do cerrado brasileiro, verificaram razões P:C de 0,4 para *Chlorella sorokiniana* e 18 para *Selenastrum capricornutum*. Trabalhando com *Chlorella vulgaris*, Illman et al. (2000) obtiveram razão P:C de 0,57 em 14 dias de cultivo em meio Watanabe, enquanto Chia et al. (2013) verificaram valores da ordem de 0,53 em 10 dias de cultivo utilizando meio LC Oligo.

A semelhança entre as razões P:C obtidas ao final de 96 h de cultivo (3,25) e na fase exponencial de crescimento da microalga (2,75) em vinhaça pode ser atribuída à presença de maior quantidade de micro-organismos heterotróficos, cujo valor foi ~200x maior do que no cultivo em meio LC Oligo. A biomassa produzida em vinhaça apresentou teores protéicos de aproximadamente 20 pg cél<sup>-1</sup>, superior aos aproximadamente 2,5 pg cél<sup>-1</sup> obtidos por Chia et al. (2013) utilizando a mesma microalga e os mesmos métodos de extração e quantificação de proteínas, porém em meio sintético ao invés de efluente. Trabalhando com efluente municipal, Ahmad et al. (2013) cultivaram *Chlorella vulgaris* durante 8 dias e obtiveram razão P:C = 2,5, enquanto Krithika e Satheesh (2014), durante cultivo de *Chlorella pyrenoidosa*, verificaram razão P:C = 3,46. Em vinhaça biodigerida, Marques et al. (2013) relataram teores protéicos aproximadamente 6 vezes superiores aos de carboidratos (P:C = 6) durante cultivo de *C. vulgaris*. Uma vez que os métodos utilizados para caracterização bioquímica não distinguem a biomassa microalgal daquela composta por micro-organismos heterotróficos (bactérias, bolores e leveduras), teores elevados, especialmente protéicos, são esperados. Em nosso trabalho, a produtividade protéica dos cultivos em vinhaça foi de 15,57 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, aproximadamente 2 vezes inferior à produtividade média obtida por González-Benito et al. (2009) durante cultivo de *Spirulina maxima* em meio suplementado com concentrações de 2 a 10 g L<sup>-1</sup> de vinhaça. Também Coca et al. (2014), trabalhando com a cianobactéria *S. platensis* em meio Schlösser suplementado com concentrações de 2 e 5 g L<sup>-1</sup> de vinhaça, verificaram máxima produtividade protéica de ~ 50 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>. Os elevados teores protéicos observados nos cultivos em vinhaça sugerem a utilização da biomassa produzida para alimentação animal (Lum et al., 2013; Duong et al., 2015).

Em nosso trabalho, a comunidade heterotrófica associada à *C. vulgaris* não foi identificada em nível taxonômico. Contudo, estudos específicos envolvendo genética molecular seriam interessantes para classificar estes micro-organismos que, posteriormente, poderiam ser utilizados como promotores de crescimento durante cultivos microalgais. Do total de micro-organismos isolados, 38,6% são fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fosfato inorgânico e, pelo menos, medianamente produtores de AIA, características desejadas na busca de inoculantes comerciais (de-Bashan et al., 2004; Hara e Oliveira, 2005; Andrade et al., 2014).

Os resultados demonstram a possibilidade de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça pré-tratada como forma de aumentar a biomassa produzida e, concomitantemente, diminuir o potencial poluente deste efluente, apesar da alta carga microbiana associada aos cultivos microalgais.

## 5 Referências

- Abreu, A.P. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–66, 2012.
- Ahmad, F. et al. The potential of *Chlorella vulgaris* for wastewater treatment and biodiesel production. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, S1, p. 461-465, 2013.
- Albalasmeh, A. A. et al. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253-256, 2013.
- AFNOR – Association Française de Normalisation. **Norme experimental T90-304**. Essais dêseause. Determination de L`innibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. AFNOR: 1980.
- Andrade, L. F. et al. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 27–34, 2014.
- Baldani, J. I.; Baldani, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- Barbosa, D. S. **Avaliação e Identificação da Toxicidade (Fase I) em nascentes da bacia do rio Mogi-Guaçu, município de Bom Repouso/MG**. 2010. 108p. Dissertação (Mestre em Ciências)- Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Barrocal, V. M. et al. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, v. 27, p. 851-856, 2010.

Bhatnagar, A. et al. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, p. 3425–3431, 2011.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

Bric, J. M. et al. Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 535-538, 1991.

Candido, C. **Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça convencional e biodigerida tratadas: uma abordagem ecofisiológica**. 2015. 64f. Dissertação (Mestre em Ecologia e Recursos Naturais)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

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

Chia, M. A. et al. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1427-1438, 2013.

Cho, S. et al. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8639–8645, 2011.

Chojnacka, K.; Marquez-Rocha, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, p. 21-34, 2004.

Coca, M. et al. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Desenvolvimento (2015). Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2015. Disponível em:

<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_03\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 04 jan. 2015.

de-Bashan, L. E. et al. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**, v. 36, p. 2941–2948, 2002.

de-Bashan, L. E. et al. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. **Water Research**, v. 38, p. 466–474, 2004.

de-Bashan, L.E. et al. Involvement of indole-3-acetic acid production by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 44, p. 938–947, 2008.

Döbereiner, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60p.

Duong, V. T. et al. High protein and high lipid producing microalgae from northern Australia as potential feedstock for animal feed and biodiesel. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 18, n. 3, artigo 53, 2015.

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

Falkowski, P. G. Rationalizing elemental ratios in unicellular algae. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 1, p. 3-6, 2000.

Feng, Y. et al. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 101–105, 2011.

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

Ganf, G. G. et al. Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 37, n. 2, p. 183 – 197, 1986.

García, A. O.; Rojas, C. A. C. Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. **Tecnicaña**, n. 17, v.9, p. 3-13, 2006.

González, L. E. et al. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 60, p. 259-262, 1997.

Gonzalez, L.; de-Bashan. Y. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1527–1531, 2000.

González-Benito, G. et al. Valorisation of by-products from food industry, for the production of single cell protein (SCP) using microalgae. **New Biotechnology**, v. 25, S262, 2009.

Gordon, S. A.; Weber, R. P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1951.

Hara, F. A. dos S.; Oliveira, L. A. de O. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

Hernandez, J-P. et al. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 88–93, 2009.

Hillebrand, H.; Sommer, U. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 2, p. 440-446, 1999.

Illman, A. M. et al. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631–635, 2000.

Ji, Y.; Sherrell, R. M. Differential effects of phosphorus limitation on cellular metals in *Chlorella* and *Microcystis*. **Limnology and Oceanography**, v. 53, n. 5, p. 1790–1804, 2008.

Jonsson, C. M.; Aoyama, H. Alteração da atividade enzimática em organismos aquáticos por poluentes de origem agrícola: uma abordagem geral e sobre a suscetibilidade da fosfatase ácida. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 920-928, 2010.

Kadioglu, A.; Algur, O. F. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution. **Bioresource Technology**, v. 42, p. 1-5, 1992.

Kozłowska-Szerenos, B. et al. Involvement of glycolate metabolism in acclimation of *Chlorella vulgaris* cultures to low phosphate supply. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 727–734, 2000.

Larrahondo, J. E. et al. Compuestos orgânicos em vinaza. **Cenicaña**, v. 22, n. 3, p. 5-6, 2000. (Carta trimestral).

Kim, B-H. et al. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. **Biomass and Bioenergy**, v. 69, p. 95-105, 2014.

Krithika, G.; Satheesh, P. M. Mass production of microalgae using waste water as supplement and extraction of bio oil by transesterification. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v.3, n. 9,p. 15829-15837, 2014.

Le Chevanton, M. et al. Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. **Algal Research**, v. 2, p. 212–222, 2013.

Li, Y. et al. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5138–5144, 2011.



Lim, S-L. et al. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7314–7322, 2010.

Lourenço, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606p.

Lum, K. K. et al. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, artigo 53, 2013.

Mahadevaswamy, M.; Venkataraman, L. V. Microbial load in mass cultures of green algae *Scenedesmus acutus* and its processed powder. **Journal of Biosciences**, v. 3, n. 4, p. 439-448, 1981.

Marchello, A. E. et al. Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 75-84, 2015.

Marino-Marmolejo, E. N. et al. Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with *Clostridium* predominance. **SpringerPlus**, v. 14, n. 4, 2015.doi: 10.1186/s40064-015-1193-2.

Maroneze, M. M. et al. Avaliação de biorreatores heterotróficos microalgais para o tratamento de efluentes agroindustriais. In: SIGERA - Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 3, 2013, São Pedro, SP.

Marques, S. S. I. et al. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of an aerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1933–1943, 2013.

Martínez, M. E. et al. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263-272, 2000.

Medina, G. B. Usos alternativos de las vinazas de acuerdo con su composición química. **Tecnicaña**, n. 17, v. 9, p. 15-19, 2005.

Melo, E. D. de. **Avaliação e Identificação da Toxicidade de efluentes líquidos de uma indústria de cosméticos**. 2012. 99 f. Dissertação (*Magister Scientiae* em Engenharia Civil)- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

Mezzari, M. P. et al. Bacteria-microalgae interactions during nitrification/denitrifications process in a photobioreactor treating swine wastewater. In: SIGERA – Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 3, 2013, São Pedro, SP.

Montanhim, G. C. et al. Uso de biomassa de algas para a peletização de sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Revista Árvore**, v. 38, n. 5, p. 867-877, 2014.

Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 265-270, 1999.

Olguín, E. J. et al. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. **Journal of Applied Phycology**, 2015. DOI 10.1007/s10811-015-0540-6.

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

Öztürk, L.; Demir, Y. The effects of vinasse on some growth parameters of algae. **Frenesius Environmental Bulletin**, v. 10, n. 1010, p. 766-771, 2001.

Pedrinho, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

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

Ruiz-Marin, A. et al. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 58-64, 2010.

Shantala, M. et al. Diversity of phytoplanktons in a waste stabilization pond at Shimoga Town, Karnataka State, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 151, p. 437-443, 2009.

Sue, T. et al. Monitoring microbial contamination in microalgae fermentation process using metabolic footprint analysis – an exometabolomics approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7605-1610, 2011.

Tuchman, N. C. et al. Differential heterotrophic utilization of organic compounds by diatoms and bacteria under light and dark conditions. **Hydrobiologia**, v. 561, p. 167-177, 2006.

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

Verma, S. C. et al. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

Wang, B. et al. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 707-718, 2008.

Wang, H. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggy wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 215-220, 2012.

Zhang, Y. et al. The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from the production of soybean products. **Water Research**, v. 46, p. 5509-5516, 2012.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho demonstrou que é possível utilizar vinhaça como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*. O uso de concentrações intermediárias do efluente (10 – 50%) possibilitou aumentar a biomassa microalgal produzida em relação ao meio de cultura LC Oligo e, considerando o aspecto econômico, a suplementação com nutrientes minerais não é necessária para se obter maior densidade de células da microalga. A manipulação prévia do pH da vinhaça para valores extremos (pH=3,0 e pH=11,0) resultou em aumento da densidade de células da microalga, enquanto a adição de EDTA, tiosulfato de sódio e resina XAD-8 reduziram o crescimento microalgal, possivelmente devido à remoção de nutrientes importantes às microalgas. Nas condições experimentais avaliadas não se pode afirmar que a vinhaça apresenta elementos efetivamente tóxicos à microalga, podendo o menor crescimento em altas concentrações do efluente estar relacionado ao efeito da pressão osmótica, à menor disponibilidade de luz ou à presença de melanoidinas. Estes fatores, inclusive, merecem estudos futuros específicos a fim de complementar os resultados obtidos no presente trabalho. O crescimento simultâneo de micro-organismos contaminantes não afetou negativamente o crescimento de *C. vulgaris* em vinhaça, sendo identificados micro-organismos com potencial promissor para promover promoção de crescimento através da produção de ácido indolacético, solubilização de fosfato inorgânico e fixação de nitrogênio. A biomassa produzida em vinhaça apresentou elevado conteúdo protéico, o que sugere uma possível aplicação para alimentação animal. O crescimento microbiano em vinhaça reduziu os teores de nitrogênio total e amoniacal, sulfato, DBO, DQO, COT e NT, contribuindo para melhorar a qualidade do efluente através da redução de seu potencial eutrófico. Assim, o cultivo da microalga em vinhaça mostra-se uma alternativa promissora, possibilitando reduzir os custos de produção da biomassa microalgal e contribuindo para valorização e melhoria da qualidade deste abundante resíduo da indústria sucroalcooleira.

**ANEXO.** Métodos utilizados pela ASL – Análises Ambientais (Rio Claro – SP) para caracterização de vinhaça. SMWW: Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. USEPA: United States Environmental Protection Agency ou similar (SW 846).

| Parâmetro                         | Método  |
|-----------------------------------|---|
| Sólidos suspensos totais          | POPDAM024 vs. 13:2012<br>SMEWW 22° ED, 2011<br>METHOD 2540 B, C, D, E         |
| Dureza calculada                  | POPDAM006 vs. 11:2012<br>SMEWW 22° ED 2011<br>METHOD 2340                     |
| Condutividade elétrica            | POPDAM006 vs. 11:2012<br>SMEWW 22° ED 2011<br>METHOD 2510 B                   |
| N nítrico                         | POPDAM054 vs. 07:2012<br>USEPA 300.1 rev. 01:1997                             |
| N nitroso                         | POPDAM054 vs. 07:2012<br>USEPA 300.1 rev. 01:1997                             |
| N amoniacal                       | POPDAM016 vs. 13:2012<br>SMEWW 22° ED 2011<br>METHOD 4500 - NH <sub>3</sub> D |
| N Kjeldahl                        | POPDAM107 vs. 05:2012<br>SMEWW 22° ED 2011<br>METHOD 4500 - N org. B          |
| Sódio, Cálcio, Potássio, Magnésio | POPDAM060 vs. 15:2012<br>Análise: USEPA 6010C rev. 03:2007                    |
| Sulfato, Fosfato                  | POPDAM054 vs. 07:2012<br>USEPA 300.1 rev. 01:1997                             |
| DBO 5 dias                        | POPDAM009 vs. 19:2012<br>SMEWW 22° ED 2011<br>METHOD 5210 B                   |
| DQO                               | POPDAM 029 vs. 19:2012<br>SMEWW 22° ED 2011                                   |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Teor de K <sub>2</sub> O | METHOD 5220 D<br>POPDAM060 vs. 15:2012<br>Análise: USEPA 6010C rev. 03:2007 |
| pH                       | POPDAM022 vs. 17:2012<br>SMEWW 22° ED 2011<br>METHOD 4500 -H +B             |

---