

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

Tratamento físico-químico e cultivo de *Desmodemus*
subspicatus em vinhaça de cana-de-açúcar

LUIZ FELIPE ARJONILLA DE MATTOS

Araras, SP

2014

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

Tratamento físico-químico e cultivo de *Desmodemus
subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar

LUIZ FELIPE ARJONILLA DE MATTOS

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

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

Araras, SP

2014

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

M444tf Mattos, Luiz Felipe Arjonilla de.
Tratamento físico-químico e cultivo de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar / Luiz Felipe Arjonilla de Mattos. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
149 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Alga. 2. Microalga. 3. Vinhaça. 4. *Desmodesmus*. 5. Tratamento físico-químico. I. Título.

CDD: 589.3 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DE

LUIZ FELIPE ARJONILLA DE MATTOS

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
E AMBIENTE, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 18 DE
JULHO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:



PROF. DR. REINALDO GASPAR BASTOS

ORIENTADOR

UFSCar



PROF. DR. RODRIGO DE OLIVEIRA MORAES

FAT



PROFA. DRA. ANA TERESA LOMBARDI

UFSCAR

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a meus pais Luiz Fernando e Mirian pela educação e apoio oferecidos até hoje e também pela paciência para aturar todos os meus altos e baixos, minhas negligências e pessimismos constantes. Sem o incentivo que me deram para fazer o que eu acreditava valioso esse trabalho jamais teria se completado.

À minha irmã Giovanna, pela amizade incondicional e por fazer cada visita ao inferno paulistano uma viagem de volta à infância. Sem você minhas visitas a São Paulo seriam muito mais tediosas.

À minha avó Eunice, minhas tias Regina e Sandra, meu tio Carlos por toda a preocupação que sempre tiveram e ainda têm comigo e pelo imenso carinho que demonstram mesmo com meus longos períodos de ausência.

À equipe da Algae Biotecnologia: Sergio Goldemberg, Daniella Silva, Luciana Miashiro e Luis Carlos Andreatto pelo convívio engrandecedor pessoal e profissional durante os últimos 5 anos, especialmente ao Sergio Goldemberg pela oportunidade oferecida de aperfeiçoamento profissional com o mestrado paralelamente às atividades da empresa.

Ao meu orientador de mestrado Reinaldo Gaspar Bastos por acreditar na minha capacidade e me aceitar como orientado, pela ajuda no momento de propor os experimentos para o projeto e principalmente pela enorme ajuda com a parte escrita, sem a qual tanto o artigo quanto a dissertação pareceriam trabalho de ensino-médio.

Ao professor Claudinei Souza pelo seu esforço constante em unir a turma, o grupo de pesquisa e em ajudar a todos nós alunos, o que aumentou meu círculo de amizades e permitiu conhecer melhor os meus colegas. Seus incentivos nos últimos meses de trabalho foram importantes para que eu não deixasse tudo para trás por minha dificuldade de comunicação.

Também pela ajuda na escrita do trabalho é necessário agradecer, além dos professores Reinaldo e Claudinei, os professores que participaram da minha banca de qualificação Clóvis Parazzi e Ana Lombardi. Suas anotações me ajudaram a reconhecer o que faltava ser dito no trabalho e como organizá-lo.

Aos meus amigos do mestrado Marcus Paulo, Paulo Eduardo, Vanessa, Alexandre, Jaqueline, Larissa, Fabiane, Elisângela, Vivian, Karina, Isabela e Lucas pela amizade, pelas horas infindáveis de conversa.

Resumo

Os processos convencionais de despoluição biológica de águas residuárias agroindustriais envolvem sistemas aeróbios e/ou anaeróbios, com geração de biomassa sem valor comercial e inevitável perda dos nutrientes contidos nos efluentes. Alternativamente, vem sendo estudada a aplicação de microalgas e cianobactérias com potencial produção de proteínas, lipídios ou outros constituintes da biomassa, minimizando o impacto poluidor e representando a valoração dos resíduos. Nesse sentido, o cultivo heterotrófico de microalgas é uma proposta que vem ao encontro da viabilidade destes processos de biorremediação de efluentes, uma vez que envolve o consumo de compostos orgânicos para o crescimento destes micro-organismos na ausência de luz. A vinhaça é a água residuária gerada em abundância no processo de fermentação-destilação para produção de etanol a partir de cana-de-açúcar. De acordo com a sua composição bioquímica, em termos de matéria orgânica e nutrientes, o aproveitamento da vinhaça é aparentemente atrativo para o desenvolvimento de processos biotecnológicos. Apesar disto, tratamentos físico-químicos, como ajuste de pH e adição de floculantes, devem ser estudados para viabilizar este uso. *Desmodesmus subspicatus* é uma microalga clorofícea que tem apresentado alta viabilidade celular em cultivos utilizando águas residuárias industriais e domésticas, tolerando variações de temperatura e pH. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo estudar o tratamento físico-químico de coagulação-floculação e o cultivo heterotrófico de *D. subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar visando a produção de biomassa. Os resultados indicaram que o pH e a aeração apresentam pouca influência no cultivo, sendo que o tempo de batelada ideal deve ser em torno de 9 horas, minimizando os efeitos da contaminação bacteriana. O tratamento físico-químico levou a remoções máximas de DQO em torno de 40% com Ca(OH)_2 e 60% com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. A otimização das condições de processo permitiram um aumento da produtividade lipídica de 69 para 244,8 $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, sugerindo a viabilidade do cultivo heterotrófico de *D. subspicatus* em vinhaça.

Palavras-chave: microalgas, vinhaça, *Desmodesmus*, tratamento físico-químico

Abstract

The traditional processes of biological depollution of agro industrial waste water use aerobic and/or anaerobic systems, which generate biomass without commercial value and inevitable effluent nutrient losses. Alternatively, it's being studied the microalgae and cyanobacteria application for a potential protein, lipid and other biomass constituent production for a minimization of the pollutant impact and as a way of valuating the residue. This way, heterotrophic cultivation of microalgae, is a proposal that could increase the viability of waste water treatment, once it uses organic compounds for the growth of this microorganisms in absence of light, being researched together with the bioremediation of effluents. Vinasse is a waste water highly produced in the fermentation-distillation process for the sugarcane based ethanol production. Depending on its biochemical composition in terms of organic matter and nutrients, the use of vinasse appears to be attractive as a substrate for biotechnological process development. Besides, physical-chemical treatments like pH adjusting and suspended solids flocculation must be studied for its use viabilization. *D. subspicatus* is a *Chlorophyceae* which has presented high cellular viability in cultivations using domestic and industrial waste water as substrate, easily tolerating temperature and pH variations. This said, this study aimed the the physical-chemical treatment of coagulation-flocculation and the heterotrophic cultivation of *D. subspicatus* in sugarcane vinasse aiming the biomass production. The results pointed that pH and aeration had low influence in the cultivation, and the ideal batch time is near 9 hours, lowering the effects of bacterial contamination. The physical-chemical treatment was able to remove COD at the maximum of 40% using calcium hydroxide and 60% using aluminum sulfate. The optimization of the process conditions raised the lipidic productivity from 69 to 244,8 mg.L⁻¹.day⁻¹, suggesting the viability of the heterotrophic cultivation of *D. subspicatus* in vinasse.

Key-words: microalgae, vinasse, *Desmodesmus*, physical-chemical treatment

Sumário

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Sumário.....	iv
Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas.....	ix
1 Introdução e justificativa.....	1
2 Revisão bibliográfica.....	4
2.1 Vinhaça.....	4
2.2 Microalgas.....	7
2.3 <i>Desmodesmus</i>	10
2.4 Tratamento de águas residuárias.....	14
2.4.1 Tratamento físico-químico.....	14
2.4.2 Tratamento Biológico.....	15
2.4.3 Utilização de microalgas.....	16
3 Objetivos.....	19
4 Material e métodos.....	20
4.1 Preparo do meio de cultivo.....	20
4.2 Manutenção e cultivo do inóculo.....	21
4.2.1 Manutenção da cepa no banco de culturas.....	21
4.2.2 Propagação do inóculo.....	21
4.3 Cultivo de <i>Desmodesmus subspicatus</i> em vinhaça.....	22
4.3.1 Biorreator de bancada.....	22
4.3.2 Ensaio preliminares – Seleção das condições de cultivo e tempos de batelada.....	23
4.3.3 Pré-tratamento da vinhaça.....	24
4.4 Análises.....	26
4.4.1 Massa celular seca.....	26
4.4.2 Contagem celular em câmara de Neubauer.....	26
4.4.3 Contagem de heterotróficos totais.....	27
4.4.4 Umidade.....	27
4.4.5 Sólidos totais na vinhaça.....	27

4.4.6 Demanda química de oxigênio (DQO)	28
4.4.7 Carbono orgânico total (TOC)	29
4.4.8 Nitrogênio total (NT)	30
4.4.9 Fósforo Total (PT)	31
4.4.10 Composição da biomassa.....	32
4.5 Parâmetros Cinéticos	34
4.5.1. Velocidade específica de crescimento.....	34
4.5.2. Rendimento de substrato em biomassa	34
4.5.3. Produtividade de biomassa.....	35
4.5.4. Velocidade de consumo do substrato	35
4.5.5. Coeficiente global de transferência gás-líquido.....	36
4.6. Análise estatística	36
4.7. Ensaio exploratório para a determinação das condições de floculação da vinhaça	37
5.1 Cultivos preliminares de <i>Desmodesmus subspicatus</i> em biorreator de bancada com vinhaça bruta.....	39
5.1.1 Sistema de cultivo em batelada simples por 30 horas	39
5.1.2 Sistema de cultivo em batelada simples com resfriamento.....	48
5.1.3 Sistema de cultivo em batelada alimentada.....	52
5.1.4 Repetição do cultivo de <i>D. subspicatus</i> em biorreator de bancada com vinhaça bruta centrifugada.....	55
5.2 Tratamento físico-químico da vinhaça.....	59
5.2.1 Ajuste de pH e floculação da vinhaça	59
5.2.2 Neutralização do pH.....	68
5.3. Sistema de cultivo de <i>D. subspicatus</i> em vinhaça a partir de tempos de batelada inferiores	71
5.3.1 Ensaio com vinhaça bruta centrifugada e autoclavada.....	71
5.3.2 Ensaio com vinhaça tratada com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e autoclavada.....	81
5.3.3 Ensaio com vinhaça tratada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e autoclavada.....	92
6. Conclusões	103
7. Sugestões	104
8. Referências bibliográficas.....	105
9. Anexo	112
9.1. Artigos submetidos	112
9.1.1. Artigo submetido à revista <i>Desalination and Water Treatment</i>	112

9.1.2. Artigo enviando para publicação na revista <i>Engenharia Sanitária e Ambiental</i> (ESA – ABES).....	128
9.2. Trabalhos apresentados.....	141
9.2.1. Trabalho apresentado no 2 nd e 3 rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts.....	141
9.2.2. Trabalho apresentado no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos.....	145

Lista de figuras

Figura 2.1: Metabolismo de carbono em microalgas para períodos de escuro (reações indicadas pelas setas escuras) e claro (Adaptado de Fay, 1983)	8
Figura 4.1: Biorreator de bancada A&Z.....	22
Figura 4.2: Diagrama esquemático do cultivo de <i>Desmosdemus subspicatus</i> em vinhaça.....	24
Figura 4.3: Diagrama de análise da DQO	29
Figura 4.4: Diagrama esquemático da determinação de nitrogênio total usando kit HACH® (os envelopes aqui citados acompanham o kit).....	30
Figura 4.5: Diagrama esquemático da determinação de fósforo total utilizando o kit Bioclin®.....	32
Figura 4.6: Diagrama esquemático da determinação de lipídios totais na biomassa, conforme adaptado de Bligh e Dyer (1959).....	33
Figura 5.1: Curvas de crescimento de Biomassa em vinhaça bruta centrifugada em biorreator de bancada para ensaio com (○) e sem (□) controle de pH (barras de erros indicam o desvio padrão das triplicatas dos pontos)	39
Figura 5.2: Contagem celular de <i>D. subspicatus</i> em batelada simples de 30 horas em vinhaça centrifugada sem controle de pH (barras de erros indicam o desvio padrão das triplicatas dos pontos).....	41
Figura 5.3: Contagem de bactérias heterotróficas em batelada simples de 30 horas em vinhaça centrifugada sem controle de pH.	42

Figura 5.4: Curvas de DQO (○) e NT (□) da vinhaça bruta centrifugada durante o cultivo de <i>Desmodesmus subspicatus</i> sem controle de pH	43
Figura 5.5: Concentração de oxigênio (□) e gás carbônico(○) na vinhaça bruta centrifugada durante o cultivo de <i>Desmodesmus subspicatus</i> sem controle de pH..	44
Figura 5.6: Curva de determinação de KLa no biorreator de bancada com vinhaça a 25°C. As setas indicam o corte (esquerda) e a realimentação (direita) de ar a vazão de 1 VVM.....	46
Figura 5.7: Curva de crescimento de biomassa em vinhaça bruta centrifugada para ensaio com resfriamento de 25 para 15°C	48
Figura 5.8: Contagem de <i>D. subspicatus</i> em vinhaça bruta centrifugada em ensaio de resfriamento	50
Figura 5.9: Contagem de heterotróficos totais em vinhaça bruta centrifugada em ensaio de resfriamento.....	50
Figura 5.10: Curva de crescimento de biomassa para ensaio em batelada alimentada com vinhaça bruta centrifugada.	53
Figura 5.11: Contagem de <i>D. subspicatus</i> em vinhaça bruta centrifugada em ensaio de batelada alimentada com vinhaça bruta centrifugada	54
Figura 5.12: Curva de crescimento de biomassa em vinhaça bruta centrifugada.	56
Figura 5.13: Contagem celular da microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> durante cultivo em vinhaça bruta centrifugada.	57
Figura 5.14: Aspecto da amostra de vinhaça e colóide floculado com cal extinta.....	60
Figura 5.15: Triplicatas de vinhaça após decantação em Jar-test utilizando Ca(OH) ₂ p.a. como coagulante	60
Figura 5.16: Triplicatas de vinhaça decantada em Jar-test após adição de Al ₂ (SO ₄) ₃ e pH ajustado para 12,9 com NaOH.	61
Figura 5.17: Velocidades de sedimentação do material suspenso em relação ao pH do meio usando Ca(OH) ₂ (□) e Al ₂ (SO ₄) ₃ (Δ)	62
Figura 5.18: Remoção da DQO no sobrenadante após a decantação com Ca(OH) ₂ (□) e Al ₂ (SO ₄) ₃ (Δ)	63
Figura 5.19: Imagens das placas Petrifilm® inoculadas com os sobrenadantes da vinhaça decantada (B: Bruta; CA: Ca(OH) ₂ ; AL: Al ₂ (SO ₄) ₃).	68

Figura 5.20: Fotografias das amostras de vinhaça decantada com Ca(OH)_2 após adição de ácido fosfórico (A) e do sobrenadante clarificado (B)	69
Figura 5.21: Aspecto visual da amostra de vinhaça decantada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ após adição de ácido fosfórico.....	70
Figura 5.22: Perfil de biomassa em vinhaça bruta, com destaque para três períodos de crescimento com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas	71
Figura 5.23: Perfis de carbono orgânico total – TOC (○) e nitrogênio total – TN(■) em vinhaça bruta, com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas	72
Figura 5.24: Comportamento das concentrações de TOC e NT(■) em comparação com o desenvolvimento de <i>D. subspicatus</i> (○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas.....	74
Figura 5.25: Contagem celular de <i>D. subspicatus</i> (○) e contaminantes (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas.	77
Figura 5.26: Evolução no consumo dos gases O_2 (○) e CO_2 (■) e evolução do pH (■) com o desenvolvimento de <i>D. subspicatus</i> (○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas.....	79
Figura 5.27: Curva de crescimento de biomassa com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH)_2 e autoclavada	81
Figura 5.28: Curva de concentração de TOC (○) e NT (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH)_2 e autoclavada	82
Figura 5.29: Perfil de fósforo total (PT) durante o cultivo de <i>D. subspicatus</i> com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH)_2 e autoclavada	84
Figura 5.30: Curvas de contagem de <i>D. subspicatus</i> (○) e crescimento em termos de biomassa(■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH)_2 e autoclavada	85
Figura 5.31: Ilustração da diferença entre as taxas de consumo (r_s) e rendimento ($Y_{X/S}$) entre os períodos 1 (■), 2 (◐) e 3 (□).....	86

Figura 5.32: Desenvolvimento das concentrações de <i>D. subspicatus</i> (○) e dos organismos contaminantes (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH) ₂ e autoclavada	88
Figura 5.33: Evolução no consumo dos gases O ₂ (○) e CO ₂ (■) e evolução do pH (■) com o desenvolvimento de <i>D. subspicatus</i> (○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH) ₂ e autoclavada	89
Figura 5.34: Curva de crescimento da biomassa com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com Al ₂ (SO ₄) ₃ e autoclavada.....	92
Figura 5.35: Curva de consumo de nutrientes. TOC (○), NT (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com Al ₂ (SO ₄) ₃ e autoclavada	93
Figura 5.36: Comportamento das concentrações de TOC e NT(■) em comparação com o desenvolvimento de <i>D. subspicatus</i> (○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com Al ₂ (SO ₄) ₃ e autoclavada.....	95
Figura 5.37: Ilustração da diferença entre as velocidades de consumo e rendimento de TOC (■) e NT (□) em biomassa entre os períodos 1, 2 e 3 no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com Al ₂ (SO ₄) ₃ e autoclavada	97
Figura 5.38: Desenvolvimento das concentrações de <i>D. subspicatus</i> (○) e dos organismos contaminantes (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com Al ₂ (SO ₄) ₃ e autoclavada	98
Figura 5.39: Evolução no consumo dos gases O ₂ (○) e CO ₂ (■) e evolução do pH (■) com o desenvolvimento de <i>D. subspicatus</i> (○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com Al ₂ (SO ₄) ₃ e autoclavada.....	99

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Composição química média da vinhaça produzida a partir da fermentação de diferentes mostos a base de cana-de-açúcar (Freire e Cortez, 2000)	5
Tabela 4.1: Composição do meio BGN (RIPKA et al. 1979)	20

Tabela 5.1: Produtividades em termos de biomassa, proteínas e lipídios para cultivo de <i>Desmodesmus subspicatus</i> em vinhaça bruta centrifugada sem controle de pH.	47
Tabela 5.2: Concentrações iniciais de nutrientes da vinhaça utilizada nos ensaios.	59
Tabela 5.3: Análise de variância das médias de decaimento da DQO no ensaio conduzido com Ca(OH)_2 .	64
Tabela 5.4: Análise de variância das médias de decaimento da DQO no ensaio conduzido com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.	64
Tabela 5.5: Comparação entre as médias de DQO com o aumento do pH com Ca(OH)_2 .	65
Tabela 5.6: Comparação entre médias de DQO mediante a utilização de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e NaOH .	65
Tabela 5.7: pH ótimo para a decantação.	66
Tabela 5.8: Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos durante o cultivo de <i>D. subspicatus</i> em diferentes condições de tratamento da vinhaça.	101

1 Introdução e justificativa

As pesquisas objetivando a produção de biomassa de microalgas para as mais diversas finalidades sofreram um aumento expressivo nas últimas décadas, o que se deve principalmente à busca pela diversificação das matrizes renováveis e por energia.

Para que a tecnologia de produção de microalgas seja realmente sustentável economicamente, será necessário pensar o cultivo como mais uma etapa de um processo maior dentro de um conceito de biorefinaria, fazendo uso dos subprodutos em novos processos, aproveitando ao máximo os recursos obtidos a partir da matriz inicial.

A excelência brasileira na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, mundialmente reconhecida, aponta também para a grande produção de resíduos por parte dessa indústria, a qual já passa a ter sua sustentabilidade questionada por órgãos internacionais por suas práticas de descarte, principalmente da vinhaça. Esta água residuária de coloração escura, devido à formação de melanoidinas durante a destilação do vinho, apresenta também altas concentrações de matéria orgânica com alta massa molar e de minerais como potássio, nitrato e cálcio, além de pH entre 3,5 e 4,0. Estas características oferecem limitações para a passagem de luz, fundamentais para cultivos autotróficos, além de um ambiente estressante e com alto potencial osmótico, o que conseqüentemente influencia na velocidade de crescimento das microalgas. Apesar da grande quantidade de matéria orgânica, a maior parte desta encontra-se na forma de dispersão coloidal, estando indisponível para assimilação durante os cultivos microbianos, o que também é um ponto crítico para qualquer tratamento biológico proposto.

As microalgas são consideradas agentes potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias, uma vez que possuem habilidade de remover matéria orgânica e nutrientes dos efluentes, incorporando-os à biomassa. Entretanto, esta aplicação encontra limitações principalmente devido ao custo e à operação dos sistemas autotróficos. Além disso, as águas residuárias agroindustriais, de uma maneira geral, apresentarem turbidez elevada, dificultando a penetração de luz solar. Sendo assim, uma alternativa viável para

culturas autotróficas em fotobiorreatores, embora restrita apenas a algumas espécies de microalgas, é a utilização de cultivos heterotróficos ou mixotróficos. Algumas linhagens de microalgas e cianobactérias, apesar de preferencialmente fotossintetizantes, são capazes de usufruir do metabolismo heterotrófico no escuro a partir do consumo de moléculas orgânicas solúveis tais como açúcares, ácidos orgânicos e acetato (Fay, 1983; Fay, 1992;). Tal habilidade vem sendo estudada nos últimos anos não apenas com o objetivo de despoluição de águas, mas também visando um incremento na produção de biomassa, uma vez que os rendimentos a partir de substratos orgânicos tendem a ser mais elevados do que nos sistemas fotoautotróficos (Dumas *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2002; Bastos *et al.*, 2004; Jacob-Lopes *et al.*, 2006; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

O problema da opacidade da vinhaça poderia ser contornado através do processo de coagulação seguido de floculação e sedimentação, com a obtenção de um sobrenadante translúcido e um decantado de matéria coloidal com alta DQO.

Esse processo por si só já é uma forma válida de tratamento da vinhaça, pois concentra parte considerável da matéria orgânica nela presente, diminuindo seus impactos no meio ambiente e oferecendo uma matriz de alta carga orgânica para o processo de biodigestão anaeróbia, aumentando a eficiência energética e conseqüentemente a rentabilidade. Discutindo-se mais além do simples tratamento da vinhaça, surge como proposta de utilização do sobrenadante como meio de cultivo para a produção de biomassa de microalgas com alto valor agregado em termos de fração proteica e/ou lipídica, como uma forma de aproveitamento e tratamento do resíduo para uma atividade mais agregadora e sustentável.

O cultivo de microalgas, reconhecidamente caro e atualmente economicamente inviável pela via fotossintética comumente estudada, poderia apresentar uma nova abordagem com o aproveitamento da vinhaça de forma integrada com a biodigestão, aproximando-se desta forma do conceito de biorefinarias e apontando um novo rumo mais sustentável para o setor sucroenergético. Além disso, os poucos trabalhos desenvolvidos a respeito da utilização deste subproduto para cultivo de algas ou microalgas na década de

1980 estão restritos ao uso de vinhaça extremamente diluída, o que leva a um aproveitamento bastante limitado (Oliveira, 1988).

Sabendo-se que para o funcionamento de um sistema de cultivo de microalgas os parâmetros como pH, temperatura, contaminação por competidores e luminosidade são variáveis que delimitam a eficiência do processo, torna-se fundamental o estudo dos diferentes tratamentos necessários para atingir qualidades ótimas nestes parâmetros de forma econômica a fim de se obter um meio contendo substratos que levam a altas produtividades e a um melhor desenvolvimento microalgal.

Neste contexto, a presente dissertação tem como objetivo avaliar o cultivo heterotrófico da microalga clorofícea *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça, além de estudar diferentes tratamentos físico-químicos desta água residuária.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Vinhaça

Os países industrializados geram consideráveis quantidades de efluentes urbanos e industriais, não podendo ser despejados diretamente em rios, lagos ou mares sem tratamentos prévios para redução dos contaminantes ambientais (Martinez *et al.*, 2000). Nesse contexto, direcionando para o setor sucroalcooleiro, a vinhaça ou vinhoto é a principal água residuária, consistindo-se no líquido proveniente da destilação da solução alcoólica obtida do processo de fermentação. O vinho é o produto da fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar, do melaço ou da mistura de caldo e melaço. Nos atuais métodos utilizados para produção de álcool, para cada litro de etanol produzido são gerados aproximadamente 10 litros de vinhaça, constituindo-se de fato como a água residuária mais expressiva do ponto de vista tanto quantitativo quanto qualitativo do setor sucroenergético. Seu poder poluente, cerca de cem vezes maior que esgoto doméstico, é decorrente da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, corrosividade, elevadas DBO e DQO, além de cor escura e odor característico, como pode ser observado na Tabela 2.1 (Freire e Cortez, 2000; Sartori, 2011; Bonini, 2012).

A prática chamada fertirrigação é apresentada como a solução para o enorme problema da disposição desse resíduo desde quando foi proibido o seu simples descarte no curso d'água mais próximo da usina; prática comum durante a história (Bonini, 2012). De fato, quando depositada no solo, a vinhaça pode promover uma melhoria na fertilidade, o que beneficia as culturas agrícolas (Falcão, 2005). Entretanto, as dosagens dependem das características do solo e não devem ultrapassar a capacidade de retenção de íons do mesmo, pois quando aplicada em proporções exageradas, ocorre a lixiviação de íons, sobretudo nitrato e potássio, que podem alcançar áreas adjacentes causando impactos ambientais e sanitários (Corbi, 2006; Silva, 2007).

Tabela 2.1: Composição química média da vinhaça produzida a partir da fermentação de diferentes mostos a base de cana-de-açúcar (Freire e Cortez, 2000)

Elemento	Melaço	Misto	Caldo
N (kg.m ⁻³)	0,77	0,46	0,28
P ₂ O ₅ (kg.m ⁻³)	0,24	0,20	0,19
K ₂ O (kg.m ⁻³)	6,00	3,06	1,47
CaO (kg.m ⁻³)	2,45	1,18	0,46
MgO (kg.m ⁻³)	1,04	0,53	0,29
SO ₄ (kg.m ⁻³)	3,73	2,67	1,32
Matéria orgânica (kg.m ⁻³)	52,04	32,63	23,44
Fe (mg.L ⁻¹)	80,00	78,00	69,00
Cu (mg.L ⁻¹)	21,00	7,00	5,00
Zn (mg.L ⁻¹)	9,00	3,00	2,00
Mn (mg.L ⁻¹)	8,00	7,00	6,00
pH	4,40	4,10	3,70

A preocupação quanto aos impactos do uso da vinhaça no ambiente e a contínua mortandade de peixes como consequência da disposição da vinhaça nos rios gerou o Decreto-Lei Nº 303, de 28 de fevereiro de 1967, que proibiu definitivamente a disposição da vinhaça nos rios, lagos e cursos d'água. Após a proibição da disposição da vinhaça nos rios, a primeira solução encontrada foi a aplicação da vinhaça nas chamadas áreas de sacrifício, ou seja, áreas muito próximas às destilarias que sofriam a deposição de grande quantidade de vinhaça, ano após ano. Estas áreas ficavam praticamente inutilizadas para a agricultura, principalmente pelo efeito de salinização do solo, tornando-o improdutivo e de difícil remediação. Com o advento do PROÁLCOOL, e a consequente expansão da indústria alcooleira do país, ocorreu um aumento significativo da produção de álcool, e também da geração de vinhaça, que na safra de 2012/2013 atingiu cerca de 240 bilhões de litros de vinhaça (CONAB, 2013). A tecnologia de uso agrícola da vinhaça no cultivo da cana como fonte fertilizante foi praticamente desenvolvida toda no Brasil, datando os primeiros estudos para aplicação da vinhaça nos solos a década de 1950 e foram conduzidos na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

A composição da vinhaça é função de diversos fatores, tais como matéria-prima e tipo de processo fermentativo. Quando se utiliza o caldo de cana-de-açúcar para a fermentação etanólica, a vinhaça resultante é sempre menos concentrada do que aquela resultante do mosto de melaço ou da mistura destes. Além disto, a quantidade e as características físico-químicas da vinhaça variam de usina para usina e dentro da mesma planta produtiva existem variações nos diversos períodos da safra em função da moagem de diferentes variedades com diferentes índices de maturação, provenientes de diferentes solos e de diferentes níveis de fertilidade. De maneira geral pode-se dizer que a vinhaça proveniente do mosto de melaço é mais rica em matéria orgânica e elementos minerais do que a proveniente de mosto misto e caldo, apresentando o potássio como mineral predominante (0,58 – 0,78%), seguido de cálcio, sulfato, nitrogênio, fósforo e magnésio (Freire E Cortez, 2000).

Na grande maioria dos casos, a vinhaça é empregada “*in natura*” na lavoura da própria cana-de-açúcar, substituindo em parte o uso de fertilizantes. É importante ressaltar que, ainda que a prática da fertirrigação seja apresentada atualmente, no setor sucroalcooleiro, como a solução para o problema da geração de vinhaça, parece claro que seu objetivo principal é descartar um resíduo incômodo e perigoso, da forma mais rápida e econômica possível e que a aplicação da vinhaça diretamente nas soqueiras de cana-de-açúcar pode levar a um acúmulo de sais de potássio, bem como a um desequilíbrio físico-químico e biológico do solo (Macedo, 1991; Pinto, 1999).

Do ponto de vista bioquímico, a vinhaça pode ser considerada um caldo nutriente, podendo ser aproveitada como fertilizante, na extração de componentes, secagem e utilização como suplemento de rações e em cultivos aeróbios e anaeróbios. Apesar do potencial da vinhaça devido a sua composição em nutrientes, são poucos os estudos que abordam a utilização desta água residuária como substrato para o cultivo de micro-organismos, sendo que quase a totalidade diz respeito ao uso de leveduras e fungos filamentosos (Macedo, 1991).

De acordo com Freire & Cortez (2000), a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) da vinhaça é da ordem de 12000 a 20000 mg.L⁻¹, rica em matéria coloidal. Sendo assim, para adequação aos padrões ambientais de qualidade, deve haver tratamento para remoção de matéria orgânica coloidal

solúvel. O uso unicamente de processos físico-químicos de tratamento pode ser economicamente muito custoso, principalmente devido à alta quantidade de água presente, o que torna o tratamento biológico desta água residuária possivelmente mais interessante.

2.2 Microalgas

“Microalga” é um termo genérico, sem efeito taxonômico, que envolve tanto organismos eucarióticos (clorofíceas), quanto procarióticos (cianobactérias). Por décadas estes micro-organismos têm sido estudados visando à produção de biomassa para diferentes aplicações, tais como proteínas unicelulares, lipídios, clorofila, carotenóides, enzimas, agentes antioxidantes, vitaminas e antibióticos (Borowitzka, 1998; Pulz e Gross, 2004; Richmond, 2004; Tomaselli, 2004; Queiroz *et al.*, 2011).

Além disso, estes micro-organismos também despertam atenção devido ao seu potencial de tratamento de águas residuárias, uma vez que possuem habilidade de remover matéria orgânica e nutrientes dos efluentes, incorporando-os à biomassa, permitindo a valoração dos resíduos e a obtenção de uma biomassa passível de ser utilizada na fertilização dos solos, na forma de proteínas unicelulares ou na obtenção de biocombustíveis (Tam e Wong, 2000; Vasconcelos e Pereira, 2001; Bastos *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2007).

Apesar destes micro-organismos apresentarem a fotossíntese como modelo metabólico preferencial, muitas linhagens usufruem do metabolismo heterotrófico no escuro, consumindo moléculas orgânicas solúveis tais como açúcares, ácidos orgânicos e acetato, conforme esquematizado na Figura 2.1 (Fay, 1992; Dumas *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2002; Bastos *et al.*, 2004; Jacob-Lopes *et al.*, 2006).

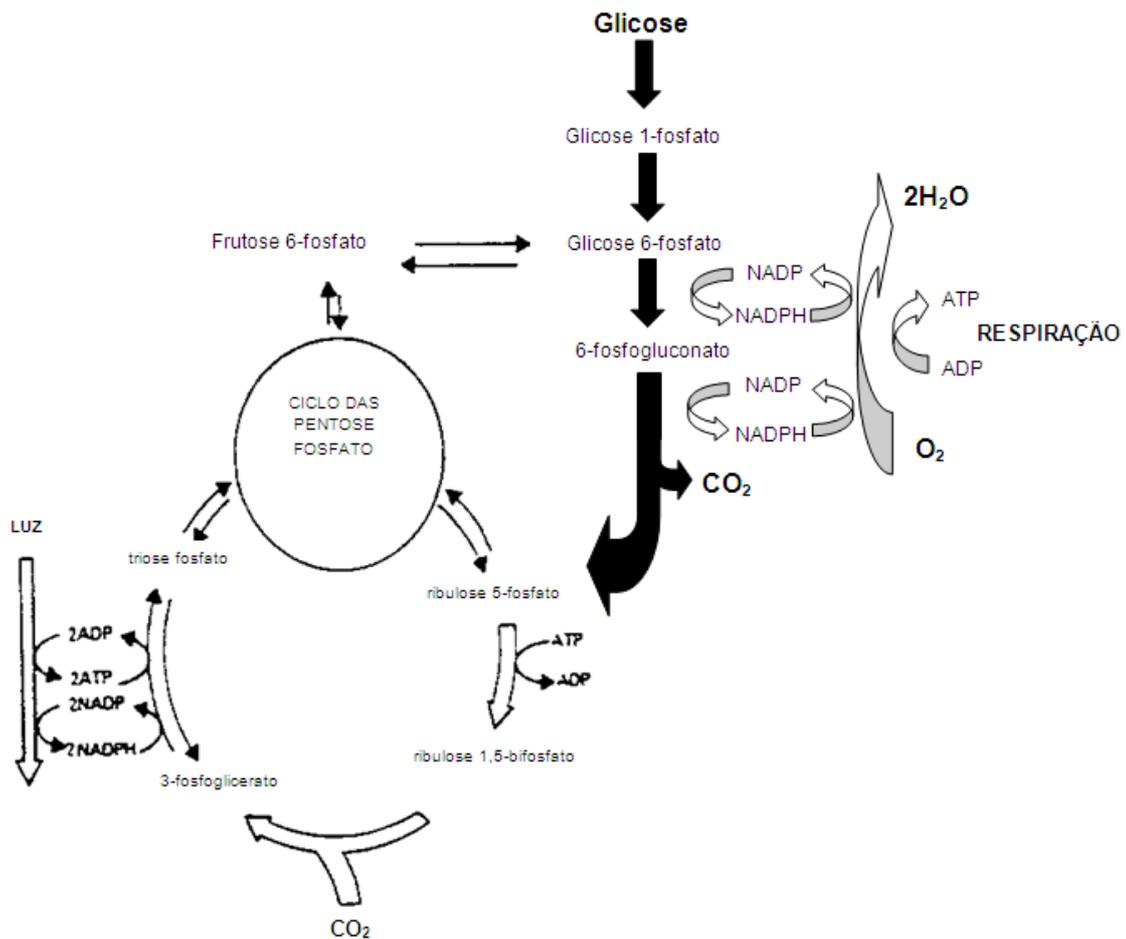


Figura 2.1: Metabolismo de carbono em microalgas para períodos de escuro (reações indicadas pelas setas escuras) e claro (Adaptado de Fay, 1983)

Estas propriedades sugerem possíveis aplicações destes microorganismos na remoção de matéria orgânica e nitrogênio de águas residuárias agroindustriais, o que vem ocorrendo com o gênero *Aphanothece* no sul do Brasil (Queiroz *et al.*, 2007; Manetti, 2008).

Entretanto, são raros os trabalhos na literatura que avaliam a oxidação de moléculas orgânicas solúveis e o consumo de oxigênio por estes microorganismos em efluentes (Oren e Shilo, 1979; Bastos e Queiroz, 2008; Bastos *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2011). A transferência de oxigênio para as células é um dos fenômenos mais importantes para a manutenção do metabolismo aeróbio e o coeficiente global de transferência de massa gás-líquido (K_{La}) é a variável mais importante a ser considerada nestes processos (Montes *et al.*, 1999; Galaction *et al.*, 2004). Apesar de ser uma ferramenta fundamental no estudo do escalonamento de processos aeróbios, a estimativa do K_{La} em cultivos com

microalgas é objeto de raros estudos (Gantzer *et al.*, 1988; Bastos *et al.*, 2011). A literatura indica baixas taxas de consumo de oxigênio para microalgas em cultivo heterotrófico e este fenômeno pode estar ligado à via oxidativa usada por estes micro-organismos (Bastos e Queiroz, 2008; Bastos *et al.*, 2009).

A maioria das microalgas pode utilizar várias formas de nitrogênio para o seu crescimento e, entre estas, a amônia é a mais prontamente incorporada pelas células (Flores e Herrero, 1994). A posição central do metabolismo do nitrogênio via assimilação de amônia é dada pelo ciclo da glutamina sintetase e glutamato sintetase. O glutamato é produzido nesta via não apenas pelos doadores maiores de nitrogênio para a biossíntese de compostos nitrogenados, mas por precursores de alguns aminoácidos, levando a porfirina, ficobilinas e a síntese de clorofila (Fay, 1983).

Devido ao metabolismo diversificado já citado, as microalgas são encontradas praticamente em todos os nichos terrestres (Fay, 1983). Segundo Grossman *et al.* (1994), os fatores de maior importância no cultivo de microalgas são luminosidade, temperatura, agitação e nutrientes. O potássio é fundamental na manutenção do pH intra-celular, na ativação de enzimas, na expressão gênica e na regulação do stress (Alahari *et al.*, 2001). O transporte de íons para sistemas biológicos apresenta importância reconhecida embora seja objetivo de poucos estudos (Reed *et al.*, 1981). No que diz respeito às microalgas, o mecanismo de transporte de íons está pouco elucidado. Entretanto, entende-se que as microalgas possuem um sistema de discriminação entre sódio e potássio, sendo que o sódio é eliminado do interior das células para o meio de cultivo, enquanto há acúmulo de potássio na biomassa.

Com relação aos nutrientes inorgânicos, foi verificado o acúmulo de potássio pelas microalgas *Anabaena* e *Anacystis*, em cultivos com iluminação e 25°C, a taxas de até 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os mecanismos de transporte de potássio ocorrem de forma diferente em microalgas halofílicas, como as do gênero *Aphanothece*, do que com micro-organismos não tolerantes a sais (*Anabaena* e *Anacystis*) nos ambientes que apresentam disponibilidade pobre de potássio, onde o transporte ativo é exigido (Berry *et al.* 2003). Apesar do transporte e de acúmulo de íons apresentarem fundamental importância no cultivo de microalgas, são raros os estudos que evidenciam estes aspectos (Reed *et al.*,

1981; Alahari *et al.*, 2001; Berry *et al.*, 2003).

As microalgas têm sido frequentemente reportadas como microorganismos potenciais para remoção de íons metálicos e metais pesados de águas residuárias (Tam *et al.*, 2001; Harun *et al.*, 2010). Estes sistemas são eficientes especialmente a baixas concentrações de metais, apresentam baixo custo e são ambientalmente corretos. O mecanismo de remoção de íons metálicos de soluções aquosas por microalgas baseia-se na bioadsorção, a qual ocorre em dois estágios: adsorção rápida e passiva na superfície seguida de um lento consumo metabólico dos íons no interior das células. A grande vantagem do estudo de células viáveis para remoção de íons metálicos é justamente o contínuo consumo metabólico após a adsorção física. Tam *et al.* (2001) estudaram a remoção de níquel a partir de duas espécies de *Chlorella* em dez sucessivos ciclos, com 70% de remoção ao final do décimo ciclo. O conteúdo total de níquel acumulado correspondeu a mais que 0,9% da massa seca das células e a formação de clorofila “a” foi inibida pela contínua adsorção dos metais.

Perez-Garcia *et al.* (2011) reportam que certas espécies de microalgas são adaptadas a este tipo de condição de baixa luminosidade e se desenvolvem naturalmente em tanques abertos nas estações de tratamento de efluente onde a água é escura, mas rica em nutrientes, predominando comumente espécies do gênero *Chlorella* e *Scenedesmus*.

Ainda de acordo com Perez-Garcia *et al.* (2011), o metabolismo heterotrófico de microalgas ocorre com difusão facilitada da glicose e/ou de acetato como fontes de carbono orgânico com um íon H^+ por suas enzimas correspondentes, bem como com a difusão facilitada de glicerol quando existente no meio, com eficiências relacionadas de forma inversamente proporcional à presença de CO_2 dissolvido no meio, predominando melhores eficiências na remoção destas fontes de carbono quando a presença de CO_2 dissolvido é baixa.

2.3 Desmodesmus

Nesse sentido, diferentes espécies da microalga clorofícea *Desmodesmus* (*Scenedesmus*) vêm sendo cultivadas na forma de células

livres e imobilizadas em águas residuárias industriais, domésticas e artificiais, apresentando velocidades específicas de crescimento similares às obtidas em meios sintéticos (Martínez *et al.*, 2000; Voltolina *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Ruiz-Marin *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2010; Bhatnagar *et al.*, 2011; Hodaifa *et al.*, 2012; Prathima Devi *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

Esta microalga tem apresentado alta viabilidade celular em águas residuárias domésticas, tolerando variações de temperatura e pH. Martínez *et al.* (2000) avaliaram o cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* em efluente coletado do tratamento secundário da cidade de Granada, Espanha. Estes autores reportam velocidades específicas de crescimento máximas em torno de $0,0438 \text{ h}^{-1}$ a 30°C , com remoção de praticamente todo o fósforo e o nitrogênio do meio. Xin *et al.* (2010) avaliaram o cultivo de *Scenedesmus* sp. LX1 em diferentes fontes de nitrogênio, obtendo remoção de nutrientes próxima a 90% utilizando nitrato ou uréia. Neste mesmo estudo, os autores obtiveram a velocidade específica de crescimento máxima ($0,034 \text{ h}^{-1}$) com amônia, apesar da inibição causada pela redução do pH. Bastos *et al.* (2012) avaliaram o cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça de usinas de açúcar e álcool, constatando crescimento à velocidade específica máxima de $0,096 \text{ h}^{-1}$, com produtividade de biomassa em torno de $1,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Os autores destacam que estes resultados são promissores para geração de biomassa com valor agregado em termos de lipídios e proteínas a partir de águas residuárias agroindustriais.

Entretanto, os estudos com microalgas do gênero *Desmodesmus* são, em sua maioria, relativos a fisiologia e ecotoxicologia, onde se avaliam os danos celulares e inibições causados por diversos agentes, minerais, orgânicos ou físicos.

Krámarová *et al.* (2012) testaram o efeito de arsênico e selênio em culturas de *Desmodesmus quadricauda* observando o efeito tóxico sinérgico destes minerais às culturas, provavelmente devido ao acúmulo destes agentes nas células e o consequente comprometimento do sistema antioxidativo das mesmas.

Malev *et al.* (2012) testaram o efeito da exposição de culturas de *Desmodesmus subspicatus* ao inseticida agrícola Imidacloprid, a Confidor 200SL (formulação comercial de Imidacloprid) e ao ácido 6-cloro-nicotínico

(metabólito ativo do Imidacloprid) observando significativa sensibilidade da microalga ao Confidor 200SL e ao ácido 6-cloro-nicotínico.

Combinando elementos tóxicos orgânicos e minerais, Pokora (2010) testou o efeito de antraceno e cádmio sobre a atividade fotossintética de três diferentes espécies de *Desmodesmus*, chegando à constatação de que um possível mecanismo de defesa possa existir, protegendo o cloroplasto dessas microalgas das espécies reativas de oxigênio, por não ter sido possível observar qualquer efeito tóxico sobre a fotossíntese desta microalga pelos elementos testados.

Rosa *et al.* (2006) demonstraram a inibição do crescimento de *Desmodesmus subspicatus* pelo antagonista feromônico (Z)-11-hexadecil-trifluormetil-cetona, utilizado para conter a broca do milho *Sesamia nonagrioides*.

Fargasova *et al.* (2010) observaram o acúmulo de Fe^{3+} por *Desmodesmus quadricauda* até 20 vezes maior quando este íon encontrava-se complexado com 3-carboxamida-piridina do que quando este se encontrava livre no meio.

Estudando quatro isolados de *Desmodesmus*, Pan *et al.* (2011) selecionaram duas linhagens termotolerantes, resistentes a 45°C por 24 horas, com taxa lipídica de até 50% após estresse por privação de nitrogênio. Os autores apontam para a ligação direta entre a eficiência fotossintética e a formação das cadeias lipídicas em microalgas sob privação de nitrogênio.

Samori *et al.* (2013) verificaram a capacidade de uma linhagem de *Desmodesmus communis* recém isolada de um efluente industrial em remover nitrogênio e fósforo deste mesmo efluente obtendo remoções próximas a 100% após 14 dias em cultivo fotossintético com adição de CO_2 .

Pertencente à mesma família (Scenedesmaceae) que as microalgas do gênero *Desmodesmus*, as do gênero *Scenedesmus* são amplamente estudadas para o tratamento de efluentes. Nesse sentido, Alva *et al.* (2013), buscando conciliar a remoção de nutrientes do efluente doméstico com a acumulação de lipídios, verificaram a eficiência de *Scenedesmus acutus* nestes quesitos utilizando um efluente bruto e um de tratamento secundário obtendo melhores taxas de remoção no efluente de tratamento secundário. Os autores

relatam remoções de até 66% do fósforo e 94% do nitrogênio com implementação lipídica de 28% ao final de 18 horas.

Verificando a capacidade de remoção de nitrogênio e fósforo de água residuária urbana, após tratamento secundário, por *Scenedesmus obliquus*, Martínez *et al.* (2000) obtiveram remoção maior que 99% de nitrogênio amoniacal, tanto por dessorção quanto por bioacumulação, após 188 horas de cultivo, concluindo ao final que a diluição do efluente antes do tratamento por microalgas regularia as condições para uma remoção ótima de nitrogênio e fósforo.

Ji *et al.* (2013) compararam o desenvolvimento de três espécies de microalgas em efluente de tratamento terciário de uma planta de tratamento de esgoto doméstico com aeração forçada e adição de CO₂ obtendo remoções maiores que 99% dos nutrientes em 96 horas e conseguindo velocidades específicas de crescimento de 1,37, 1,14 e 1,00 d⁻¹ para *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Ourococcus multisporus*, respectivamente.

Abou-Shanab *et al.* (2012), testando o desenvolvimento de 7 espécies de microalgas, dentre elas *Scenedesmus obliquus*, obtiveram concentrações máximas de biomassa de 800 mg.L⁻¹ após 20 dias de cultivo desta microalga em efluente de suinocultura com remoções de aproximadamente 60% de nitrogênio e fósforo, observando a remoção de 70% do cálcio ao final deste mesmo período.

Usando água residuária artificial em cultivos semi-contínuos e ciclos de luz e temperatura controlados, Voltolina *et al.* (2004) avaliaram a remoção e a re-ciclagem do nitrogênio por *Scenedesmus obliquus*, obtendo produtividades entre 25,2 e 39,3 mg.L⁻¹.d⁻¹ de biomassa e verificando que a maior redução de nitrogênio se deu durante os períodos luminosos. Os autores apontam para o fato de 43,7% do nitrogênio removido ter sido reciclado em proteínas e outros compostos orgânicos pelas células.

Nuñez *et al.* (2001), também em água residuária artificial, constataram, a partir de cultivos de *Scenedesmus obliquus*, que uma das principais importâncias das microalgas no tratamento de efluentes está na depleção do nitrogênio amoniacal do meio pela elevação do pH gerada por esses organismos.

2.4 Tratamento de águas residuárias

2.4.1 Tratamento físico-químico

Apesar de bastante estudadas como agentes de tratamento biológico de efluentes, as microalgas possuem necessidades muito específicas, o que leva à necessidade de manipulação prévia do efluente, de forma a favorecer o seu desenvolvimento (Giordano, 2012).

A coloração escura, o baixo pH, as altas temperaturas e as elevadas quantidade de matéria orgânica e contaminantes microbianos são problemas que devem ser superados previamente ao cultivo de microalgas, a fim de garantir as condições ótimas para o seu desenvolvimento visando a obtenção de uma biomassa de boa qualidade, possível de ser escoada como um produto de alto valor.

Para isso, técnicas de tratamento físico-químico já usuais no tratamento de efluentes industriais, como a utilização de agentes floculantes, corretores de pH, resfriadores, decantadores e flotadores surgem como uma alternativa interessante, por ser tecnologia já desenvolvida empregada em diversos setores, com custos viáveis de implantação e manutenção, além da facilidade de manuseio, exigindo pouca mão de obra, com baixo grau de especialização (Giordano, 2012).

A técnica de floculação e coagulação se fundamenta na aproximação das partículas em suspensão pela alteração das cargas entre suas superfícies, gerando agregados de maior tamanho e de maior densidade, o que acelera o tempo de sedimentação deste material (Felici, 2010).

Para que esse fenômeno ocorra são utilizados agentes químicos orgânicos e inorgânicos portadores, em sua maioria, de carga positiva. Como exemplo dos agentes inorgânicos, pode-se citar o cloreto férrico, o $Al_2(SO_4)_3$, o sulfato ferroso, o policloreto de alumínio e o $Ca(OH)_2$. Já como exemplo de agentes orgânicos citam-se os polímeros catiônicos e os policátions. Por fim, como otimizador de coagulação, os polímeros aniônicos e não-iônicos (Dewolf, 2003).

Os polycations e os cátions metálicos como Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} e Ca^{2+} neutralizam as cargas negativas da superfície do material em suspensão e aproximam as partículas pela diminuição das forças repulsoras entre elas. Já os polímeros catiônicos atraem as partículas e formam pontes entre elas formando agregados maiores e mais estáveis, semelhante ao que acontece na utilização dos polímeros aniônicos e não iônicos em etapa secundária à adição de floculantes inorgânicos. Essa formação maior e mais estável tende a sedimentar mais rapidamente, o que é uma característica desejável em qualquer processo deste tipo.

Além da adição dos agentes floculantes, é necessário o ajuste do pH a um pH ótimo de floculação e uma branda agitação do meio para que ocorram colisões agregadoras entre os flocos formados (Dewolf, 2003).

2.4.2 Tratamento Biológico

Apesar do potencial nutritivo da vinhaça relacionado à sua composição em termos de matéria orgânica e minerais, são poucos os estudos que abordam a utilização desta água residuária como substrato para o cultivo de microorganismos (MACEDO, 1991). Pesquisadores da Divisão de Açúcar e Fermentação do Instituto Nacional de Tecnologia estudaram a produção de biomassa fúngica cultivada em vinhaça *in natura* e vinhaça concentrada de cana-de-açúcar e mandioca. O tratamento da vinhaça para produção de proteínas unicelulares de *Torula utilis* é dispendioso por exigir grandes quantidades de minerais e aparelhagem de alto custo, devido à difícil separação das células. Desta forma, a alternativa seria a utilização de fungos filamentosos de fácil separação. Neste caso, foi possível obter redução de DBO de 83%, com produção de aproximadamente 4000 mg.L^{-1} de biomassa seca em vinhaça esterilizada. Navarro *et al.* (2000) usaram vinhaça ao invés de água no preparo de meio de cultivo para fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* CMI237 com resultados promissores. Macedo (1991) estudou o crescimento de leveduras e bactérias fixadoras de nitrogênio em vinhaça verificando crescimento da levedura *Candida utilis* em cultura mista com

bactérias fixadoras de nitrogênio, provocando um decréscimo na DBO da vinhaça.

O tratamento simultâneo de carbono e nitrogênio de águas residuárias agroindustriais por incorporação dos nutrientes à biomassa vem sendo investigado como alternativa aos processos convencionais de despoluição (Martínez *et al.*, 2000), sendo a utilização de microalgas uma das propostas para a remoção de nutrientes de águas residuárias por incorporação à biomassa, com a possibilidade, em alguns casos, de tornar a biomassa cultivada um subproduto com valor negociável (Lodi *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2000; Xin *et al.*, 2010).

Xin *et al.* (2010) afirmam que a remoção de nutrientes, que ocorre principalmente por absorção, possui uma relação direta com a velocidade específica de crescimento dos micro-organismos. Entretanto, nitrogênio e fósforo poderão ser utilizados para o crescimento celular e removidos de forma eficiente somente se a água residuária apresentar relação N:P apropriada (Bonini, 2012).

2.4.3 Utilização de microalgas

O tratamento biológico de águas residuárias, que é normalmente um procedimento atrelado a elevados custos, envolvendo a remediação e a disposição da biomassa gerada, passa a ter este problema atenuado com a produção de biomassa de alto valor, a qual contribui para a viabilização do processo através da possibilidade de ser escoada como um produto e não como um poluente (Queiroz *et al.*, 2001; Manetti, 2008).

Dentre os vários gêneros de microalgas, *Chlorella* e *Scenedesmus* têm sido as mais frequentemente estudadas na remoção de nutrientes de águas residuárias. Neste cenário, Tam e Wong (1996), avaliando diferentes concentrações de amônia no desenvolvimento de *Chlorella vulgaris* e sua conseqüente remoção do meio de cultivo, verificaram o máximo de remoção de 53% do nitrogênio amoniacal a 20°C acompanhando o crescimento da

microalga, sendo este um indício de que houve absorção e assimilação do nutriente.

González *et al.* (1997), avaliando a remoção de amônia e fósforo de uma água residuária decorrente de processo de fabricação de laticínios e suinocultura pelas microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus dimorphus*, observaram remoções de 90% e 55% do nitrogênio amoniacal e de fosfato, respectivamente.

Os resultados obtidos por Martínez *et al.* (2000) mostram que a remoção de nitrogênio de efluentes artificiais pela microalga *Scenedesmus obliquus* foi influenciada pela temperatura, observando-se remoção máxima de 99% em 188 horas, a 25 e 30°C.

De-Bashan *et al.* (2002) avaliaram a eficiência de remoção de amônia e fósforo de água residuária sintética pela microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato e também a associação desta com a bactéria promotora de crescimento *Azospirillum brasilense*, verificando diferenças significativas na eficiência de remoção com essa associação, apenas no caso do fósforo, verificando-se a semelhança entre os resultados de remoção do nitrogênio.

Ainda no contexto do tratamento de efluentes líquidos, Kumar *et al.* (2010) verificaram a inexistência de diferença entre fontes nutricionais orgânica e inorgânica no que concerne ao desenvolvimento microbiano quando avaliaram a influência da quantidade de nutrientes e da frequência de alimentação de um reator com um efluente digerido da suinocultura (fonte orgânica) e com água residuária sintética de composição semelhante (fonte inorgânica) no crescimento de *Chlorella vulgaris*, concluindo que uma elevada taxa de crescimento pode ser alcançada desde que haja quantidades suficientes de nutrientes para os micro-organismos se desenvolverem.

Sobre este aspecto, Wang *et al.* (2008) afirmam que águas residuárias e efluentes secundários constituem fontes de nitrogênio de baixo custo para o cultivo de microalgas, uma vez que contêm grandes quantidades de diferentes formas deste nutriente, sendo assim uma opção mais rentável quando o objetivo é produzir biomassa.

Novamente, a produção de microalgas com aproveitamento de resíduos agroindustriais se baseia na utilização dos nutrientes: matéria orgânica e sais

dissolvidos nestes resíduos, para o desenvolvimento de biomassa que surge como uma alternativa para suplementação alimentar animal, principalmente peixes e moluscos (Ferreira, 2009).

3 Objetivos

O objetivo da presente proposta de dissertação de mestrado foi avaliar o tratamento físico-químico da vinhaça de cana-de-açúcar e o cultivo de *Desmodesmus subspicatus* em diferentes condições operacionais

Objetivos específicos:

- cultivo da microalga *D. subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar em condições de bateladas simples e alimentada em biorreator de bancada;
- avaliar o desempenho da microalga *D. subspicatus* em condições heterotróficas de cultivo;
- avaliar o potencial de remoção de nutrientes da vinhaça por *D. subspicatus* em biorreator de bancada;
- tratamento físico-químico da vinhaça por adição de coagulantes para remoção de parte da matéria orgânica;
- cultivo da microalga *D. subspicatus* em vinhaça após tratamento físico-químico, analisando a produtividade em biomassa.

4 Material e métodos

4.1 Preparo do meio de cultivo

Para a manutenção das cepas em nosso banco de culturas e o seu cultivo autotrófico foi utilizado o meio Braun-Grunow Medium (BGN) como modificado por Ripka *et al.* 1979.

O meio BGN foi preparado a partir de soluções-mãe de seus macronutrientes e de uma solução-mãe contendo seus micronutrientes, cujas concentrações são apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição do meio BGN (RIPKA et al. 1979)

Componente	Solução estoque	Quantidade para 1 L
K_2HPO_4	3 g.100mL ⁻¹	1 mL
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,5 g.100mL ⁻¹	1 mL
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,6 g.100mL ⁻¹	1 mL
Citrato de amônio férrico	0,6 g.100mL ⁻¹	1 mL
Na_2 EDTA	0,1 g.100mL ⁻¹	1 mL
Ácido cítrico	0,6 g.100mL ⁻¹	1 mL
Na_2CO_3	2,0 g.100mL ⁻¹	1 mL
$NaNO_3$	15 g.100mL ⁻¹	10 mL
NaCl	7,2 g.100mL ⁻¹	1 mL
<u>Metais traço</u>		1 mL
H_3BO_3	286,0 mg.100mL ⁻¹	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	181,0 mg.100mL ⁻¹	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,0 mg.100mL ⁻¹	
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	39,0 mg.100mL ⁻¹	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	7,9 mg.100mL ⁻¹	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4,0 mg.100mL ⁻¹	

Inicialmente adicionaram-se na proporção devida para o volume desejado as soluções-mãe, em seguida completou-se o volume com água destilada e procedeu-se a esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.2 Manutenção e cultivo do inóculo

4.2.1 Manutenção da cepa no banco de culturas

A microalga clorofícea *Desmodesmus subspicatus* foi mantida em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio BGN (Tabela 4.1), tampados com rolhas feitas de algodão e gaze, sendo repicada a cada 30 dias a fim de manter sua viabilidade. Os tubos foram mantidos em incubadora TECNAL® TE-402 a 25°C com fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro) e fluxo luminoso de aproximadamente 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Para a manutenção da cepa no banco de culturas, cada repicagem era feita a partir do tubo com maior concentração celular e em triplicata a fim de prevenir a perda por possíveis contaminações de um dos tubos.

4.2.2 Propagação do inóculo

Para cada experimento, um tubo contendo a microalga *D. subspicatus* foi replicado a partir de um dos três tubos contidos no banco de cultura e a propagação se deu pela transferência de seu conteúdo para um frasco Erlenmeyer contendo 500 mL de meio BGN, sendo mantido sob aeração e fotoperíodo de 12 horas até a obtenção de concentração próxima a 1,0 g.L^{-1} . O conteúdo do Erlenmeyer foi vertido no vaso do biorreator de bancada (descrito em 4.3.1) previamente esterilizado, e o volume do vaso completado para 3,0 L com meio BGN esterilizado.

4.3 Cultivo de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça

4.3.1 Biorreator de bancada

O equipamento utilizado para condução dos cultivos de *D. subspicatus* em vinhaça foi um Biorreator A&Z[®] composto por um vaso de vidro borossilicato encamisado com 3,0 L de capacidade útil, um controlador eletrônico com 5 bombas peristálticas para alimentação e dreno do vaso e adição de ácido, base e anti-espumante, um sensor de pH, termômetro, sensor de oxigênio dissolvido (O.D.) e sensor de gás carbônico dissolvido (CO₂), agitador mecânico por pás, aeração por compressor interno e iluminação por LED controlados através do computador por um software específico do fabricante, com a temperatura sendo controlada diretamente no painel do banho-maria com circulação e resfriamento acoplado à camisa do vaso de cultivo.

A figura 4.1 apresenta o reator descrito acima já inoculado com *D. subspicatus*.



Figura 4.1: Biorreator de bancada A&Z

4.3.2 Ensaio preliminares – Seleção das condições de cultivo e tempos de batelada

Após ser propagado, tendo o inóculo e seu conteúdo vertido no biorreator como descrito em 4.2.2, o cultivo de *D. subspicatus* foi conduzido próximo a pH 7,5 sem controle durante o cultivo, sendo o mesmo conduzido a temperatura de 25°C, agitação de 3,0 xg (força centrífuga relativa) e aeração de 1,0 VVM (volume de ar por volume de meio por minuto) até a obtenção de concentração de biomassa de aproximadamente 1,0 g.L⁻¹.

Atingida tal concentração, o meio de cultivo com biomassa foi sifonado e a biomassa separada por centrifugação em frascos de 600 mL em centrífuga Solab[®] SL-701 a 1260 xg.

O centrifugado de biomassa úmida foi ressuspensão em vinhaça e procederam-se os experimentos de estresse com diferentes qualidades de vinhaça (sem tratamento e após 4 tipos de tratamento), condições de temperatura e tempos de batelada, havendo monitoramento de biomassa, DQO, nitrogênio e fósforo na vinhaça.

A figura 4.2 apresenta um diagrama de como foram conduzidos o cultivo autotrófico e a indução de estresse em *Desmodesmus subspicatus* no biorreator de bancada utilizando vinhaça.

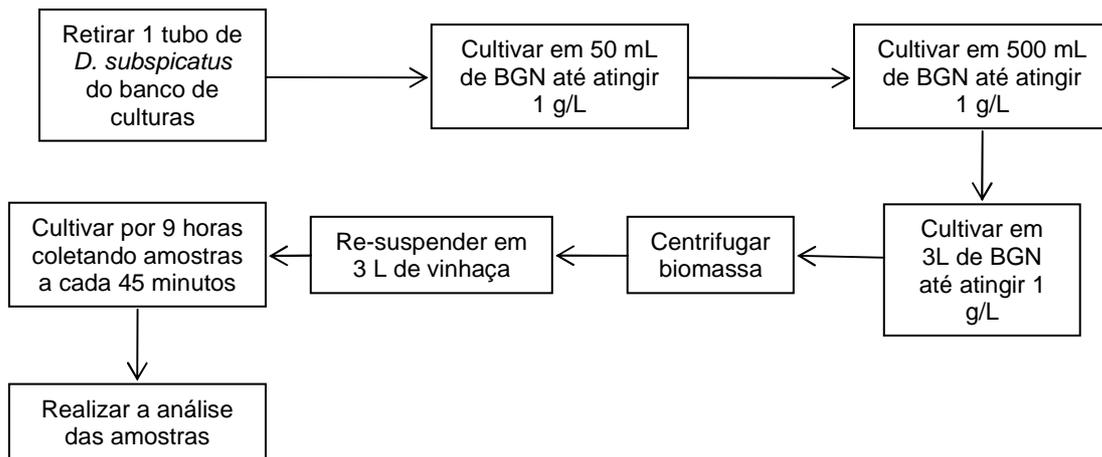


Figura 4.2: Diagrama esquemático do cultivo de *Desmosdemus subspicatus* em vinhaça

As curvas de crescimento da biomassa foram realizadas através do acompanhamento da massa celular seca (descrito em 4.4.1) e do número de células por contagem direta em Câmara de Neubauer (descrito em 4.4.2). O acompanhamento da contaminação por heterotróficos totais foi realizado utilizando placas Petrifilm 3M[®] (descrito em 4.4.3). As velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) foram calculadas através da inclinação da curva semi-logarítmica “biomassa *versus* tempo”, conforme descrito no item 4.5.1. O rendimento de substratos em biomassa foi calculado pela inclinação das curvas “substrato *versus* biomassa” (item 4.5.2), enquanto que a produtividade em biomassa e em termos dos seus constituintes foi obtida pela variação do parâmetro considerado no tempo (item 4.5.3).

4.3.3 Pré-tratamento da vinhaça

A vinhaça coletada em galões de 80 litros em uma indústria de açúcar e álcool da região de Araras foi conduzida ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC) do DTAISER/CCA/UFSCAR onde foi fracionada em garrafas PET de 2 litros e congelada a -20°C até a sua utilização nos experimentos.

Os experimentos relativos ao pré-tratamento de vinhaça compararam quatro floculantes diferentes e a adição de ácido fosfórico na remoção de DQO, nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) da vinhaça, com a observação de duas etapas de floculação: uma com a elevação até próximo de pH 12 e outra durante a neutralização com ácido fosfórico, como será apresentado nos resultados e discussão em 5.2.

Para o tratamento com cal, uma suspensão de Ca(OH)_2 com concentração de 500 g.L^{-1} foi preparada e 40 mL da mesma foram adicionados para cada 1,0 L de amostra de vinhaça. A mistura foi agitada em “Jar-test” por 5 minutos a 1,5 xg e deixada decantar por 10 minutos.

Em outro ensaio, uma solução de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ a 100 g.L^{-1} foi preparada e dela foram aplicados 1,0 mL para cada 1,0 L de amostra de vinhaça. Em seguida o pH foi elevado até próximo de 12, quando se iniciou a formação de flocos. A mistura foi agitada em “Jar-test” por 5 minutos a 1,5 xg e deixada decantar por 10 minutos.

Os polímeros catiônicos Clariflot® SQ20 e SQ30 foram testados em concentrações de 50, 100 (concentração indicada pelo fabricante), 300, 500 e 1000 mg.L^{-1} sem qualquer indício de eficiência na faixa de pH 3,5 até 12 para a floculação dos colóides da vinhaça.

A ineficiência dos polímeros catiônicos testados em clarificar a vinhaça fez com que apenas os resultados obtidos com Ca(OH)_2 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ fossem apresentados nos resultados e discussão.

Com a finalidade de preparar a água residuária para os cultivos de microalgas, o sobrenadante foi sifonado para a separação do decantado. A neutralização do pH do sobrenadante foi realizada com ácido fosfórico p.a. inicialmente até o pH 11, quando uma intensa coagulação foi observada, e uma centrifugação foi conduzida a 1260 xg por 3 minutos para a separação do floculado, após a qual separou-se o centrifugado e ajustou-se o pH até 7,0 com o mesmo ácido.

A determinação da velocidade de sedimentação foi realizada com o auxílio de régua e cronômetro, observando o tempo necessário para a

decantação do floculado em relação ao caminho percorrido pelo decantado na coluna ao final do período.

4.4 Análises

4.4.1 Massa celular seca

A massa seca foi obtida por filtração a vácuo em frasco Kitasato e aparato de filtração de 5,0 mL de suspensão algácea, utilizando filtros de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm previamente secos e pesados. Após a filtração, os filtros foram secos por uma hora em estufa a 105°C, então colocados em dessecador para esfriar e posteriormente foram pesados. A massa seca foi obtida pela diferença entre a massa da membrana limpa e após a filtração, secagem e resfriamento.

Um branco para esta análise foi realizado com a vinhaça de cada experimento para anular a interferência de possíveis sólidos suspensos neste material.

4.4.2 Contagem celular em câmara de Neubauer

Para a realização de contagem celular em câmara de Neubauer, adicionou-se 1 gota da amostra previamente homogeneizada sobre a superfície quadriculada e cobriu-se com uma lamínula esperando aproximadamente 3 minutos até que as células sedimentasse sobre a superfície de contagem.

Com a ajuda em um microscópio, no aumento de 80x, realizou-se a contagem de células e a média dos valores de contagem dos cinco quadrantes multiplicada por 10^5 é a concentração celular por mL de amostra.

4.4.3 Contagem de heterotróficos totais

O monitoramento da contaminação durante os cultivos em vinhaça foi realizado utilizando-se placas Petrifilm 3M[®] inoculadas com 1,0 mL de amostra em câmara de fluxo laminar Pachane PCR T2.5 Vertical, previamente sanitizada e irradiada com luz UV, e incubadas por 24 horas a 36°C em uma estufa de cultivo Tecnal[®] TE-392/1.

A contagem de heterotróficos totais foi feita pela contagem de todas as colônias formadas na placa após o período de incubação, multiplicada pelo fator de diluição, quando necessário, sendo o resultado dessas análises expresso em Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

4.4.4 Umidade

O teor de água foi medido na biomassa decantada ao final dos experimentos pesando-se aproximadamente 10 g de material úmido em vidro de relógio seco a 105°C por 24 horas em estufa de secagem, devidamente identificado e com sua massa anotada, e deixando secar em estufa de secagem a 105°C por 24 horas. Após a retirada do material da estufa, o mesmo foi colocado para resfriar em dessecador com sílica gel, pesando posteriormente em balança analítica Metler Toledo AE160. A umidade foi calculada a partir da porcentagem de massa perdida após a secagem (AOAC, 1995).

4.4.5 Sólidos totais na vinhaça

Alíquota de 10 mL de cada amostra foi pesada em vidro de relógio seco a 105°C por 24 horas em estufa de secagem, devidamente identificado e com sua massa anotada. Após a retirada do material da estufa, o mesmo foi

colocado para resfriar em dessecador com sílica gel, pesando posteriormente em balança analítica Metler Toledo AE160. A quantidade de sólidos totais foi encontrada pela diferença entre a massa úmida e a massa seca (AOAC, 1995).

4.4.6 Demanda química de oxigênio (DQO)

A quantificação de DQO foi realizada pelo método descrito pela APHA (2005) que utiliza uma solução ácida de cromo e aquecimento a 150°C por 120 minutos em bloco aquecedor para a digestão das amostras e quantificação colorimétrica, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm, da coloração formada pela oxidação do cromo em contato com a matéria orgânica presente na amostra.

A solução digestora foi preparada adicionando-se 10,216 g de dicromato de potássio a 500 mL de água destilada, a esta solução foram adicionados 167 mL de ácido sulfúrico p.a. e finalmente completou-se o volume com água destilada para um litro.

A padronização da solução foi feita titulando-se soluções de hidrogenoftalato de potássio em gradiente de concentração, que foram preparadas a partir da diluição seqüencial de uma solução-mãe de concentração 425 mg.L⁻¹ e DQO teórica de 500 mg.L⁻¹.

Para a realização da curva padrão, as amostras padrão foram submetidas à digestão sob aquecimento como descrito anteriormente e analisadas em espectrofotômetro quanto a sua absorbância em comprimento de onda específico.

Os dados de DQO teórica e absorbância foram então inseridos em um gráfico, sendo a equação da reta obtida deste gráfico utilizada como fórmula para a conversão de valores de absorbância em DQO das amostras analisadas.

A figura 4.3 apresenta um diagrama com cada etapa da análise de DQO descrita acima. É necessário o preparo de um “branco” para a realização desta

análise, que segue o mesmo procedimento esquematizado abaixo, porém, utilizando água desmineralizada no lugar da amostra.

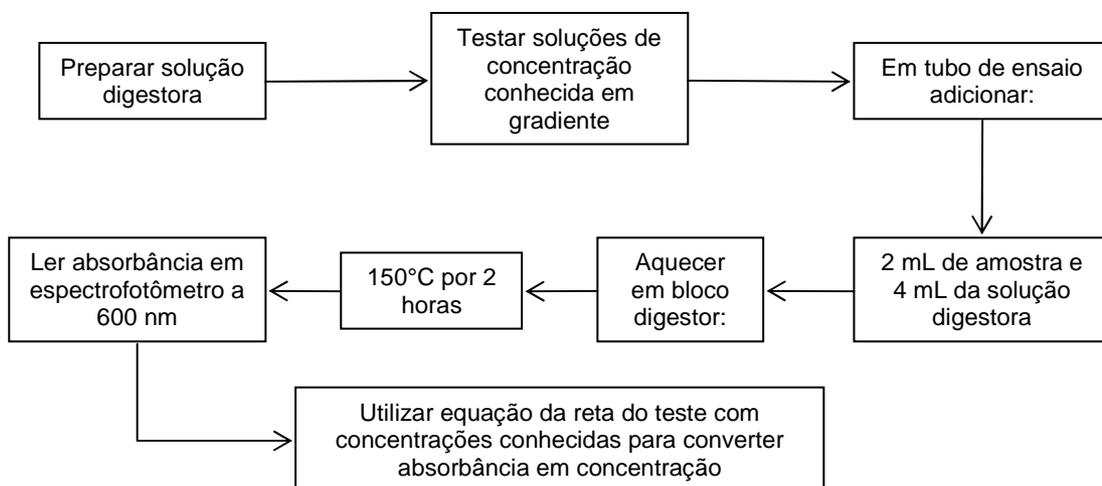


Figura 4.3: Diagrama de análise da DQO

4.4.7 Carbono orgânico total (TOC)

O carbono orgânico total das amostras foi determinado em analisador TOC - LCPN SHIMADZU®. A análise fundamenta-se na oxidação do material orgânico da amostra a 720°C em presença de atmosfera oxidante (ar sintético) catalisada por alumina e platina, transformando o material em CO₂ e uma mistura de gases incluindo aqueles compostos de nitrogênio.

A quantificação de TOC é feita por um analisador de gases em infravermelho (NDIR) com limite de detecção de 4,0 µg.L⁻¹ presente no próprio equipamento que detecta a absorbância do CO₂ a um comprimento de onda específico no espectro infra-vermelho.

4.4.8 Nitrogênio total (NT)

A quantificação foi feita utilizando-se kit HACH® para determinação de nitrogênio total utilizando-se o método 10071 do manual fornecido pelo próprio fabricante do kit.

O método, descrito pela APHA (2005), fundamenta-se na transformação do nitrogênio da amostra em nitrato através de uma digestão alcalina com adição de persulfato, e na formação de cor pela reação do nitrato com um ácido cromotrópico em meio fortemente ácido.

A figura 4.4 apresenta um diagrama com cada etapa da análise utilizando o kit supracitado. É necessário o preparo de um “branco” para a realização desta análise, que segue o mesmo procedimento esquematizado, porém, utilizando água desmineralizada no lugar da amostra.

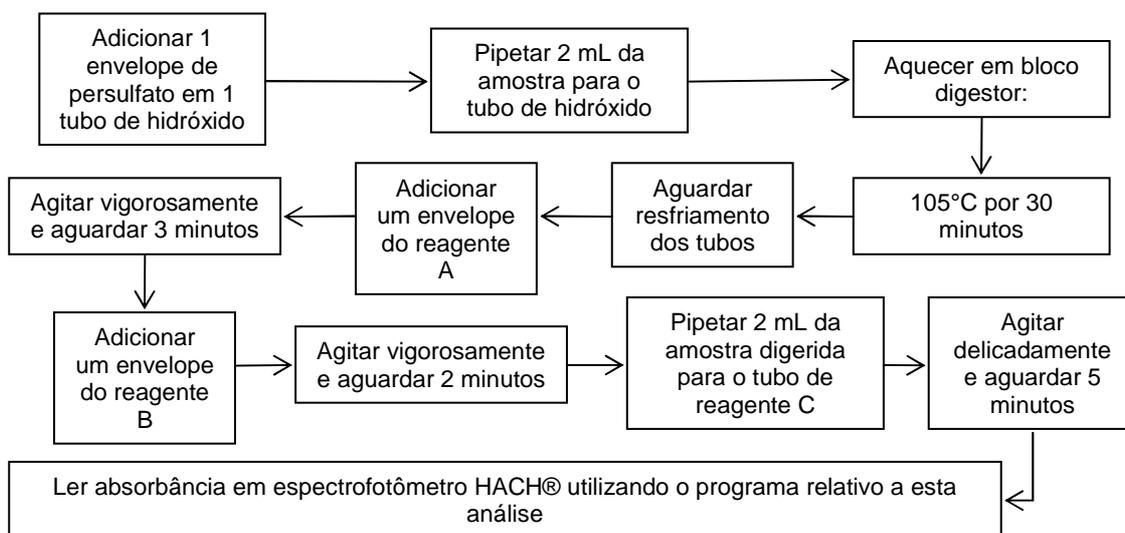


Figura 4.4: Diagrama esquemático da determinação de nitrogênio total usando kit HACH® (os envelopes aqui citados acompanham o kit)

Também para a quantificação de NT foi utilizado analisador TOC - LCPN SHIMADZU®, cujo princípio de análise se encontra no tópico 4.4.7.

A diferença para a quantificação de NT, entretanto, é o princípio de detecção, enquanto a análise de TOC se fundamenta na absorção do CO₂ a um comprimento de onda específico no espectro infra-vermelho, a quantificação de NT se fundamenta na emissão de um comprimento de onda específico após a ozonização dos gases compostos de nitrogênio e na quantificação dessa emissão.

4.4.9 Fósforo Total (PT)

Fósforo total foi quantificado por colorimetria utilizando-se um kit reagente Bioclin[®] seguindo-se o procedimento descrito na bula fornecida pelo fabricante.

O método, descrito pela APHA (2005), se fundamenta na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio formando fosfomolibdato de amônio, que posteriormente é reduzido a azul de molibdênio, cuja intensidade de cor desenvolvida é proporcional à concentração de fósforo presente na amostra.

Por não haver realizado a hidrólise do material analisado, a concentração de fósforo quantificada é do fósforo inorgânico dissolvido e, dessa forma, mais prontamente disponível para o consumo microbiano.

A figura 4.5 apresenta um diagrama com cada etapa da análise utilizando o kit supracitado. É necessário o preparo de um “branco” para a realização desta análise, que segue o mesmo procedimento esquematizado abaixo, porém, utilizando água desmineralizada no lugar da amostra.

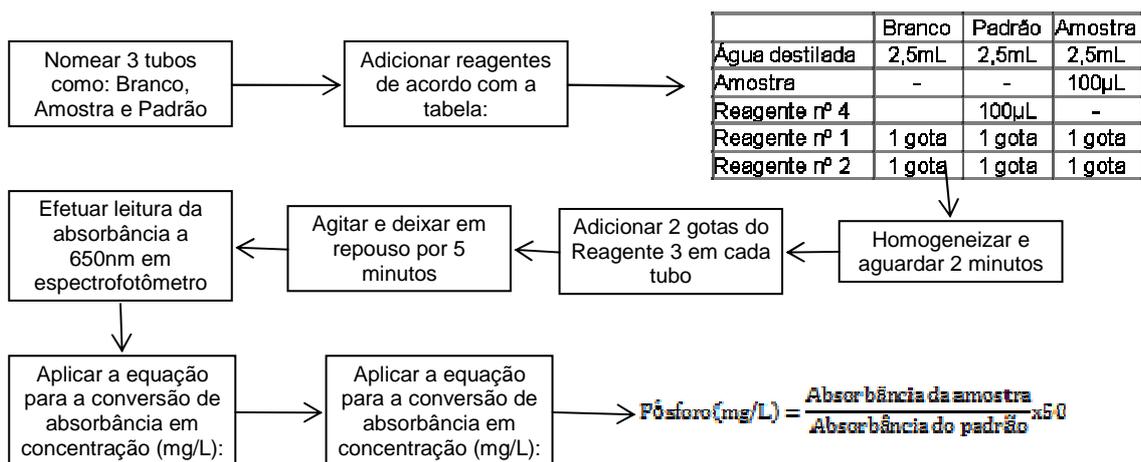


Figura 4.5: Diagrama esquemático da determinação de fósforo total utilizando o kit Bioclin®

4.4.10 Composição da biomassa

O teor lipídico foi medido sempre ao final da fase de estresse em vinhaça, utilizando a biomassa centrifugada.

Separou-se aproximadamente 1,0 g da biomassa centrifugada para a avaliação do teor de água como descrito em 4.4.4, para se conhecer a massa inicial a ser extraída. Foi pesado então o equivalente a 1,0 g de massa seca do material úmido centrifugado e a ele foram adicionados clorofórmio e metanol em proporção à quantidade de água presente na amostra, seguindo a proporção proposta por Bligh e Dyer (1959) de 1,0: 2,0: 0,8 (clorofórmio:metanol:água).

Em um tubo Falcon® de 50 mL, o material sob extração foi deixado em contato com o solvente por 12 horas e, em seguida, colocado em banho de ultra-som por 20 minutos a fim de romper as células, aumentando a eficiência de extração.

Após tratamento em banho ultrassom, o material foi distribuído em tubos de centrífuga e centrifugado a 1260 g, separando o líquido sobrenadante e repetindo mais duas vezes a extração sem sonicação com o centrifugado.

Ao sobrenadante reunido das três centrifugações foi adicionado clorofórmio suficiente para a separação de fases, sendo a fase orgânica recuperada e evaporada em capela, e a fase aquosa descartada.

O material seco após a evaporação do clorofórmio foi pesado e tido como a fração lipídica da biomassa analisada.

O teor de proteínas foi obtido pela multiplicação do resultado da análise de nitrogênio total da biomassa (como descrito em 4.4.7 e ilustrado na figura 4.4), pelo fator 6,25, obtendo com isso a quantidade de proteína por massa seca.

A figura 4.6 apresenta um diagrama da extração lipídica pelo método proposto por Bligh e Dyer (1959).

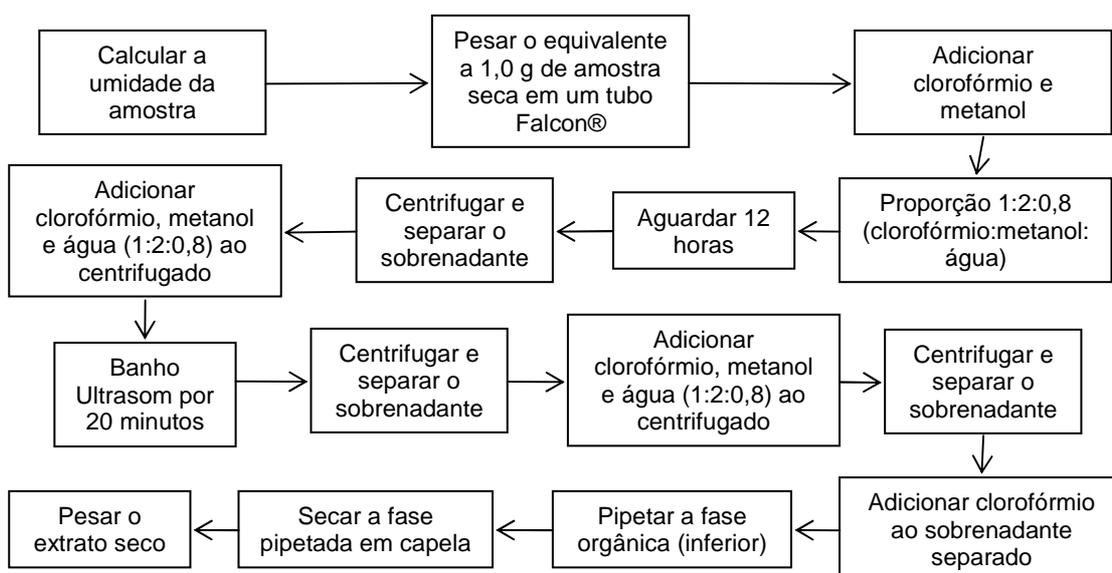


Figura 4.6: Diagrama esquemático da determinação de lipídios totais na biomassa, conforme adaptado de Bligh e Dyer (1959)

4.5 Parâmetros Cinéticos

4.5.1. Velocidade específica de crescimento

As velocidades específicas de crescimento foram determinadas através da Equação 4.1, sendo que o valor máximo ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtido pela inclinação da curva de crescimento semi-logarítima.

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

Onde:

μ : Velocidade específica de crescimento (h^{-1})

X: Concentração de biomassa (mg.L^{-1})

t: Tempo de cultivo (h)

4.5.2. Rendimento de substrato em biomassa

Para o cálculo de rendimento de substrato ($Y_{X/S}$) em biomassa foram utilizados os dados de biomassa obtidos pelo método descrito em 4.4.1 e os dados de DQO, NT e PT, descritos em 4.4.6, 4.4.7 e 4.4.8, respectivamente, e sua consequente variação no decorrer do tempo, de acordo com a Equação 4.2:

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (\text{Equação 4.2})$$

Onde:

$Y_{X/S}$: Rendimento de substrato em biomassa (mg.mg^{-1})

X: Concentração de biomassa (mg.L^{-1})

S: Concentração do substrato (mg.L^{-1})

4.5.3. Produtividade de biomassa

A produtividade de biomassa (P_X) foi calculada utilizando os dados de biomassa obtidos pelo método descrito em 4.4.1 e sua conseqüente variação no decorrer do tempo, de acordo com Equação 4.3:

$$P_X = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{t_{processo}} \quad (\text{Equação 4.3})$$

Onde:

P_X : Produtividade de biomassa ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$X_{m\acute{a}x}$: Concentração de biomassa máxima (mg.L^{-1})

X_0 : Concentração de biomassa inicial (mg.L^{-1})

$t_{processo}$: Tempo de processo (h)

4.5.4. Velocidade de consumo do substrato

A Velocidade média de consumo dos substratos (C_s) foi calculada utilizando os dados de concentração obtidos pelos métodos descritos em 4.4.6, 4.4.7, 4.4.8 e 4.4.9 e sua conseqüente variação no decorrer do tempo, de acordo com Equação 4.4:

$$r = \frac{S_0 - S}{t_{processo}} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde:

r : Velocidade de consumo do substrato ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

S_0 : Concentração inicial do substrato (mg.L^{-1})

S : Concentração final do substrato (mg.L^{-1})

$t_{processo}$: Tempo de processo (h)

4.5.5. Coeficiente global de transferência gás-líquido

O coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (K_La) foi obtido pelo método dinâmico, considerando reoxigenação do meio e concentração de oxigênio no regime permanente (C_{AL}), conforme Equação 4.5.

$$K_La = \frac{\ln \frac{(C_{AL} - C_{A1})}{(C_{AL} - C_{A2})}}{(t_2 - t_1)} \quad (\text{Equação 4.5})$$

Onde:

K_La : Coeficiente de transferência gás-líquido (s^{-1})

C_{AL} : Concentração de O_2 dissolvido em regime permanente ($mg.L^{-1}$)

C_{A1} : Concentração de O_2 dissolvido no tempo 1 ($mg.L^{-1}$)

C_{A2} : Concentração de O_2 dissolvido no tempo 2 ($mg.L^{-1}$)

t_1 : Tempo 1 (s^{-1})

t_2 : Tempo 2 (s^{-1})

4.6. Análise estatística

Para a análise dos dados obtidos nos ensaios de floculação, análise de variância e teste t foram realizados com a finalidade de verificar a diferença estatística entre cada ponto de amostragem (em triplicatas) utilizando o software livre para pesquisa Instat® na versão 3.36 e suas funções.

4.7. Ensaio exploratório para a determinação das condições de floculação da vinhaça

A vinhaça coletada em uma indústria sucroalcooleira da região de Araras, diretamente das colunas de destilação, a aproximadamente 95°C, foi levada ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC) do DTAiSER/CCA/UFSCar onde foi acondicionada para os experimentos.

Os ensaios preliminares de floculação-coagulação-decantação de vinhaça foram conduzidos empregando doses crescentes de $Al_2(SO_4)_3$ ou $Ca(OH)_2$ isoladamente em alíquotas de 1,0 L de amostra de vinhaça, alcalinizando o meio para a indução da floculação com NaOH quando necessário, até que fosse observado o fenômeno da floculação.

Testes com polímeros catiônicos Clariflot[®] SQ 20 e SQ 30 também foram conduzidos, aplicando as dosagens sugeridas pelo fabricante.

Após encontrada a faixa de pH onde ocorre a floculação com cada um dos floculantes empregados, ensaios foram conduzidos com o auxílio de um pHmetro Digimed DM-22 para encontrar o pH ótimo de floculação, elevando o pH de 0,1 em 0,1, partindo do pH onde primeiro se observou a floculação e recolhendo alíquotas de 50 mL a cada elevação de pH.

Encontrados a dose e o pH ótimos para a floculação com cada coagulante, experimentos foram conduzidos em “Jar-test” com o volume de 1,0 L em triplicatas, para a avaliação do tempo de sedimentação do floculado, empregando-se agitação inicial de 1,5 g por 5 minutos seguida por 0,4 xg por 10 minutos e então 0,1 xg por 5 minutos como feito por Gonçalves e Silva (2000), cessando a agitação e iniciando a contagem do tempo com o cronômetro a partir deste momento.

A eficiência na remoção de sólidos suspensos pelos coagulantes foi avaliada através das determinações de DQO, NT, PT e sólidos totais na vinhaça bruta, tratada e no material sedimentado. Além disso, a velocidade de sedimentação foi utilizada como critério para selecionar as condições de pH

ótimo para coagulação, sendo determinada utilizando-se régua e cronômetro para o cálculo da velocidade média de decantação após o cessar da agitação.

5 Resultados e discussão

5.1 Cultivos preliminares de *Desmodemus subspicatus* em biorreator de bancada com vinhaça bruta

5.1.1 Sistema de cultivo em batelada simples por 30 horas

Os ensaios preliminares foram realizados com amostras de vinhaça bruta submetidas apenas à centrifugação para se verificar inicialmente as velocidades de crescimento de *D. subspicatus* em cultivo heterotrófico com vinhaça bruta, de consumo de nutrientes e o tempo ideal de batelada com base nesses parâmetros, servindo também para verificar as possíveis limitações, dificuldades e parâmetros com maior necessidade de controle no cultivo heterotrófico de *D. subspicatus*.

A Figura 5.1 apresenta as curvas de crescimento em termos de biomassa de *D. subspicatus* em vinhaça bruta para ensaios com e sem controle de pH em biorreator de bancada.

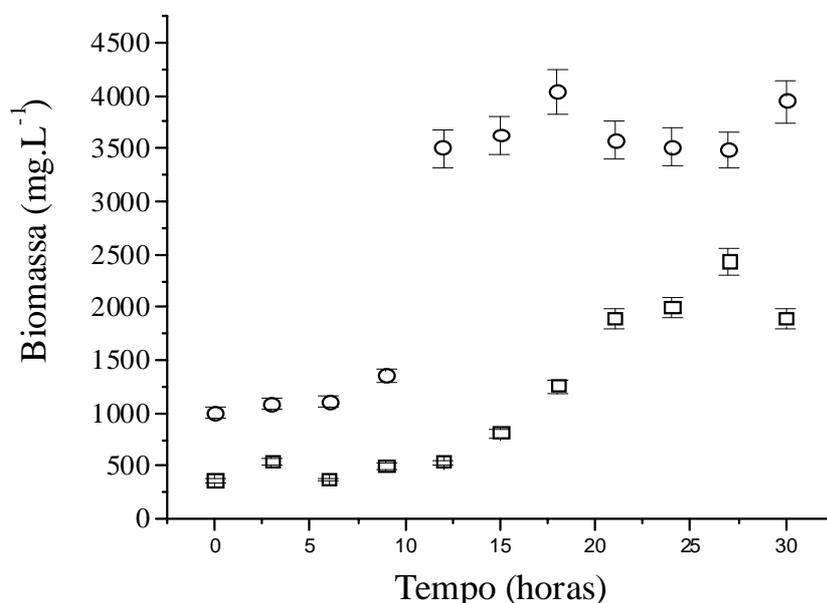


Figura 5.1: Curvas de crescimento de Biomassa em vinhaça bruta centrifugada em biorreator de bancada para ensaio com (○) e sem (□) controle de pH (barras de erros indicam o desvio padrão das triplicatas dos pontos)

De acordo com os dados, verifica-se que, apesar da concentração final apresentar um valor superior para o ensaio com controle de pH, as velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) foram similares para ambos os casos, ficando em torno de $0,09 \text{ h}^{-1}$, o que indica um tempo de geração de aproximadamente 7,7 horas. Esta similaridade entre as velocidades específicas de crescimento máximas aponta que a diferença final de concentrações foi devida apenas à diferença entre as concentrações iniciais de biomassa nos dois ensaios, ocasionada por uma dificuldade na obtenção de inóculo padronizado nestes ensaios preliminares. Entretanto, sabe-se que a avaliação da cinética de crescimento é mais importante do que a concentração final de biomassa obtida. Além disso, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ encontrados estão de acordo com as informações reportadas na literatura para este micro-organismo, em torno de $0,05 \text{ h}^{-1}$ conforme os dados obtidos por Matinez *et al.*(2000) em cultivos da microalga *Scenedesmus obliquus*. Sendo assim, foi desconsiderado o efeito do controle de pH como parâmetro de processo para a condução dos próximos ensaios.

Para verificar a qualidade da biomassa produzida, a contagem celular de *D. subspicatus* em câmara de Neubauer e de heterotróficos totais em Petrifilm[®] foram realizadas.

A Figura 5.2 apresenta os resultados das contagens de *D. subspicatus* durante a batelada simples de 30 horas com vinhaça bruta centrifugada sem ajuste de pH.

É possível verificar um crescimento celular nas primeiras 9 horas de cultivo e seu decréscimo a partir deste momento até as 15 horas, quando se estabiliza praticamente na concentração celular inicial. Cabe ressaltar que a contagem celular que inicia em torno de 8×10^7 células. mL^{-1} , o que é próximo a 10^8 células. mL^{-1} , não havendo portanto um aumento de um ciclo logaritmo durante o cultivo, conforme já havia sido evidenciando na Figura 5.1. A discussão destas curvas é dificultada pela ausência de dados na literatura sobre a contagem de células de microalgas durante os cultivos.

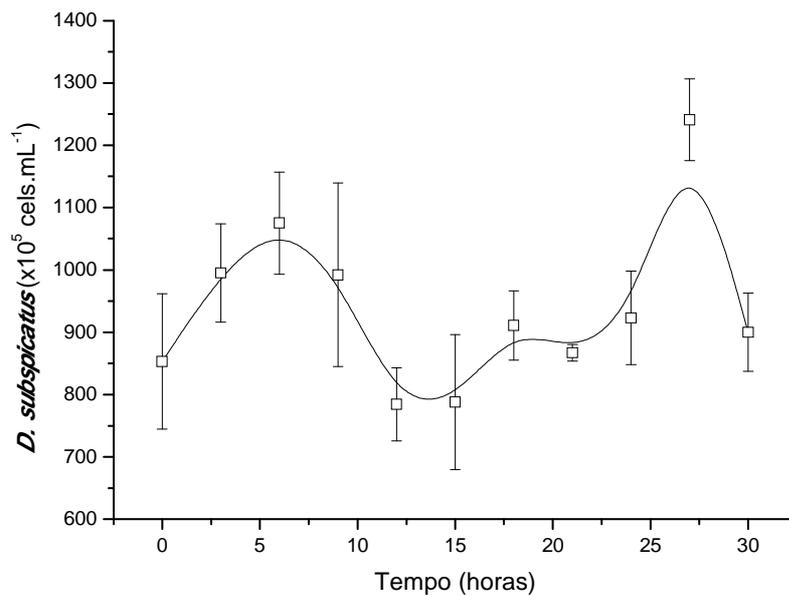


Figura 5.2: Contagem celular de *D. subspicatus* em batelada simples de 30 horas em vinhaça centrifugada sem controle de pH (barras de erros indicam o desvio padrão das triplicatas dos pontos)

O monitoramento e o controle da contaminação nos cultivos visando a produção de biomassa de microalgas é outro aspecto que carece de estudos na literatura. A Figura 5.3 apresenta os resultados de contagem de heterotróficos totais no ensaio de batelada simples com vinhaça centrifugada sem ajuste de pH e mostra um desenvolvimento exponencial dos contaminantes neste ensaio a partir de 10 horas de cultivo.

A alta contaminação da biomassa produzida por bactérias mostra uma fragilidade dos cultivos heterotróficos de microalgas e a baixa confiabilidade na quantificação de biomassa por gravimetria quando a composição da biomassa é relevante, dessa forma a contagem específica do micro-organismo em estudo e dos contaminantes torna-se fundamental para a qualificação dos resultados obtidos.

Apesar da contaminação bacteriana ser citada amplamente na literatura como uma das grandes desvantagens do cultivo heterotrófico de

microalgas (Perez-Garcia *et al.*, 2011), os trabalhos não costumam quantificar este efeito no cultivo e na biomassa produzida.

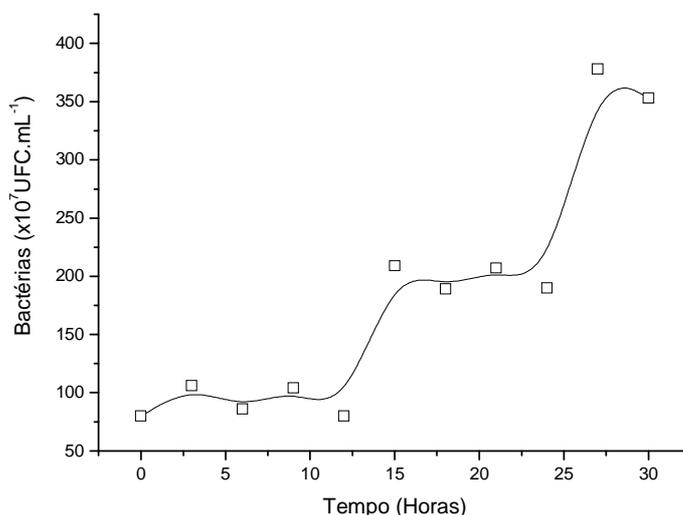


Figura 5.3: Contagem de bactérias heterotróficas em batelada simples de 30 horas em vinhaça centrifugada sem controle de pH.

Neste contexto, a Figura 5.4 apresenta as curvas de demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio total (NT) na vinhaça durante o ensaio em reator de bancada sem o controle de pH.

De acordo com as curvas, verificaram-se remoções de DQO e NT em torno de 40 e 50%, respectivamente, nas 30 horas de ensaio. Apesar destes resultados indicarem um representativo consumo de matéria orgânica e nutrientes, esta eficiência não seria suficiente para adequar a vinhaça do ponto de vista ambiental de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, que estabelece as condições padrão de lançamento de efluentes a valores máximos de 10 mg.L⁻¹ para DBO e 20 mg.L⁻¹ para o nitrogênio amoniacal total, dependendo da classe do corpo receptor.

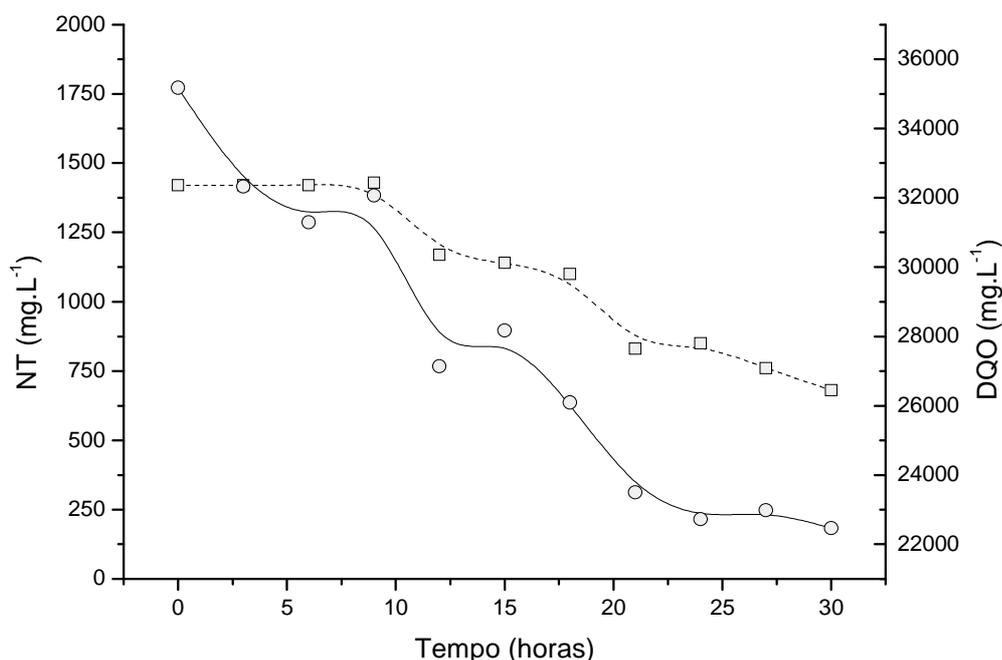


Figura 5.4: Curvas de DQO (○) e NT (□) da vinhaça bruta centrifugada durante o cultivo de *Desmodesmus subspicatus* sem controle de pH

Entretanto, pode-se considerar viável o cultivo de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça e o uso de microalgas como uma das etapas de tratamento desta água residuária do setor sucroenergético. Além disso, se considerarmos o aproveitamento deste subproduto para a geração de biomassa com valor comercial, é importante salientar o elevado rendimento médio de DQO em biomassa ($Y_{X/S}$) calculado a partir dos dados apresentados nas figuras 5.1 e 5.4. O valor médio em torno de $0,55 \text{ mg}_{\text{Biomassa}} \cdot \text{mg}_{\text{DQO}}^{-1}$ obtido para o período indica uma alta conversão da matéria orgânica disponível em biomassa, maior que aquela descrita por Bastos *et al.* (2010) para a cianobactéria *Aphanothece microscopica* em efluente da parboilização do arroz de $0,17 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$, mas compatível com o rendimento de $0,58 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ apresentado por Leesing *et al.* (2013) para uma linhagem de *Chlorella sp.* cultivada em meio sintético suplementado com $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose.

Analisando ainda a Figura 5.4, pode-se notar um alto consumo do substrato até 20 horas de cultivo, quando essa velocidade desacelera e ocorre

pouca variação nas concentrações tanto de DQO quanto de NT. Este comportamento sugere o consumo mais intenso dos substratos prontamente disponíveis durante as primeiras 20 horas, restando após essa fase os elementos mais recalcitrantes e de complicada assimilação biológica. Por tratar-se de uma água residuária da destilação alcoólica, a vinhaça é composta basicamente por moléculas orgânicas de alta massa molar e sais, sendo, por este motivo, de assimilação complicada de parte da matéria orgânica nela presente.

O monitoramento da concentração de oxigênio e CO₂ dissolvidos no meio de cultivo para o ensaio sem controle de pH podem ser visualizados na Figura 5.5.

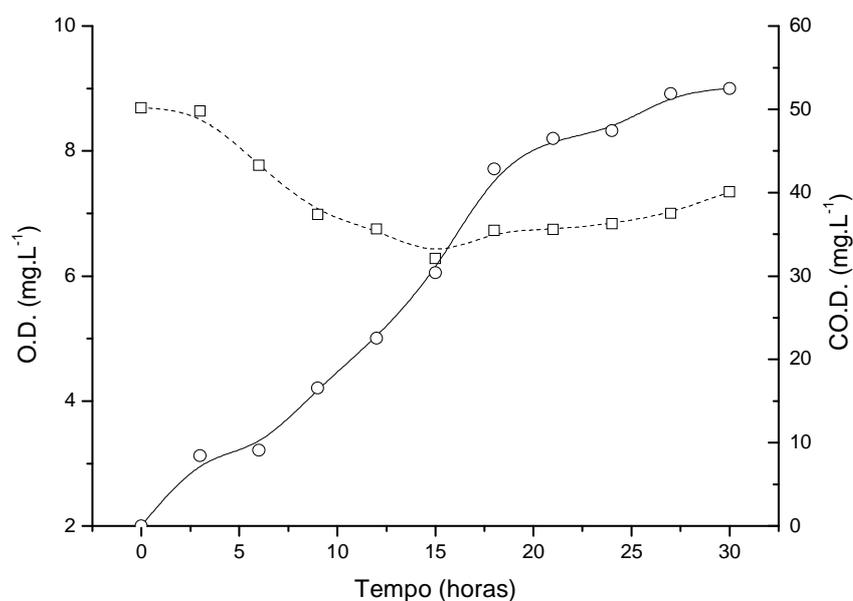


Figura 5.5: Concentração de oxigênio (□) e gás carbônico(○) na vinhaça bruta centrifugada durante o cultivo de *Desmodium subspicatus* sem controle de pH

Durante o período verifica-se uma queda na concentração de O₂ e aumento de CO₂ dissolvidos entre 10 e 20 horas, durante a fase de crescimento exponencial dos micro-organismos e período de consumo mais intenso de substratos.

Após 20 horas foi possível notar uma diminuição na produção de CO₂ e um gradativo aumento no O₂ dissolvido no meio, o que demonstra uma diminuição no consumo de matéria orgânica pelos micro-organismos presentes no meio. Esse fato corrobora com a hipótese de que após 20 horas o substrato presente no meio é de complicada assimilação biológica e por esse motivo estagna-se o consumo de nutrientes e conseqüentemente o crescimento biológico.

Cabe ressaltar a baixa demanda de oxigênio, mantendo o teor em torno de 80% da saturação com ar. Muitas espécies de microalgas e cianobactérias apresentam metabolismo heterotrófico em cultivos na ausência de luminosidade e com disponibilidade de moléculas orgânicas solúveis, tais como açúcares, ácidos orgânicos e acetato (Fay, 1983; Fay, 1992). No entanto, são raros os trabalhos na literatura que mencionam a demanda de oxigênio para estabilização dos substratos orgânicos, mesmo que estes aspectos sejam fundamentais para a aplicação destes micro-organismos no tratamento biológico de efluentes agroindustriais (Oren & Shilo, 1979; Bastos *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2007).

A transferência de oxigênio para as células é um dos fenômenos mais importantes na manutenção do crescimento dos micro-organismos. Assim, o coeficiente global de transferência de massa gás-líquido (K_La) é a variável mais importante a ser considerada nestes processos.

Em meio líquido, a transferência de oxigênio depende da forma e de tamanho do biorreator e do sistema de agitação e aeração (Durand, 2003). Nestes casos, o K_La tem sido bem definido para avaliar o transporte de massa, sendo usado para expressar a capacidade do equipamento de transferir oxigênio independentemente do volume do reator.

Apesar de algumas correlações serem utilizadas para prever K_La em cultivos microbianos (Montes *et al.*, 1999; Galaction *et al.*, 2004), a determinação experimental pelo método dinâmico é a mais utilizada em escala de laboratório para reatores de mistura (Doran, 1995), e apesar de ser uma ferramenta fundamental no estudo do escalonamento de processos aeróbios, é

difícil encontrar na literatura trabalhos que estimem K_{La} em cultivo de cianobactérias (Bastos e Queiroz, 2008).

Neste sentido, a Figura 5.6 apresenta a curva de determinação de K_{La} pelo método dinâmico, sendo obtido um valor em torno de $0,0012\text{ s}^{-1}$ para o biorreator de bancada utilizado. Este valor encontra-se na mesma ordem de grandeza dos obtidos em biorreatores de mistura para bactérias, leveduras e fungos com baixa relação aeração/volume (Montes *et al.*, 1999; Galaction *et al.*, 2004).

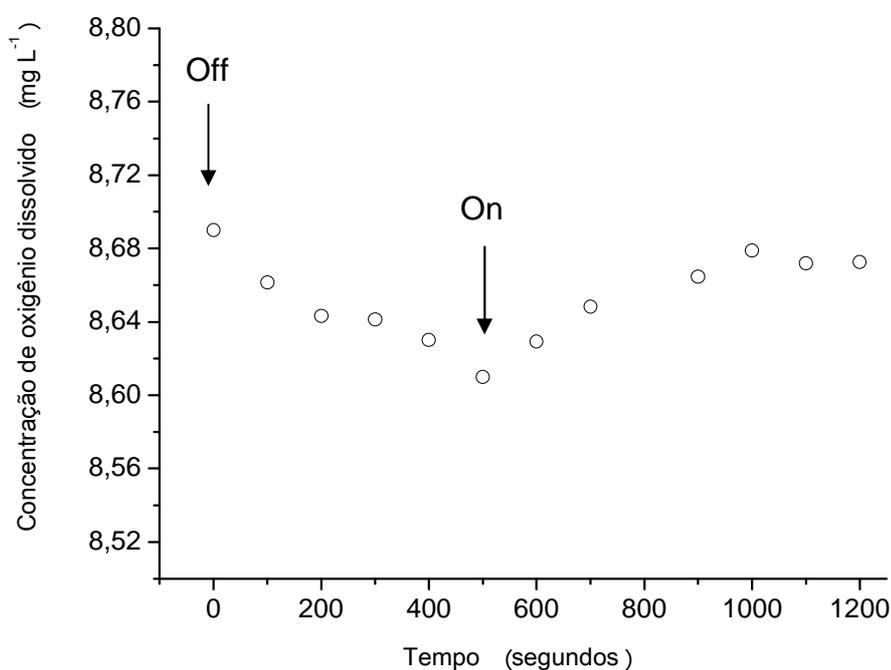


Figura 5.6: Curva de determinação de K_{La} no biorreator de bancada com vinhaça a 25°C . As setas indicam o corte (esquerda) e a realimentação (direita) de ar a vazão de 1 VVM

Apesar disto, cabe ressaltar, conforme apresentado na Figura 5.5, que as exigências de oxigênio para as microalgas heterotróficas são bem inferiores às reportadas para bactérias e fungos, o que sugere viabilidade de cultivo e condições não limitantes de oxigênio para crescimento destes microorganismos. Estes dados indicam exigências simples de aeração e, assim

como a pouca influência do controle de pH, sugerem a viabilidade do escalonamento deste processo.

A análise da composição da biomassa recuperada de *Desmodesmus subspicatus* ao final destes ensaios preliminares em vinhaça centrifugada sem controle de pH apresentou teores de proteínas e lipídios em torno de 15,6% e 3,8%, respectivamente.

Considerando esses valores, verificam-se na Tabela 5.1 produtividades similares aos valores encontrados na literatura (Rodolfi et al., 2009; Chen et al., 2011).

Tabela 5.1: Produtividades em termos de biomassa, proteínas e lipídios para cultivo de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça bruta centrifugada sem controle de pH

Parâmetro	Valor (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
Produtividade em biomassa	1831
Produtividade protéica	291
Produtividade lipídica	69

Entretanto, é importante salientar que os referidos trabalhos reportam produtividades obtidas para cultivos realizados em meio padrão, ou seja, sem a limitação de nutrientes e em condições fotoautotróficas. Sendo assim, os resultados de produtividade obtidos para estes ensaios exploratórios foram promissores, uma vez que são oriundos de cultivos a partir de águas residuárias em sistema heterotrófico não convencional.

As produtividades protéica e lipídica obtidas deveram-se mais à alta concentração de biomassa atingida do que efetivamente ao seu percentual na composição da biomassa, uma vez que os teores de proteínas e lipídios foram apenas de 15,6 e 3,8%, respectivamente, como citado anteriormente.

Estes resultados sugerem um encaminhamento estratégico diferente do que tem sido adotado e citado na literatura para acúmulo de lipídios e produção

de biodiesel por microalgas, ou seja, a busca por micro-organismos que apresentem altos teores de lipídios na biomassa (Miao e Wu, 2006; Chisti, 2007), o que deixa claro que a produção de biomassa é tão importante quanto o acúmulo de lipídios para tornar viável a utilização de microalgas como fonte de matéria prima para a fabricação de biocombustíveis.

5.1.2 Sistema de cultivo em batelada simples com resfriamento

Independentemente da qualidade da biomassa produzida nos ensaios exploratórios do item 5.1.1, buscou-se o acúmulo de lipídios na biomassa induzido pelo *stress* em um ensaio com redução da temperatura de cultivo, conforme apresentado na Figura 5.7.

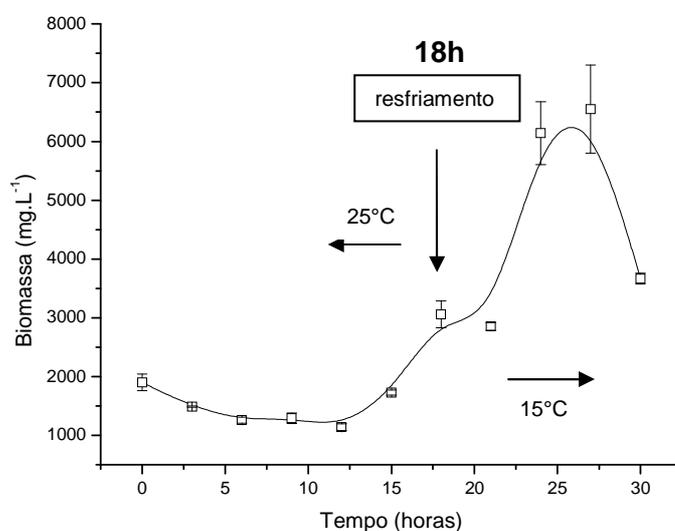


Figura 5.7: Curva de crescimento de biomassa em vinhaça bruta centrifugada para ensaio com resfriamento de 25 para 15°C

De acordo com o comportamento da curva, observou-se uma fase de adaptação prolongada de cerca de 12 horas, seguida de duas fases de crescimento até as 18 horas e após as 21 horas de cultivo em vinhaça. Na

primeira fase exponencial, os micro-organismos cresceram a uma velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de $0,14 \text{ h}^{-1}$ até 18 horas a 25°C . Caso permanecesse neste regime de crescimento a esta temperatura, o cultivo teria o potencial de atingir a concentração máxima de 9800 mg L^{-1} em 27 horas, de acordo com a equação 5.1, onde X_0 é a concentração inicial e X é a concentração de biomassa após transcorrido o tempo t .

$$X = X_0 e^{\mu_{\text{máx}} t} \quad (\text{Equação 5.1})$$

Entretanto, com a redução da temperatura para 15°C , houve uma discreta queda na $\mu_{\text{máx}}$ para $0,12 \text{ h}^{-1}$ em decorrência do resfriamento, levando a uma concentração máxima em 27 horas de 7700 mg L^{-1} .

Por outro lado, analisando as figuras 5.8 e 5.9 percebe-se que o fator mais relevante para a geração de biomassa neste ensaio não foi necessariamente a multiplicação celular de *D. subspicatus*, mas possivelmente o acúmulo de material intracelular pela biomassa e a multiplicação dos contaminantes heterotróficos.

Com uma fase de adaptação de cerca de 12 horas após o resfriamento e uma continuidade no desenvolvimento após esse período pode-se concluir que o resfriamento foi um fator menos crítico para os organismos contaminantes do que para *D. subspicatus*.

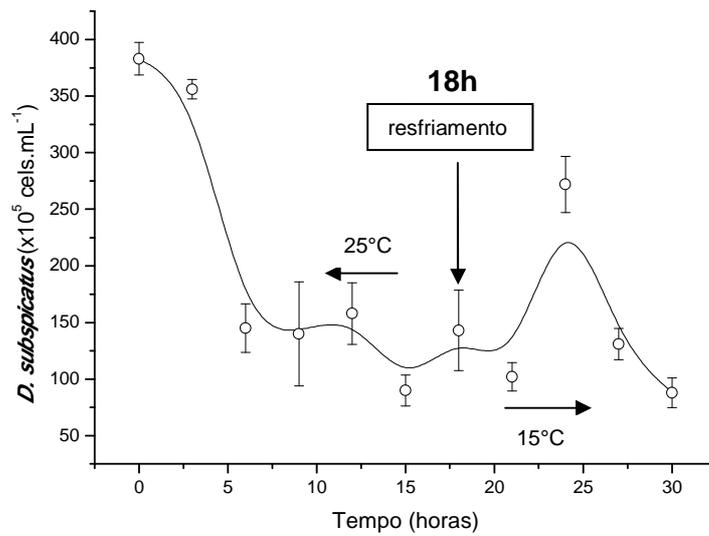


Figura 5.8: Contagem de *D. subspicatus* em vinhaça bruta centrifugada em ensaio de resfriamento

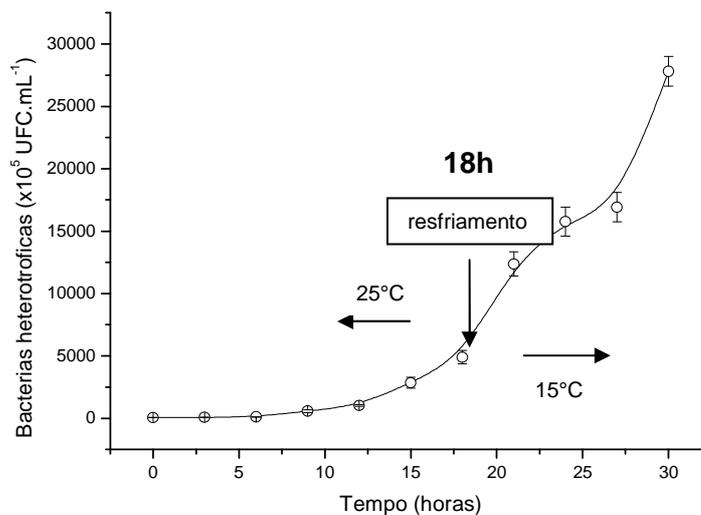


Figura 5.9: Contagem de heterotróficos totais em vinhaça bruta centrifugada em ensaio de resfriamento

De acordo com Xin et al (2011), os fatores que mais influenciam o acúmulo de lipídios na biomassa microalgal são luminosidade, CO₂, temperatura, adição de carbono orgânico exógeno e íons férricos. De todos os parâmetros mencionados, a temperatura é aquele que mais afeta o

crescimento microbiano e a atividade metabólica. Assim, os autores reportam teores de lipídios em *Scenedesmus* sp. superiores nos cultivos em temperaturas entre 10 e 20°C, na ordem de 30% (base seca). Mesmo assim, cabe ressaltar que estes autores realizaram ensaios em meio fotossintético avaliando a biomassa gerada por densidade ótica, obtendo perfis de crescimento muito similares para a faixa de temperatura entre 10 e 30°C, com contagens máximas em torno de 10^7 células por mL. Além disso, foram obtidas, por esses autores, velocidades específicas de crescimento máximas na faixa de 0,2 a 0,8 dia⁻¹, valores bem inferiores aos resultados cinéticos calculados a partir da Figura 5.7. Desta forma, o crescimento apontado pelos autores pode ter sido ocasionado por contaminantes, considerando um período de cultivo de 14 dias.

Conforme já mencionado, a composição química das microalgas é influenciada por diversas condições ambientais, tais como temperatura e luminosidade. Entretanto, a literatura ainda é controversa quanto ao efeito da temperatura no teor de lipídios, apesar da indicação de que o resfriamento leva a um aumento na relação entre ácidos graxos insaturados e saturados na biomassa microalgal (RENAUD *et al.*, 2002).

Em trabalho mais recente, Roleda *et al.* (2013) reportam exatamente a considerável correlação negativa entre o crescimento e o conteúdo de ácidos graxos nas microalgas. Os autores, estudando seis microalgas oleaginosas (*Thalassiosira pseudonana*, *Odontella aurita*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Chromulina ochromonoidese* *Dunaliella teretiolecta*), observaram que a resposta a condições de estresse leva a uma redução na insaturação de ácidos graxos com um aumento na taxa de produção de triglicerídeos.

Neste contexto, torna-se fundamental o estudo da fisiologia das microalgas para que se possa avançar na produção de biomassa em diferentes condições de temperatura e luminosidade. Quando se trata de um sistema heterotrófico de cultivo, ao invés da luminosidade, a fonte de carbono orgânico e a quantidade de nitrogênio são os fatores que mais interferem na composição química da biomassa gerada. Nesse sentido, a assimilação de acetato tende a

aumentar a síntese de ácidos graxos em microalgas devido à maior atividade da malato desidrogenase (Perez-Garcia et al., 2011). Sendo assim, no caso do aproveitamento de águas residuárias para produção heterotrófica de biomassa, é fundamental a caracterização química do meio, principalmente em termos de carbono e nitrogênio.

A quantificação dos lipídios da biomassa resultante deste ensaio apontou um teor de apenas 2,2%, resultado menor que aquele obtido em batelada simples. Isso sugere novamente que a biomassa obtida apresenta uma fração de contaminantes bacterianos, nos quais o teor lipídico é comumente baixo (Gao, *et al.*, 2012; Thevenieau & Nicaud, 2013).

De acordo com os resultados obtidos, a produtividade lipídica desta biomassa em vinhaça foi elevada de 69 (Tabela 5.1) para 108 mg L⁻¹ dia⁻¹. Entretanto, este aumento na produção de lipídios totais se deu novamente pela alta produtividade em biomassa e não pelo aumento no teor lipídico da mesma, o que não permite maiores conclusões a respeito do efeito da temperatura no acúmulo de lipídios em *D. subspicatus*.

5.1.3 Sistema de cultivo em batelada alimentada

De acordo com Doran (1995), as operações em batelada alimentada (*fed-batch*) envolvem intermitente ou contínua entrada de substrato, com suplementação de nutrientes, diluição do meio de cultivo e obtenção de massas celulares elevadas.

A figura 5.10 apresenta a curva de crescimento da biomassa em vinhaça bruta centrifugada adicionada ao reator a um fluxo de alimentação de 67 mL.h⁻¹, ou seja, partindo-se de 1 L para atingir um volume final de 3 L em ensaio de batelada alimentada por 30 horas.

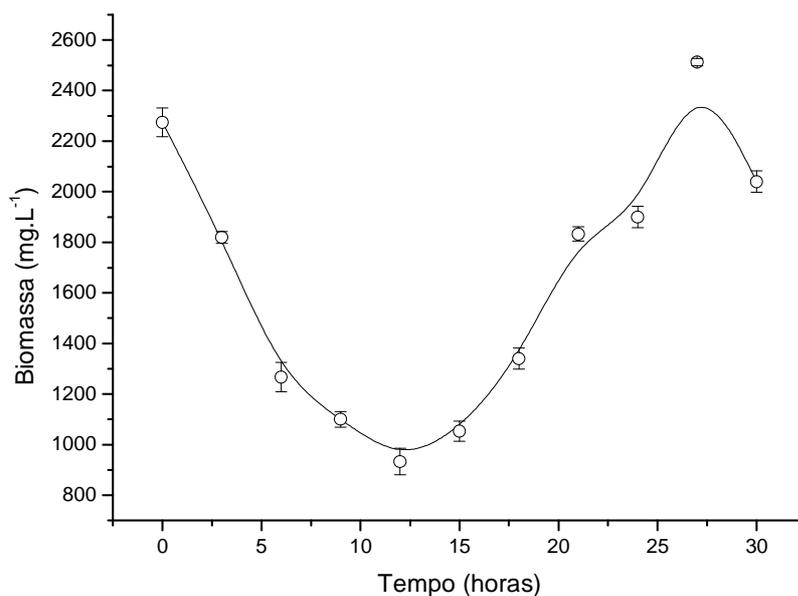


Figura 5.10: Curva de crescimento de biomassa para ensaio em batelada alimentada com vinhaça bruta centrifugada.

O inóculo foi mais concentrado quando comparado aos experimentos anteriores, uma vez que foi utilizada a mesma quantidade em massa referente ao reator cheio, contendo apenas 1/3 do volume total.

Foi possível observar que a taxa de diluição do meio superou a velocidade de crescimento da biomassa até as 12 horas de cultivo, quando a curva tornou-se ascendente.

Como foi possível verificar pela contagem de *D. subspicatus* na Figura 5.11, novamente a implementação da biomassa foi provavelmente devida ao acúmulo de material intracelular e/ou à evolução da contaminação do meio. Entretanto, é possível concluir que houve crescimento celular no período já que a concentração celular se manteve praticamente estável, diluindo-se menos que o esperado devido à alimentação de vinhaça.

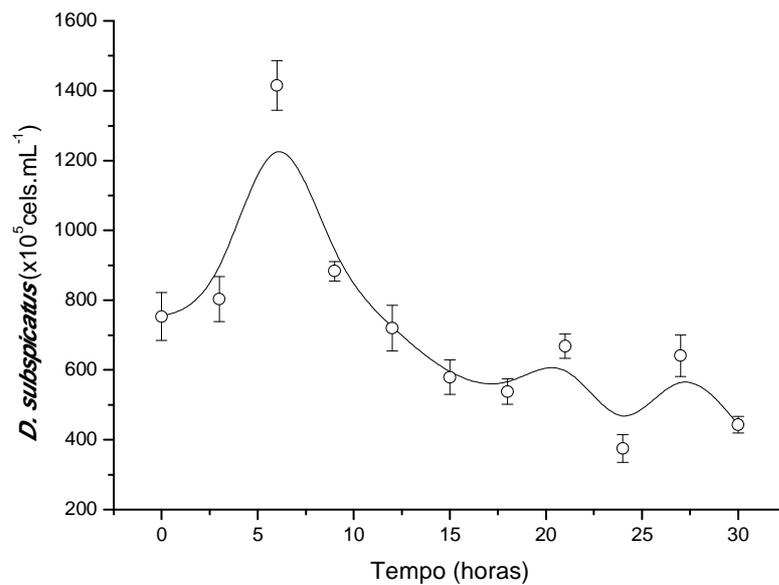


Figura 5.11: Contagem de *D. subspicatus* em vinhaça bruta centrifugada em ensaio de batelada alimentada com vinhaça bruta centrifugada

A contaminação bacteriana foi maior que em qualquer outro ensaio realizado, sendo possível apenas ser quantificada até as 9 horas de cultivo, tamanha a necessidade de diluição das amostras após esse período ($>10^7$). Assim, a análise por Petrifilm[®] foi inviável, não sendo apresentada. Este aspecto tem um efeito bastante pronunciado no ensaio em *fed-batch* devido à alimentação constante de vinhaça no reator.

A variação de biomassa no reator em regime de batelada alimentada pode ser avaliada de acordo com o balanço de massa proposto pela Equação 5.2, onde D é a taxa de diluição (relação da vazão de alimentação e o volume do biorreator). Assim, conforme verifica-se na Figura 5.10, X pode permanecer praticamente constante, ou seja, a concentração celular final ser similar a inicial. Apesar disto, houve um acúmulo de biomassa no reator, sendo a queda na concentração celular nas primeiras 10 horas devido ao efeito da diluição. Entretanto, apesar da concentração final ter sido atingida para um volume maior, a produção de biomassa foi inferior aos ensaios anteriores em batelada simples, sugerindo que a operação em batelada alimentada pode ser complexa

quando o meio é composto por águas residuárias, devido à dificuldade de controle dos contaminantes através do sistema de alimentação.

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu - D) \quad (\text{Equação 5.2})$$

5.1.4 Repetição do cultivo de *D. subspicatus* em biorreator de bancada com vinhaça bruta centrifugada

Com a finalidade de repetir o primeiro ensaio conduzido no reator de bancada com a vinhaça bruta sem qualquer pré-tratamento além do ajuste inicial de pH e centrifugação dos sólidos suspensos, após os ensaios preliminares, procedeu-se novamente um cultivo de 30 horas, dessa vez autoclavando a vinhaça diretamente no reator e adicionando a biomassa centrifugada ao invés de cultivar a biomassa e decantá-la no reator e, após sua decantação, adicionar a vinhaça autoclavada.

Esse procedimento permitiu menos contato da vinhaça diretamente com o ar externo ao reator e diminuiu a carga inicial de contaminantes provenientes do inóculo por sua separação durante a centrifugação a 5 xg (força relativamente baixa para a separação de bactérias do sobrenadante, mas empiricamente constatada como suficiente para separar *D. subspicatus* do mesmo).

Esse novo ensaio apresentou a curva de crescimento conforme observado na Figura 5.12.

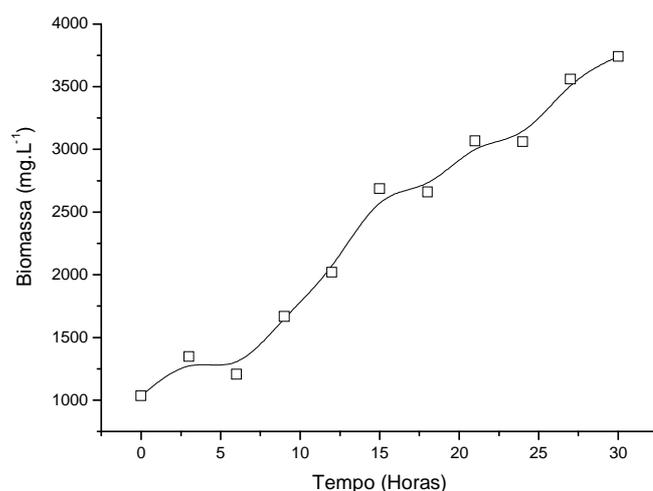


Figura 5.12: Curva de crescimento de biomassa em vinhaça bruta centrifugada.

Neste ensaio foi possível a obtenção de uma quantidade grande de biomassa, cerca de 4 vezes maior que a inicial. Conforme se pode verificar na figura 5.13, a microalga *D. subspicatus* chegou a dobrar sua contagem celular dentro das primeiras 9 horas de cultivo, porém essa concentração tendeu a decrescer deste momento em diante, diferentemente das bactérias que chegaram a uma elevação de praticamente três ciclos logarítmicos, como foi possível observar na figura 5.9.

De acordo com a contagem celular, concluiu-se que a biomassa obtida por filtração não estava representando exatamente o desenvolvimento celular de *D. subspicatus* nos ensaios, mas uma média entre a proliferação de *D. subspicatus*, seu acúmulo de material intracelular e o desenvolvimento dos contaminantes.

Também foi possível observar um padrão entre as contagens celulares de quase todos os cultivos preliminares independentemente do tratamento ou do modelo estudado: um pico de crescimento apareceu sempre dentro das primeiras 9 horas, indicando que neste período a microalga estava respondendo ao estímulo da vinhaça, iniciando um colapso da população logo após esse período.

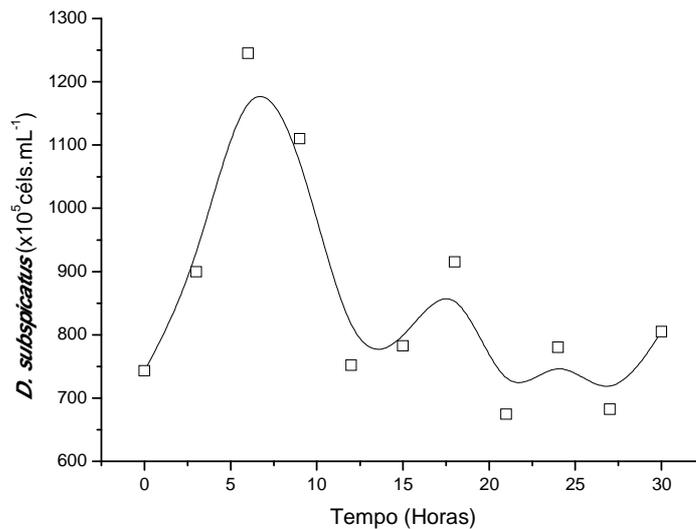


Figura 5.13: Contagem celular da microalga *Desmodesmus subspicatus* durante cultivo em vinhaça bruta centrifugada.

Considerando essa observação, concluiu-se que as bateladas deveriam ter tempo reduzido de forma a manter a população de microalgas ainda viável e crescendo e a contaminação bacteriana sob controle, evitando que essa se torne majoritária no meio de cultivo. Assim, os próximos ensaios foram mantidos por 9 horas, momento em que há elevado desenvolvimento celular e uma contaminação bacteriana ainda discreta.

Os problemas de contaminação por bactérias ou outras microalgas são relatados para todos os sistemas de produção de biomassa microalgal, inclusive os fotoautotróficos, os quais tendem a ter tempos de residência elevado (Perez-García *et al*, 2011). Entretanto, as pesquisas a respeito desses processos limitam-se a indicar a ocorrência de contaminação do ponto de vista qualitativo, apresentando pouca objetividade ou propondo alternativas para minimizar ou contornar tais problemas.

O tempo de processo é um dos parâmetros mais importantes nos cultivos em batelada. De acordo com Doran (1995) o tempo de batelada ideal pode ser definido como:

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\text{máx}}} \ln \left(\frac{X_f}{X_0} \right)$$

(Equação 5.3)

onde t_b é o tempo de batelada, $\mu_{\text{máx}}$ é a velocidade específica de crescimento máxima, e X_f e X_0 as concentrações final e inicial de biomassa, respectivamente.

Considerando os dados de aumento de biomassa obtido nos ensaios com vinhaça bruta centrifugada, conforme dados da Figura 5.1, temos que X_f é aproximadamente 3 vezes a concentração inicial X_0 , enquanto o $\mu_{\text{máx}}$ vale aproximadamente $0,1 \text{ h}^{-1}$. Sendo assim, o t_b ideal calculado está em torno de 10 h, ou seja, próximo do valor que foi adotado para minimizar os efeitos da contaminação bacteriana.

5.2 Tratamento físico-químico da vinhaça

Todos os ensaios realizados neste trabalho utilizaram vinhaça de um mesmo lote de coleta, sendo os seus valores iniciais de pH, DQO, NT, PT e sólidos totais, para a vinhaça bruta sem qualquer tipo de tratamento ou separação, apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Concentrações iniciais de nutrientes da vinhaça utilizada nos ensaios.

pH	DQO (mgL ⁻¹)	NT (mgL ⁻¹)	PT (mgL ⁻¹)	Sólidos totais (gL ⁻¹)
3,5	35181 ± 703	404 ± 35	1,6 ± 0,3	26,22

*DQO: demanda química de oxigênio; NT: nitrogênio total; PT: fósforo total

5.2.1 Ajuste de pH e floculação da vinhaça

Conhecendo o caráter tamponante da vinhaça e a grande quantidade de hidróxido necessária para ajustar o seu pH para 7,0 (aproximadamente 3 g.L⁻¹ de NaOH), a proposta foi estudar a utilização de outro agente alcalinizante em substituição ao NaOH com a proposta de diminuição de custos, pensando em um possível aumento de escala futuro.

Como primeira alternativa, foi utilizada a cal extinta (Ca(OH)₂) de padrão comercial, que é conhecidamente um insumo de baixo custo utilizado na construção civil e também comumente utilizado nas usinas de açúcar e álcool no pré-tratamento do caldo de cana para a fabricação de açúcar.

A alteração do pH da vinhaça pela cal foi mais lenta quando comparada com a alteração quase instantânea observada com NaOH, causando uma elevação lenta e gradual do pH deste efluente.

No primeiro ensaio de ajuste do pH com a cal foi adicionada uma dose excessiva fazendo com que o pH se elevasse muito acima de 7,0, aproximando-se de 11,0. Uma intensa floculação do colóide presente na

vinhaça foi observada com a adição de aproximadamente 25 g.L^{-1} de cal extinta, conforme verificado na Figura 5.14.



Figura 5.14: Aspecto da amostra de vinhaça e colóide flocculado com cal extinta

Com a intenção de confirmar se o resultado de floculação obtido com a cal extinta foi devido à ação do Ca(OH)_2 ou algum contaminante presente na cal comum utilizada, foi testado o Ca(OH)_2 p.a., obtendo a confirmação do potencial floculante deste reagente em vinhaça a partir do pH 11,4. A aparência da vinhaça após a decantação é apresentada na Figura 5.15.



Figura 5.15: Triplicatas de vinhaça após decantação em Jar-test utilizando Ca(OH)_2 p.a. como coagulante

Com a finalidade de verificar se a floculação observada foi devida exclusivamente ao elevado pH alcançado, realizou-se um ensaio utilizando como coagulante o NaOH. Nessas condições não foi observada nenhuma floculação, apontando a negação da hipótese, mesmo quando o pH foi elevado a 12,9.

Para aproveitar a amostra, decidiu-se aplicar 100 mg.L^{-1} de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (concentração comumente empregada para o tratamento de efluentes) aos testes feitos com NaOH com a intenção de verificar se esse conhecido, e amplamente utilizado, floculante também era capaz de flocular os colóides da vinhaça, podendo servir como um padrão de comparação para os ensaios com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, caso fosse observado resultado positivo.

O resultado apresentou-se como esperado e, quase instantaneamente, foi possível verificar a formação dos flocos. A figura 5.16 ilustra a aparência da vinhaça após decantação com 100 mg.L^{-1} de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ a pH aproximadamente 12,9 ajustado com NaOH.

Nessas mesmas condições, uma intensa floculação do colóide presente na vinhaça foi observada quando se adicionou aproximadamente 25 g.L^{-1} de cal extinta à vinhaça dos ensaios feitos com NaOH.



Figura 5.16: Triplicatas de vinhaça decantada em Jar-test após adição de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e pH ajustado para 12,9 com NaOH.

Observado esse fenômeno, o estudo sobre as alternativas de uso do NaOH para a neutralização do pH da vinhaça foi reavaliado, dando preferência à avaliação da clarificação da vinhaça previamente ao cultivo de *D. subspicatus*.

Para quantificar a eficiência da floculação, selecionou-se o pH ótimo de floculação considerando a velocidade de decantação (Figura 5.17) e sua relação com o pH do meio para os testes com o pH ajustado com Ca(OH)_2 e com o pH ajustado com NaOH e adição de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

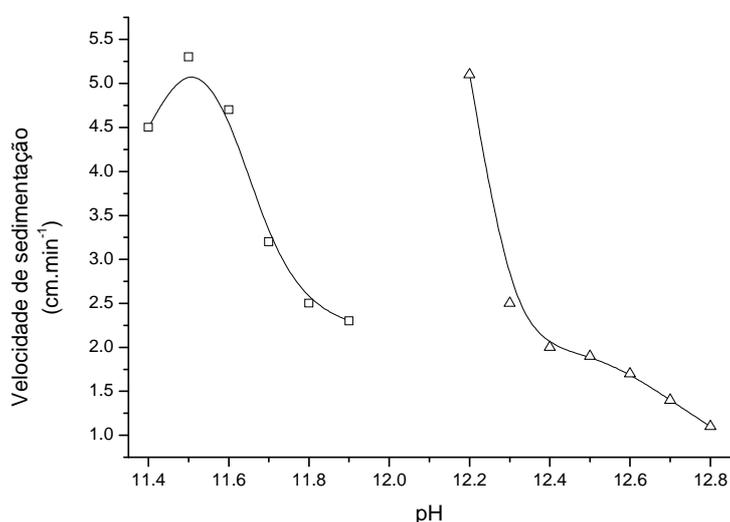


Figura 5.17: Velocidades de sedimentação do material suspenso em relação ao pH do meio usando Ca(OH)_2 (□) e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (Δ)

Observa-se que a floculação começa com um pH mais baixo para o Ca(OH)_2 e que também uma adição maior deste reagente não foi capaz de elevar o pH para cima de 12. Por outro lado, a floculação começa a um pH mais elevado quando conduzida com a adição de NaOH e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, atingindo uma estabilidade de pH por volta de 12,9.

Nota-se que a velocidade de decantação tende a diminuir com o aumento do pH, sendo mais rápida ao pH 11,5 ajustado com Ca(OH)_2 e 12,2 quando ajustado com NaOH com adição de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

A velocidade de sedimentação foi escolhida como parâmetro a ser analisado após a verificação prática de que, em condições de pH mais elevadas, em ambos os casos, o colóide demorava mais a sedimentar do que em condições de pH menos elevadas.

Também para verificar a eficiência da floculação foi avaliada a DQO do sobrenadante para ambos os tratamentos. O decaimento é demonstrado na figura 5.18, onde podemos verificar uma diminuição máxima da DQO de 40% para a floculação conduzida com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em pH 11,9 e de 60% com a utilização de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ em pH 12,3 ajustado com NaOH. Isto corresponde ao que é citado na literatura por Gonçalves e Silva (2000) em ensaios com óxido de cálcio e sulfato ferroso em vinhaça, sendo obtidas remoções de 52 e 44%, respectivamente, em pH próximo a 12.

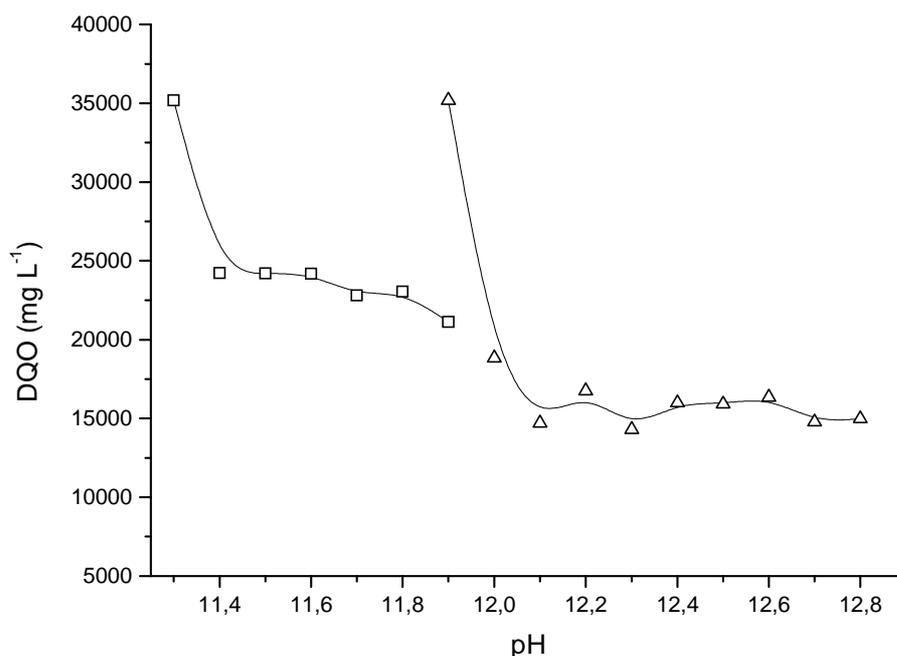


Figura 5.18: Remoção da DQO no sobrenadante após a decantação com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (□) e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (Δ)

As Tabelas 5.3 e 5.4 apresentam a análise de variância entre as médias de cada pH testado em ensaio com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, apontando diferença significativa ao nível de 5% em ambos os ensaios.

Tabela 5.3: Análise de variância das médias de decaimento da DQO no ensaio conduzido com $\text{Ca}(\text{OH})_2$

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.
Testes	5	22333186	4466637	7.6	0.002
Residual	12	7067007	588917		
Total	17	29400193			
Média geral	23264				
s (Residual)	767.4				
Coeficiente de variação	3.3 %				

*GL: graus de liberdade; S.Q: soma de quadrados; Q.M: quadrado médio; F: resultado do teste F; Prob: probabilidade

Tabela 5.4: Análise de variância das médias de decaimento da DQO no ensaio conduzido com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.
Testes	8	46868061	5858508	2.4	0.057
Residual	18	43576716	2420929		
Total	26				
Média geral	15841				
s (Residual)	1556				
Coeficiente de variação	9.8 %				

*GL: graus de liberdade; S.Q: soma de quadrados; Q.M: quadrado médio; F: resultado do teste F; Prob: probabilidade

A comparação múltipla de médias pelo teste LSD (menor diferença significativa) de Fisher para o ensaio utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ é apresentada na Tabela 5.5 e nos mostra que houve apenas diferença significativa entre o pH 11,9 e os demais, com o pH 11,7 aparecendo como um intermediário e pertencendo aos dois grupos formados.

Tabela 5.5: Comparação entre as médias de DQO com o aumento do pH com Ca(OH)_2

pH	DQO (mgL^{-1})
11,4	24217 ^a
11,6	24177 ^a
11,7	22811 ^{ab}
11,8	23052 ^a
11,9	21124 ^b
DQO inicial	35181

Já a comparação múltipla de médias pelo teste LSD de Fisher para o ensaio utilizando o $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ como agente floculante com NaOH como alcalinizante, apontou diferença significativa a 5% de probabilidade apenas entre as médias de DQO do pH 12,2 e 12,3 e a semelhança entre os demais e este, revelando que é desnecessária a elevação do pH para níveis acima deste patamar, como podemos ver na tabela 5.6.

Tabela 5.6: Comparação entre médias de DQO mediante a utilização de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e NaOH

pH	DQO (mgL^{-1})
12,2	16747 ^a
12,3	14297 ^b
12,4	15984 ^{ab}
12,5	15904 ^{ab}
12,6	16346 ^{ab}
12,7	14779 ^{ab}
12,9	14980 ^{ab}
DQO inicial	35181

Dessa forma, foi necessário avaliar em conjunto a velocidade de decantação com os valores de DQO para selecionarmos o valor de pH aproximado para a decantação em ambos os casos.

Na tabela 5.7 são apresentados os valores de DQO e a velocidade de decantação para cada pH analisado nos dois ensaios, bem como, em destaque, os valores eleitos como ótimos para a decantação em cada caso.

Tabela 5.7: pH ótimo para a decantação

pH	Ca(OH) ₂		Al ₂ (SO ₄) ₃	
	DQO (mgL ⁻¹)	Velocidade de decantação (cmminuto ⁻¹)	DQO (mgL ⁻¹)	Velocidade de decantação (cmminuto ⁻¹)
11,4	24217^a	4,5	-	-
11,6	24177 ^a	4,7	-	-
11,7	22811 ^{ab}	3,2	-	-
11,8	23052 ^a	2,5	-	-
11,9	21124 ^b	2,3	-	-
12,2	-	-	16747^a	5,1
12,3	-	-	14297 ^b	2,5
12,4	-	-	15984 ^{ab}	2,0
12,5	-	-	15904 ^{ab}	1,9
12,6	-	-	16346 ^{ab}	1,7
12,7	-	-	14779 ^{ab}	1,4
12,9	-	-	14980 ^{ab}	1,1

Os valores em destaque foram selecionados como as condições ótimas de decantação, com base não apenas na eficiência na remoção da matéria orgânica em suspensão, mas também pelo tempo de decantação em escala maior e pela quantidade de insumo necessária para elevar o pH ao nível escolhido.

Esses valores diferem em parte daqueles concluídos como ótimos por Gonçalves e Silva (2000) que, focados na remoção máxima de DQO, concluíram que valores de pH acima de 12,4 mostravam melhores resultados,

o que fatalmente, sob sua ótica, é verdadeiro. Entretanto, o tempo de processo e o uso racional dos insumos se mostram mais importante que a pequena diferença estatística entre valores de pH tão próximos quando se pensa em um futuro escalonamento.

Analisando os dados com foco na remoção da DQO, o tratamento com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e NaOH se mostrou mais eficiente que aquele utilizando cal extinta, entretanto o comportamento desta vinhaça enriquecida com alumínio no solo e no desenvolvimento das culturas de cana-de-açúcar deve ser estudado antes de uma conclusão definitiva sobre o assunto, levando em consideração o processo como um todo e não apenas como uma parte.

Sabendo-se que um pH tão elevado pode ser esterilizante, foi realizada a contagem de heterotróficos totais no sobrenadante da vinhaça clarificada (Figura 5.19). Foi possível observar que a vinhaça bruta armazenada sob refrigeração e mantida a pH 3,5 permaneceu estéril, enquanto o tratamento com cal extinta de padrão comercial trouxe contaminação microbiológica de 80 UFC.mL^{-1} para a amostra, diferente do tratamento com NaOH que manteve a esterilidade da amostra. Após a neutralização do pH, tanto as amostras tratadas com NaOH e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ quanto as tratadas com cal extinta apresentaram contaminação microbiológica de 90 e 290 UFC.mL^{-1} respectivamente, apontando uma melhor qualidade de tratamento com o NaOH e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ no que tange à menor contaminação microbiológica.

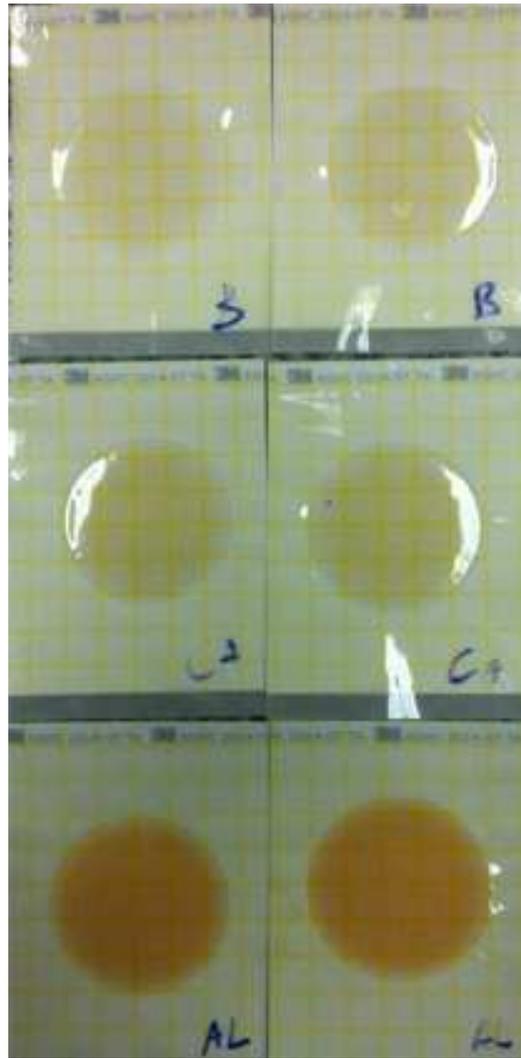


Figura 5.19: Imagens das placas Petrifilm® inoculadas com os sobrenadantes da vinhaça decantada (B: Bruta; CA: $\text{Ca}(\text{OH})_2$; AL: $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$).

5.2.2 Neutralização do pH

Após realização da decantação como tratamento físico-químico com separação do sobrenadante, tornou-se necessário o ajuste do pH em torno de 7 previamente à condução dos cultivos das microalgas

Como as conexões e a tampa do biorreator de bancada são constituídas de aço inox, não foi utilizado o ácido clorídrico como comumente ocorre em ensaios conduzidos em frascos menores de vidro, sendo aplicado ácido fosfórico para o ajuste de pH para 7,0.

Iniciado o ajuste, observou-se uma nova floculação, tornando a vinhaça límpida após 20 minutos de decantação, com uma nítida redução da turbidez, conforme apresentado na Figura 5.20.

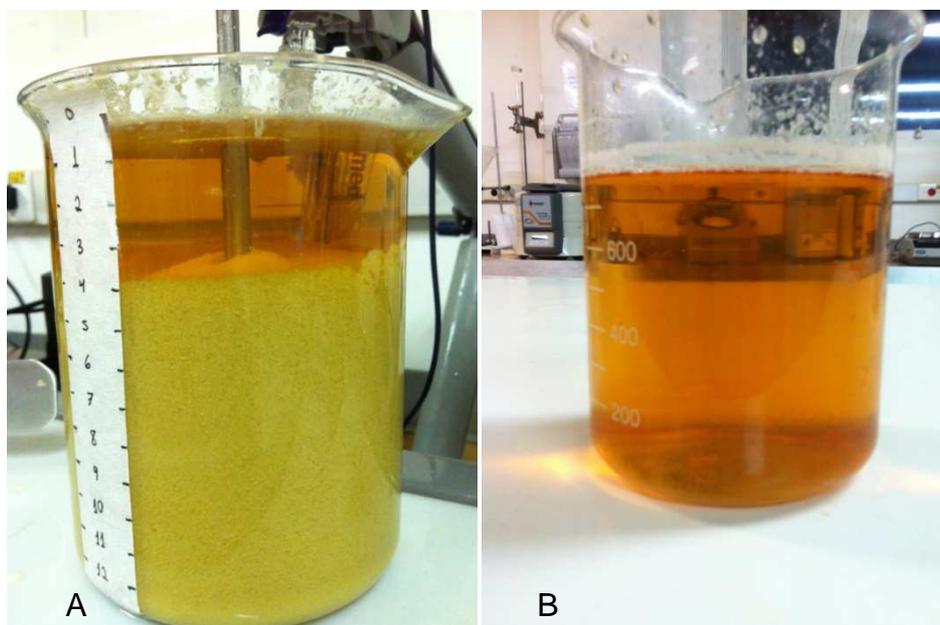


Figura 5.20: Fotografias das amostras de vinhaça decantada com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ após adição de ácido fosfórico (A) e do sobrenadante clarificado (B)

Inicialmente, este fenômeno pôde ser atribuído à complexação do cálcio em solução com o íon fosfato gerado pela ionização do ácido fosfórico, formando o fosfato de cálcio insolúvel (Lazic *et al.*, 2001). Entretanto, o fenômeno também se repetiu quando o ácido fosfórico foi adicionado ao sobrenadante obtido na decantação com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, como se verifica na figura 5.21.

Sendo assim, com os tratamentos físico-químicos propostos foi obtido um meio de cultivo com matéria orgânica predominantemente solúvel e mais adequado ao cultivo heterotrófico de microalgas.



Figura 5.21: Aspecto visual da amostra de vinhaça decantada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ após adição de ácido fosfórico

5.3. Sistema de cultivo de *D. subspicatus* em vinhaça a partir de tempos de batelada inferiores

5.3.1 Ensaio com vinhaça bruta centrifugada e autoclavada.

Conforme discutido anteriormente, devido aos problemas de contaminação bacteriana relatados, a viabilidade da produção de microalgas em vinhaça depende do tempo de cultivo. Assim, foram conduzidos ensaios com tempo de batelada de 9 horas. A Figura 5.22 apresenta a curva de crescimento da biomassa no reator ao longo do ensaio de 9 horas.

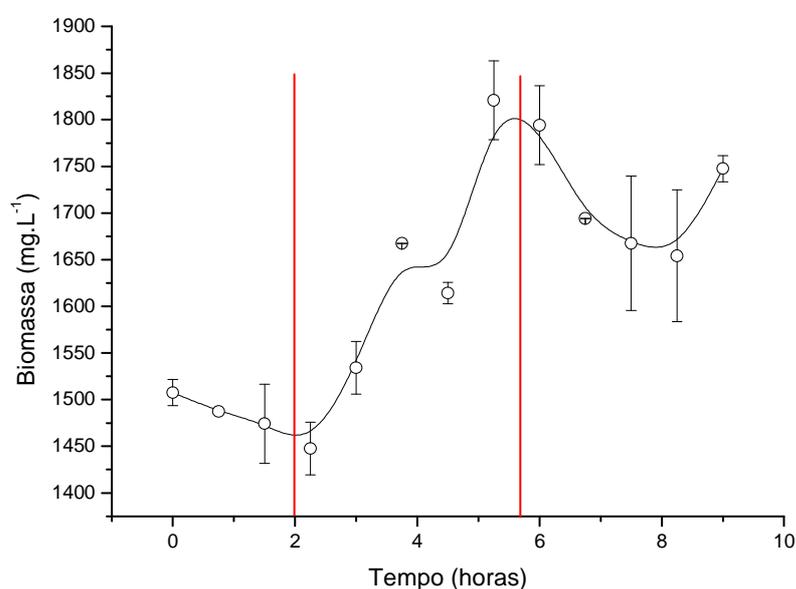


Figura 5.22: Perfil de biomassa em vinhaça bruta, com destaque para três períodos de crescimento com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas

A partir dos dados observa-se uma fase adaptação de pouco mais de 2 horas, (período 1) e aparentemente duas fases de crescimento consecutivas no período 2, seguidas de uma fase de degeneração após aproximadamente 5 horas (período 3).

A produtividade de biomassa ao longo da fase de crescimento foi de $130 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com μ_{max} de $0,07 \text{ h}^{-1}$. O μ_{max} (calculado pela equação 4.1 descrita em

material e métodos) do primeiro e do segundo ciclos de crescimento foram $0,04$ e $0,075 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

A composição da biomassa observada ao final do ensaio foi de 14,4% lipídios, 49,1% proteínas e 36,4% carboidratos (estimativa por diferença), o que demonstra que tanto a fração lipídica como a proteína são passíveis de aproveitamento.

Os perfis dos substratos oscilaram durante as 9 horas, se mostrando divergente entre TOC e NT no período 1, mas concordante nos períodos 2 e 3, como se verifica na figura 5.23.

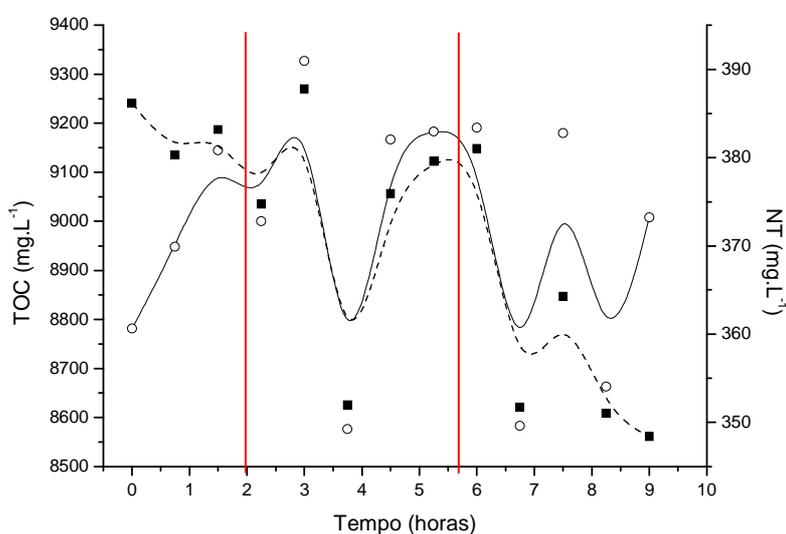


Figura 5.23: Perfis de carbono orgânico total – TOC (○) e nitrogênio total – TN(■) em vinhaça bruta, com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas

Em aproximadamente 2 horas (período 1), observou-se a diminuição de 3% da concentração de NT, concomitante a um aumento de 2,4% na concentração de TOC, praticamente sem geração de biomassa. No intervalo definido como período 2, observou-se um aumento de 3,5 e 3,4% nas concentrações de TOC e NT, respectivamente. Após, observou-se um consumo de 8,8 de TOC e 10,2% de NT, com rendimentos em torno de $0,24$ e $5 \text{ mg}_{\text{biomassa}} \cdot \text{mg}_{\text{NT}}^{-1}$ em biomassa em apenas 45 minutos. Isto deu-se seguido

de um aumento gradual de 6,6 e 7,3% das citadas concentrações em 1,5 hora concomitante a um segundo ciclo de aumento da biomassa. O terceiro período apresentou uma oscilação de concentrações tão grande quanto a do segundo, porém em maior proporção para TOC do que para NT, encerrando-se com uma diminuição de 1,9 e 9,4% nas concentrações de TOC e NT, respectivamente.

As curvas de consumo de TOC, NT e PT, ao final de 9 horas, são apresentadas isoladamente nas figuras 7.4, 7.5 e 7.6 do anexo. De acordo com os dados, houve remoção de 5,3% do carbono, 13,5% de nitrogênio e aumento de 8,9% do fósforo. Em 9 horas de ensaio, as velocidades médias de consumo de TOC e NT foram de 14,3 e 4,26 mg.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente, com rendimentos globais de 0,68 e 2,28 mg.mg⁻¹ de TOC e NT em biomassa.

Xin et al (2010) reportaram a razão nitrogênio-fósforo apresenta um substancial efeito na remoção destes nutrientes, sendo obtido na faixa de 5:1 a 12:1 remoções de 83–99% de nitrogênio e 99% de fósforo em 13 dias. Considerando os dados apresentados na Tabela 5.2, a amostra de vinhaça utilizada nos experimentos apresentou razão C/N de 6,3 e N/P de 537. Assim, a limitação por fósforo pode ter levado a baixas remoções de carbono e nitrogênio no meio. A composição elementar das células de microalgas pode indicar a razão ótima de nutrientes nas águas residuárias. De acordo com Kapdan e Aslan (2008), como a biomassa de microalgas pode ser representada pela fórmula empírica C₁₀₆H₂₆₃O₁₁₀N₁₆P, a vinhaça apresentaria a razão C/N ideal e uma elevada razão N/P, ou seja, uma limitação de fósforo no meio. De qualquer forma, a composição média das microalgas depende da linhagem e das condições de cultivo.

A figura 5.24 apresenta a curva de contagem celular de *D. subspicatus* juntamente com as curvas de consumo de TOC e NT.

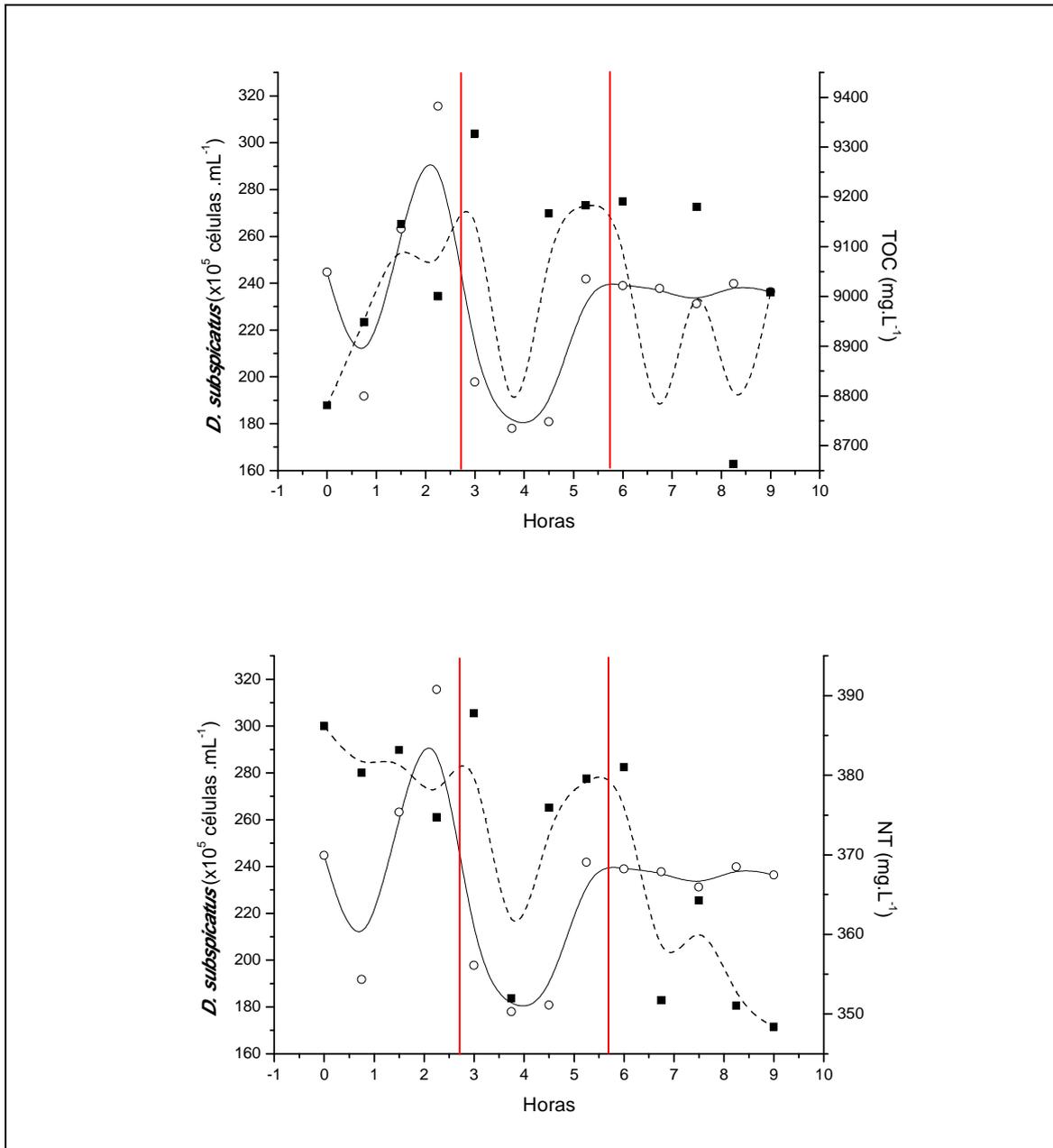


Figura 5.24: Comportamento das concentrações de TOC e NT(■) em comparação com o desenvolvimento de *D. subspicatus*(○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas.

A velocidade de diminuição da concentração de biomassa no primeiro período foi de $13,3 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com μ_{max} de $0,009 \text{ h}^{-1}$ concomitante a um aumento na concentração de *D. subspicatus* com produtividade de $31,5 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e μ_{max} de $0,1 \text{ h}^{-1}$.

Apesar de estar evidenciada a limitação por fósforo, os parâmetros cinéticos são equivalentes aos valores encontrados na literatura para produção

de microalgas em efluentes. Xin et al (2010), trabalhando com efluente secundário de estação de tratamento de esgoto obtiveram para *Scenedesmus* sp. obtiveram produtividade celular similar, com concentração máxima de 0,11 g.L⁻¹ e $\mu_{\text{máx}}$ de 0,00833 h⁻¹, valores estes muito inferiores ao cultivo de *D. subspicatus* em vinhaça. Em outro trabalho, Xin et al (2011) reportam velocidades específicas de crescimento máximas na faixa de 0,0083 a 0,033 h⁻¹ para *Scenedesmus* sp. LX1 em meio BG11. Martínez et al (2000) obtiveram em biorreator de mistura a 30°C velocidades específicas máximas de 0,0438 h⁻¹ para *Scenedesmus obliquus* em efluente urbano.

As velocidades de consumo (calculadas segundo a equação 4.4 descrita no material e métodos) de TOC, NT e PT neste período foram de -97,3, 5,1 e 0,06 mg.L⁻¹.h⁻¹. Neste contexto, sugere-se que houve uma diminuição da biomassa nesse período concomitante com uma fase de multiplicação celular, com consumo de NT e PT. Porém, este aumento na concentração de TOC no meio pode ser devido à lise durante a adaptação das células, havendo rompimento com liberação do material de reserva no meio. Essa lise celular pode ter sido ocasionada por dificuldades durante o processo de multiplicação, o que é compreensível quando considerado o caráter estressante do meio.

No início do segundo período, quando as concentrações de TOC e NT se elevaram ao ponto mais alto observado até o momento, observou-se o primeiro ponto de crescimento da biomassa, de 5,5%, concomitante a um decréscimo de 37,3% na concentração celular de *D. subspicatus*, o que parece discrepante em um primeiro momento, porém levando a linha de raciocínio anterior adiante, aponta para um ponto intermediário entre o fim da fase de multiplicação e o início do acúmulo de material de reserva pelas células recém multiplicadas, porém com uma continuidade na degeneração de parte da biomassa, o que implicou o aumento na concentração de TOC e NT no meio.

Após alcançar a perda de 43,6% da concentração celular, foi observado o primeiro patamar de crescimento da biomassa de 10,9% concomitante a um consumo de TOC e NT em velocidades de 1001,3 e 47,7 mg.L⁻¹.h⁻¹ com rendimentos de 0,13 e 2,79 mg.mg⁻¹ destes nutrientes respectivamente em biomassa, indicando que as células recém multiplicadas estavam, neste ponto,

preenchendo suas reservas e, observando o comportamento da curva adiante, outra parte da biomassa duplicando seu material para uma segunda onda de multiplicação.

Ainda no segundo período da curva de crescimento de biomassa foi possível observar um aumento de 15,1% após o primeiro patamar de crescimento concomitante a uma segunda onda de multiplicação celular com aumento de 35,8% na concentração celular e nas concentrações de TOC, NT e PT do meio a velocidades de 404,7, 18,4 e 0,39 mg.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente, possivelmente pelos mesmos motivos sugeridos anteriormente, com a diferença em relação ao período 1 quanto ao comportamento da curva de desenvolvimento da biomassa, muito provavelmente sugerindo uma adaptação da biomassa ao meio.

O patamar de concentração celular alcançado no final do período 2 se manteve até o final do período 3, porém observou-se nos primeiros 45 minutos deste período (6 horas) uma diminuição de 9,5% da concentração de biomassa alcançada ao final do período 2 com diminuição das concentrações de TOC e NT de 7,1 e 8,3% com velocidades de consumo de 810,7 e 39,1 mg.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente e aumento na concentração de PT de 4,8% com velocidade de 0,1 mg.L⁻¹.h⁻¹, indicando um novo momento de degeneração celular, porém concomitante à fase de acumulação de material de reserva das células recém multiplicadas.

A diferença entre este momento e aquele observado entre os períodos 1 e 2 é que a geração celular entre os períodos 2 e 3 foi 50% menor que aquela, fazendo com que a velocidade de acumulação de material de reserva pelas células recém geradas não acompanhasse a velocidade de dispersão no meio do material de reserva das células senescentes, desequilíbrio este que se reflete claramente na oscilação da curva de concentração de TOC ao longo do período 3.

Supondo-se que a velocidade de liberação de material celular para o meio com o rompimento celular seja maior que a de absorção, transformação e acúmulo de material pelas células de *D. subspicatus*, é possível compreender a diminuição na concentração de biomassa após essa pequena fase de

multiplicação e equilíbrio das taxas de geração e degeneração celular durante o período 3.

A menor geração celular durante os períodos 2 e 3, bem como o equilíbrio encontrado na concentração celular após esse momento podem estar relacionados com o início da fase exponencial da contaminação por outros organismos heterotróficos a partir das 4,5 horas, como se pode observar na Figura 5.25, onde se apresentam as curvas de concentração celular de *D. subspicatus* e evolução dos contaminantes.

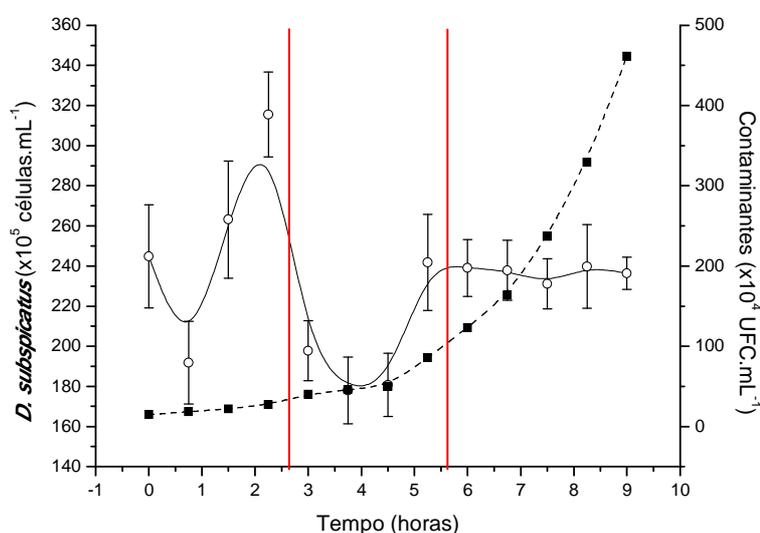


Figura 5.25: Contagem celular de *D. subspicatus* (○) e contaminantes (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas.

Pode-se notar que a contagem de *D. subspicatus* é cerca de dez vezes superior durante as 9 horas de ensaio, embora ocorra um desenvolvimento exponencial dos contaminantes. Assim, pode-se concluir que as bactérias tiveram pouca interferência no crescimento das microalgas durante os períodos 1 e 2, mas podem estar relacionadas a um estresse causado pela competição por nutrientes a partir do terceiro período.

A Figura 5.26 apresenta a evolução do consumo de O₂ e aumento na produção de CO₂ ao longo das 9 horas, bem como a evolução do pH em

comparação com o desenvolvimento de *D. subspicatus*. De acordo com os dados, o consumo médio de O₂ até as 4,5 horas manteve-se em um patamar de 1,19 mg.L⁻¹.h⁻¹, de onde gradualmente aumentou até estabilizar-se em 6,33 mg.L⁻¹.h⁻¹ após as 8 horas. Conforme já mencionado anteriormente, o consumo de oxigênio durante o cultivo heterotrófico de microalgas é baixo quando comparado a sistemas envolvendo bactérias e fungos. Entretanto, a literatura carece de trabalhos mais específicos a este respeito e, de acordo com a Figura 5.4, o coeficiente de transferência de oxigênio (K_{La}) do biorreator consegue manter no meio condições não limitantes de oxigênio.

O aumento do pH está relacionado com o transporte ativo de alguns carboidratos específicos através da membrana celular. Isto promove a alcalinização do meio devido ao consumo de prótons acompanhado pelo transporte ativo de açúcares, queda da concentração de hidrogênio e desequilíbrio do pH (Raboy & Padan, 1978; Hong & Lee, 2007). Este comportamento sugere que a vinhaça apresenta moléculas orgânicas específicas e que *Desmodesmus subspicatus* foi capaz de consumir este material em condições heterotróficas na ausência de luminosidade.

Diferentemente da concentração de O₂, a concentração de CO₂ apresentou maior aumento durante o período 1, durante a multiplicação celular de *D. subspicatus*, o que sugere indiretamente um gasto energético com consumo de material de reserva, e se comprova pelo elevado consumo de fósforo nesse período e ajuda a explicar a diminuição da biomassa neste mesmo período. Nos períodos 2 e 3 observa-se uma diminuição na inclinação da curva da concentração de CO₂ no meio, não relacionada com a saturação do meio, já que a mesma é de aproximadamente 1500 mg.L⁻¹ para esse gás, sugerindo uma diminuição no consumo de material de reserva, o que se prova verdadeiro pela constatação do aumento da biomassa no período 2, presumidamente pelo acúmulo de material de reserva pela microalga.

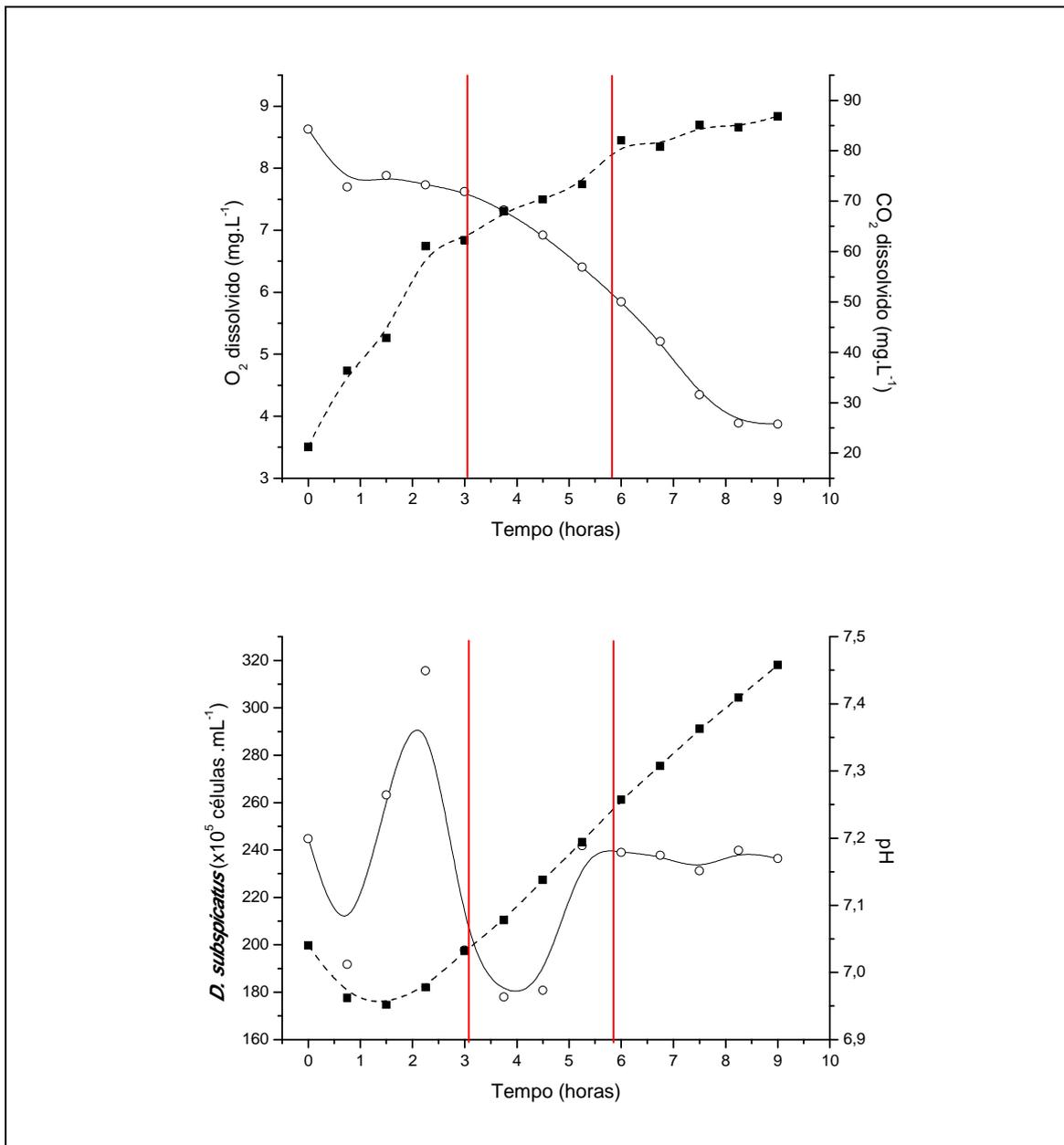


Figura 5.26: Evolução no consumo dos gases O_2 (○) e CO_2 (■) e evolução do pH (■) com o desenvolvimento de *D. subspicatus* (○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio com vinhaça bruta de 9 horas

As constatações obtidas com esses resultados permitem afirmar que o aumento da biomassa durante as 9 horas deveu-se principalmente ao acúmulo de material de reserva por *D. subspicatus*, devendo-se apenas secundariamente à multiplicação celular desta microalga durante o ensaio. Entretanto, apesar da variação calculada utilizando-se apenas os pontos inicial e final da concentração de *D. subspicatus* ao longo de 9 horas ser praticamente

nula, as fases de multiplicação e consumo de nutrientes verificadas confirmam a capacidade heterotrófica desta microalga, que mostrou-se em fase de adaptação ao meio ao longo do ensaio.

5.3.2 Ensaio com vinhaça tratada com Ca(OH)_2 e autoclavada

A figura 5.27 apresenta a curva de crescimento de *D. subspicatus* em vinhaça tratada com Ca(OH)_2 em batelada de 9 horas. Novamente, é possível notar três estágios de desenvolvimento, inicialmente uma fase de adaptação de 3 horas seguida de uma fase de crescimento e estagnação partir de 7 horas.

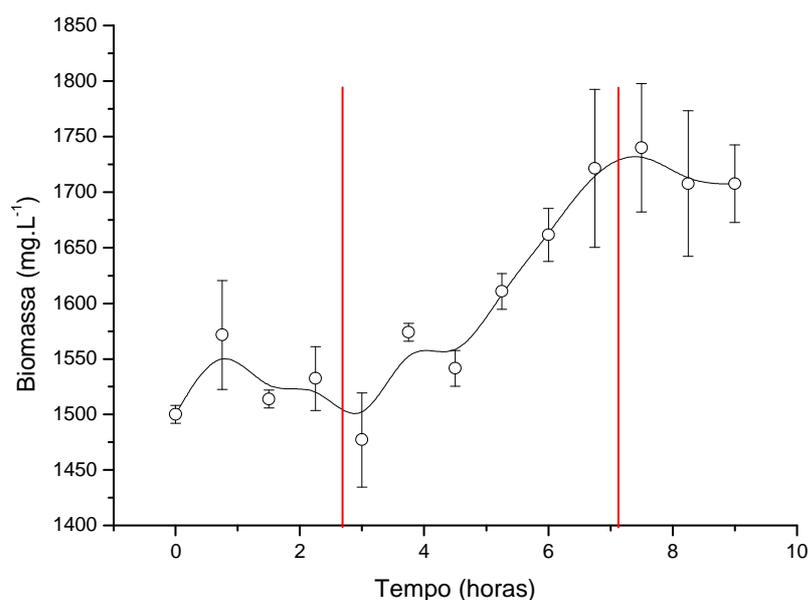


Figura 5.27: Curva de crescimento de biomassa com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH)_2 e autoclavada

A produtividade em biomassa durante o período de crescimento mais intenso foi de $53,3 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, com $\mu_{\text{máx}}$ de $0,034 \text{ h}^{-1}$. Este valor é inferior ao obtido para cultivo em vinhaça sem tratamento com Ca(OH)_2 , o que sugere limitação por substrato devido à separação de parte da matéria orgânica ou inibição pela quantidade de cálcio no meio. Mesmo assim, o valor encontra-se na mesma ordem de grandeza do reportado na literatura para microalgas clorófitas em águas residuárias (Martínez *et al.*, 2000; Xin *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2011).

O consumo de carbono, nitrogênio e fósforo iniciou-se efetivamente a partir de 3 horas e ao final de 9 horas houve uma remoção de 6, 10,3 e 30,8% das concentrações iniciais de TOC, NT e PT, respectivamente. Como se pode observar na figura 5.28, o consumo de TOC e NT se mostrou praticamente linear durante todo o ensaio, sugerindo concentrações adequadas e não limitantes e que o tratamento físico-químico facilitou a assimilação destes substratos pela microalga. Considerando o perfil de TOC, há uma tendência de consumo de ordem zero a partir de 4 horas, a uma taxa de $123,3 \text{ mg.L}^{-1}$. Da mesma forma, a curva de NT segue uma cinética de ordem zero para o mesmo período, a uma taxa de $8,63 \text{ mg.L}^{-1}$. Estes resultados sugerem um crescimento equilibrado da microalga em vinhaça submetida a este tratamento, uma vez que a razão C/N permaneceu em torno de 20 para todo o período experimental.

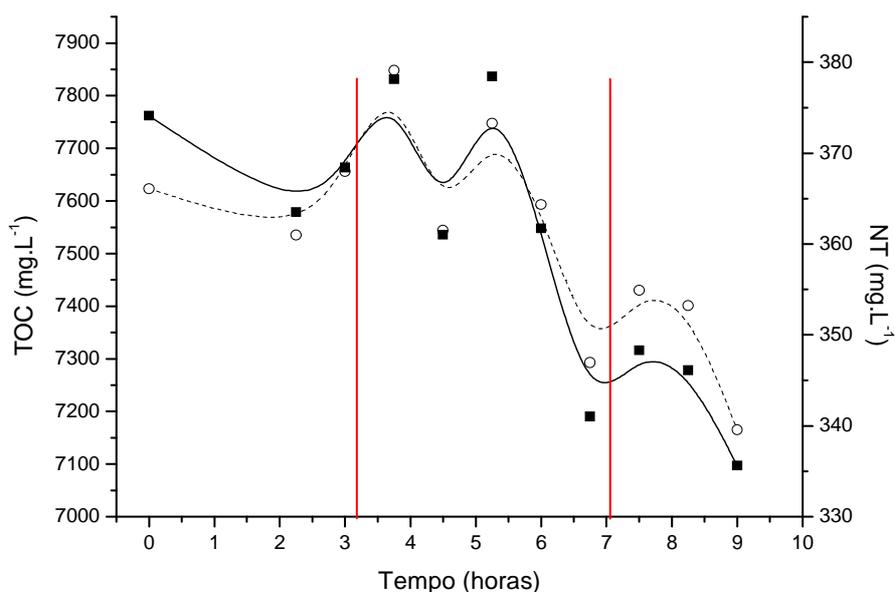


Figura 5.28: Curva de concentração de TOC (○) e NT (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH)_2 e autoclavada

Queiroz et al. (2007) avaliaram o cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da parboilização do arroz com razão C/N média de 73, valor este superior ao exigido para crescimento microbiano, ou seja, em torno de 20. Além disso, Xing et al. (2000) reportam que as variações

na razão C/N dos meios de cultivo resultam em diferentes taxas de incorporação de carbono e nitrogênio nas células. Em outro trabalho, Queiroz et al., (2003) estabelecem que a maior remoção de nitrogênio por *Aphanothece microscopica* Nägeli ocorre na razão C/N de 50 e N/P de 1,98. Os autores enfatizam que estes parâmetros devem ser ajustados para manter a eficiência da batelada. De acordo com a Tabela 5.2, a amostra de vinhaça utilizada nos experimentos anteriores sem tratamento físico-químico apresentou razão C/N de 37,9. Nesse sentido, pode-se dizer que o tratamento da vinhaça com Ca(OH)_2 reduziu a relação C/N para 20,3 pela separação das formas insolúveis de carbono do meio, mostrando que, do carbono total da vinhaça bruta, apenas 57,1% estava solúvel e prontamente disponível para consumo, o que é importante para o cultivo heterotrófico desta microalga.

O teor de fósforo na vinhaça durante o cultivo sofreu uma discreta elevação (Figura 5.29), devido provavelmente à liberação deste nutriente de parte da matéria orgânica consumida, concordando com o período de maior consumo de carbono (Figura 5.28). Com isso, a razão N/P do meio cai de aproximadamente 7,4 para 5,4. Ainda assim, a razão N/P é superior a outros trabalhos envolvendo microalgas e cianobactérias em efluentes (Xing et al, 2000; Queiroz et al., 2003; Queiroz et al., 2007), embora a vinhaça após o tratamento com Ca(OH)_2 apresente um valor muito abaixo do encontrado para a amostra bruta (Tabela 5.2). Desta forma, sugere-se que a adição de Ca(OH)_2 tenha reduzido o teor de nitrogênio via separação de matéria orgânica coloidal, ao mesmo tempo em que disponibilizou parte do fósforo ligado às moléculas orgânicas. Com isso, diferentemente de outras pesquisas da literatura (Martínez et al, 2000), não foi possível avaliar a remoção de fósforo do meio, uma vez que durante o cultivo pode ter havido consumo e biodisponibilização deste nutriente.

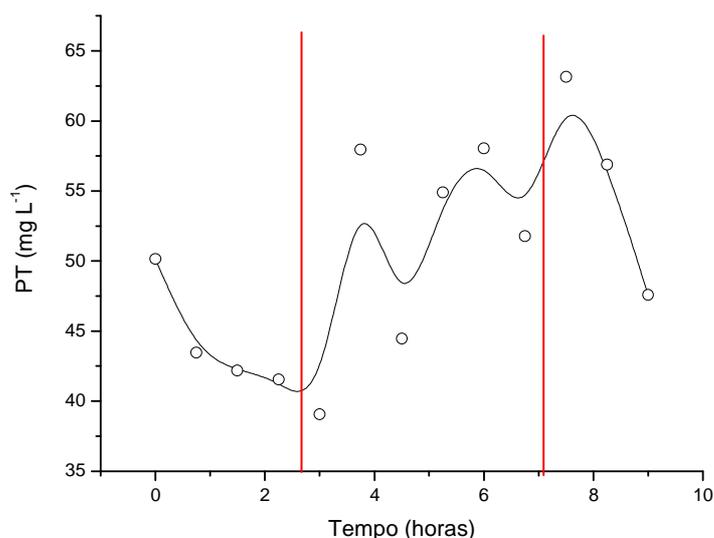


Figura 5.29: Perfil de fósforo total (PT) durante o cultivo de *D. subspicatus* com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH)₂ e autoclavada

A composição da biomassa final foi similar àquela encontrada nos experimentos com vinhaça bruta, ou seja, com 14,9% de lipídios, 50,0% de proteínas e 35,1% de carboidratos (por diferença). De acordo com estes resultados, o teor de fósforo não teve influência na composição química da biomassa gerada. Além disso, a menor razão C/N pode ter intensificado o crescimento, mas não influenciou na fração protéica e lipídica. De acordo com a literatura, o teor de proteína é muito influenciado pela quantidade de nitrogênio no meio. Entretanto, estes resultados indicam que não só a quantidade, mas a disponibilidade maior de nitrogênio pode levar a um crescimento maior das microalgas, com manutenção no teor de proteínas.

As velocidades médias de consumo de TOC, NT e PT ao longo de 9 horas, foram de 50,9, 4,3 e 0,06 mg.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente, com rendimentos de 0,45, 5,39 e 364,4 mg.mg⁻¹ dos citados nutrientes em biomassa.

De acordo com a Figura 5.27, analisando os três diferentes períodos na curva de crescimento, verifica-se que a produtividade máxima de biomassa inicial foi de 95,4 mg.L⁻¹.h⁻¹, com um $\mu_{\text{máx}}$ de 0,061 h⁻¹ concomitante à

uma discreta variação na contagem de *D. subspicatus* (Figura 5.30). Em um segundo momento (entre 3 e 7 horas), a produtividade máxima de biomassa foi 66,2 mg.L⁻¹.h⁻¹, com $\mu_{\text{máx}}$ de 0,038 h⁻¹, concomitante a um aumento mais expressivo na contagem de *D. subspicatus*. No período final (após 7 horas), não houve produtividade de biomassa e crescimento expressivo.

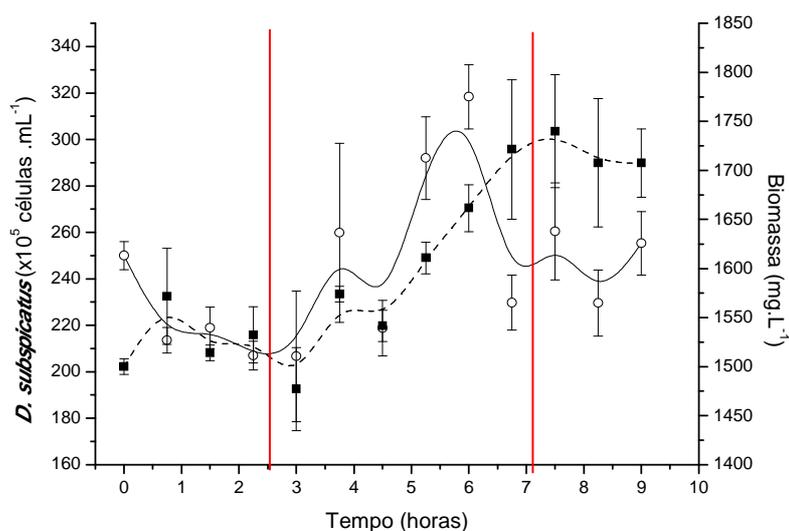


Figura 5.30: Curvas de contagem de *D. subspicatus* (○) e crescimento em termos de biomassa(■) com a divisão entre os três períodos observados (|) no ensaio em vinhaça tratada com Ca(OH)₂ e autoclavada

Considerando estas variações de crescimento e assimilação de substratos, a figura 5.31 ilustra a diferença de consumo e rendimento durante o cultivo. Observa-se que nas primeiras horas houve um rendimento de carbono em biomassa elevado, que deveu-se principalmente pelo menor consumo, o que se inverteu no segundo período.

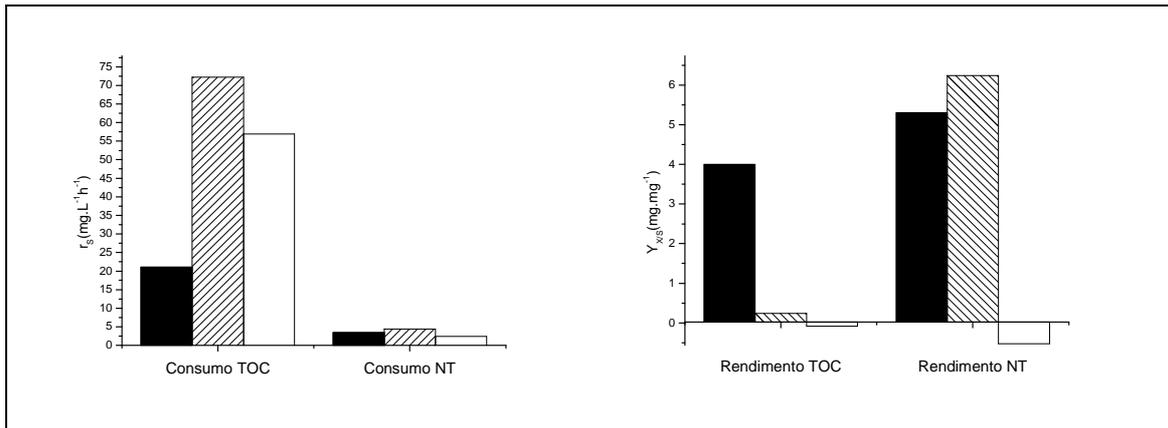


Figura 5.31: Ilustração da diferença entre as taxas de consumo (r_s) e rendimento ($Y_{x/s}$) entre os períodos 1 (■), 2 (▨) e 3 (□).

Observou-se que durante o período 1 o consumo de TOC obteve um rendimento em biomassa maior que no período 2, que se deveu provavelmente a um acúmulo de material de reserva na mesma, o que se fundamenta no fato da baixa multiplicação celular concomitantemente ao aumento na biomassa e se confirma pela observação de uma menor velocidade de consumo de NT e seu consequente rendimento em biomassa no primeiro período em relação ao segundo.

No segundo período foi observado um aumento na velocidade de consumo de TOC com baixo rendimento em biomassa, a partir dos 45 minutos seguintes ao primeiro sinal de multiplicação celular de *D. subspicatus*, o que aponta para o acúmulo de material de reserva pelas células recém geradas concomitantemente ao consumo deste nutriente relacionado com o gasto energético para a continuidade da multiplicação celular.

O aumento também na velocidade de consumo de NT deveu-se provavelmente à fase de duplicação do material celular das células em processo de multiplicação.

O terceiro período apresentou um aumento nas velocidades de consumo de TOC e NT, porém um rendimento nulo por conta da estagnação da concentração de biomassa no meio. Essa observação, juntamente com uma comparação entre as curvas de concentração celular de *D. subspicatus* e biomassa sugere que, mesmo em processo de acumulação de material de

reserva pelas células recém multiplicadas, as velocidades de crescimento e degradação da biomassa se igualaram.

A diminuição da concentração de *D. subspicatus* entre os períodos 2 e 3 sem a diminuição da biomassa (apenas estagnação do crescimento) evidencia uma relação mais direta entre o acúmulo de material de reserva e o crescimento da biomassa do que entre o processo de multiplicação celular e esse último.

Dessa forma, atividade heterotrófica da *D. subspicatus* pode ser comprovada não só por sua multiplicação celular em período escuro, mas também na continuação do consumo de nutrientes após o fim da multiplicação. Consumo esse que se reflete em uma continuidade no aumento da concentração de biomassa 45 minutos após o decréscimo da curva de concentração de *D. subspicatus* (como se observa na figura 5.29), provavelmente relacionado ao acúmulo de material de reserva após o período proliferativo.

A menor geração celular durante entre os períodos 2 e 3, bem como o equilíbrio encontrado na concentração celular após esse momento podem estar relacionados com o estresse causado pelo início da fase exponencial da contaminação por outros organismos heterotróficos a partir de 5 horas, como se pode observar na figura 5.32, onde se apresentam as curvas de desenvolvimento da concentração celular de *D. subspicatus* sobre a curva de concentração dos contaminantes.

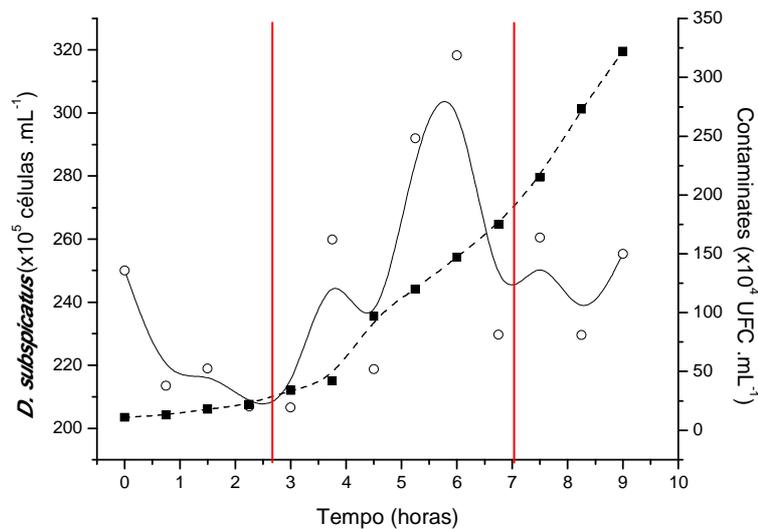


Figura 5.32: Desenvolvimento das concentrações de *D. subspicatus* (○) e dos organismos contaminantes (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e autoclavada

Pode-se notar uma ordem de grandeza 10 vezes menor entre a concentração dos contaminantes e a de *D. subspicatus* durante as 9 horas de ensaio. Além disso, seu desenvolvimento foi exponencial ao longo do período, diferentemente das curvas de biomassa e concentração de *D. subspicatus*. Nesse sentido, as observações realizadas em termos quantitativos de biomassa tiveram pouca ou nenhuma interferência dos organismos contaminantes.

Apesar da grande velocidade de crescimento das bactérias na vinhaça, sua contabilização sobre a curva de crescimento em termos de massa é desprezível, restringindo o impacto de seus efeitos durante as 9 horas de cultivo apenas ao consumo de substratos e concentração de gases dissolvidos (Figura 5.33).

Cabe ressaltar que a contaminação é uma das principais desvantagens citadas nos cultivos heterotróficos de microalgas (Perez-Garcia et al., 2011). Apesar disto, os trabalhos sobre a produção de biomassa nestes sistemas a partir de efluentes geralmente não avaliam quantitativamente este efeito e a abordagem apresentada por este trabalho é inovadora neste sentido. Até

mesmo por estas questões é que as pesquisas costumam apontar os mais diversos resultados de produtividade de biomassa para uma mesma espécie de micro-organismo.

A figura 5.33 apresenta a evolução do consumo de O_2 e aumento na produção de CO_2 ao longo das 9 horas bem como a evolução do pH em comparação com o desenvolvimento de *D. subspicatus*.

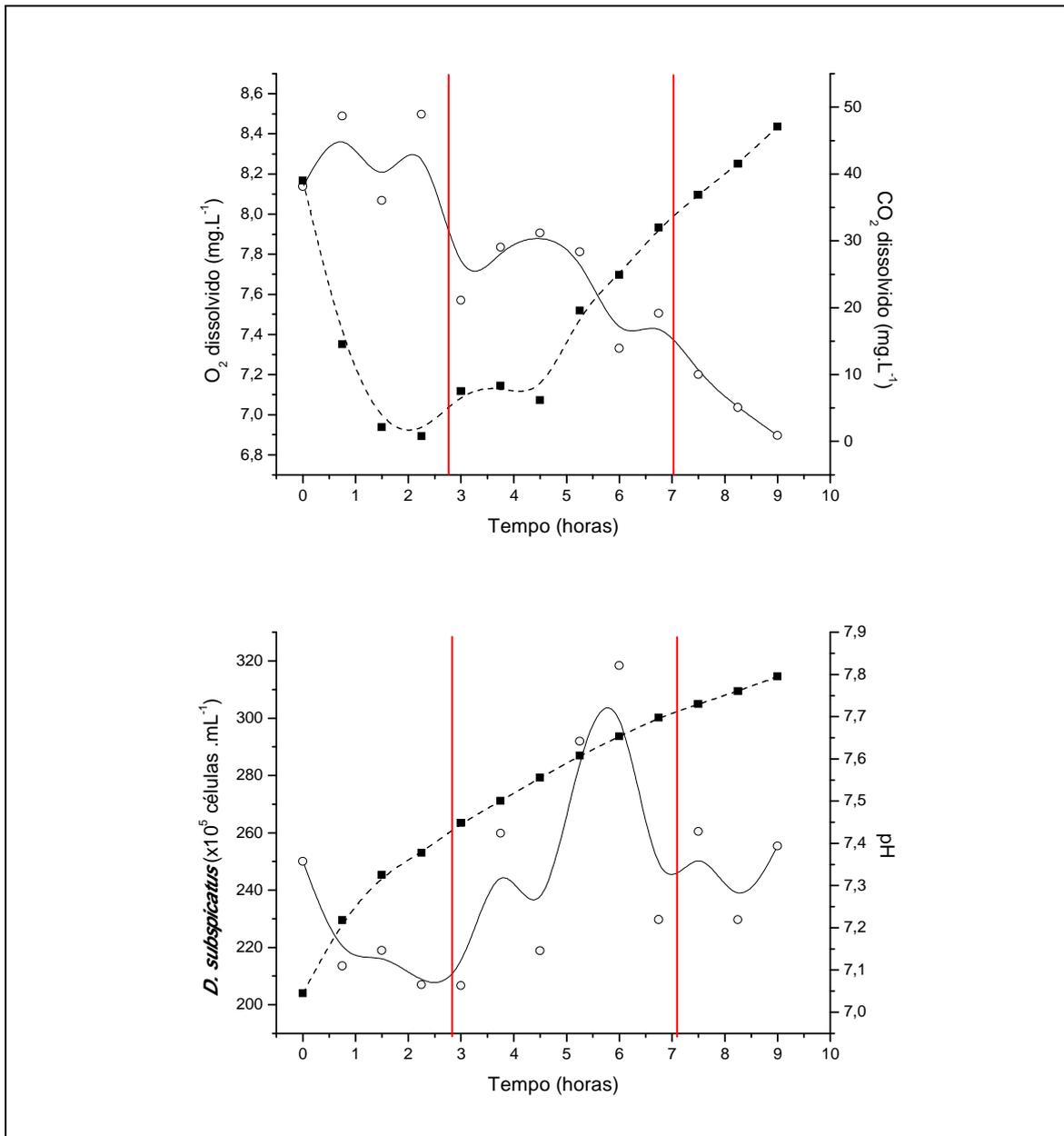


Figura 5.33: Evolução no consumo dos gases O_2 (○) e CO_2 (■) e evolução do pH (■) com o desenvolvimento de *D. subspicatus* (○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio em vinhaça tratada com $Ca(OH)_2$ e autoclavada

Os resultados apresentados na Figura 5.33 indicam uma depleção do CO₂ dissolvido no meio nas primeiras horas, provavelmente relacionada à aeração forçada e pela baixa atividade celular verificada neste período. Esta tendência se inverteu nos demais períodos, concomitantemente à fase de multiplicação celular de *D. subspicatus*. O consumo praticamente nulo de O₂ no início também se deve à baixa atividade celular, o que variou no decorrer do cultivo. De qualquer forma, a concentração mínima ficou em torno de 6,8 mg.L⁻¹, valor este muito superior ao crítico, que poderia levar a condições limitantes e consumo de primeira ordem. Além disso, o considerável aumento no teor de CO₂ no meio a partir de 5 horas também pode estar relacionado ao aumento da contaminação por outros micro-organismos heterotróficos neste período, como pode-se verificar na figura 5.32.

A Figura 5.33 também apresenta a discreta variação do pH do meio. O aumento deste parâmetro nas primeiras horas está provavelmente ligado à depleção do CO₂ do meio, sendo que a continuidade no aumento do pH está muito possivelmente relacionada ao transporte ativo de nutrientes por *D. subspicatus* em seu processo de desenvolvimento, como sugerido nas discussões anteriores para os ensaios com vinhaça bruta.

As constatações obtidas com esses resultados permitem afirmar que o aumento da biomassa durante as 9 horas deveu-se principalmente ao acúmulo de material intracelular por *D. subspicatus*, devendo-se apenas secundariamente à multiplicação celular desta microalga durante o ensaio. Entretanto, a pesar da variação calculada utilizando-se apenas os pontos inicial e final da concentração de *D. subspicatus* ao longo de 9 horas ser praticamente nula, as fases de multiplicação e consumo de nutrientes verificadas confirmam a capacidade heterotrófica desta microalga, que se mostrou em fase de adaptação à vinhaça ao longo do ensaio.

Em comparação com os resultados obtidos no ensaio de 9 horas com vinhaça bruta centrifugada e esterilizada, foi possível observar uma velocidade máxima de crescimento, e conseqüentemente uma produtividade, aproximadamente 50% menor no ensaio com vinhaça tratada com Ca(OH)₂.

Entretanto, o consumo de TOC chegou a ser 9 vezes maior, bem como o consumo de NT (2 vezes maior) neste ensaio em comparação com aquele com vinhaça bruta.

Apesar da discrepância entre os dois ensaios em termos de produtividade e consumo de substrato, a composição da biomassa ao final de 9 horas foi praticamente a mesma entre os dois ensaios.

Tais observações sugerem uma interferência de altas concentrações do íon Ca^{2+} no acúmulo de material intracelular por *D. subspicatus*, porém não tanto à sua proliferação, uma vez que a variação máxima da concentração celular em ambos os ensaios foi praticamente a mesma (apesar de terem ocorrido em períodos diferentes).

5.3.3 Ensaio com vinhaça tratada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e autoclavada.

A figura 5.34 apresenta a curva de crescimento da biomassa no reator ao longo do ensaio de 9 horas.

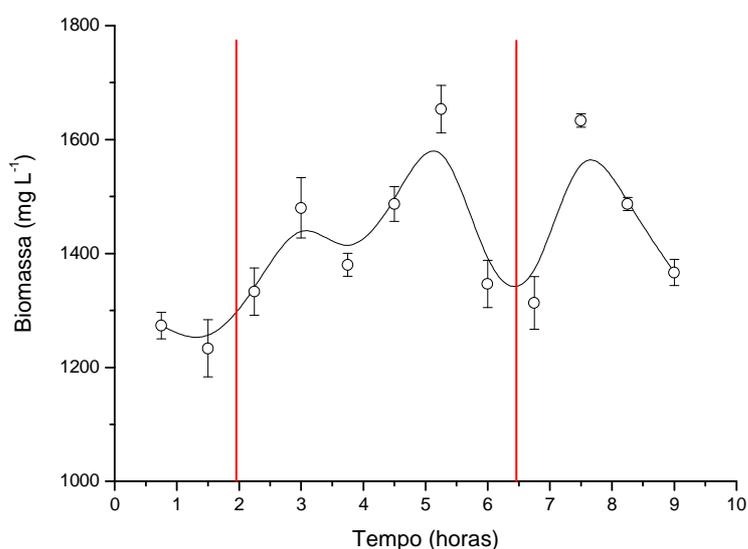


Figura 5.34: Curva de crescimento da biomassa com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e autoclavada

Foi possível observar uma fase de diminuição da concentração de biomassa de 1,5 hora (período1), duas fases de crescimento consecutivas em um período de 3,75 horas (período 2), seguidas de uma fase de degeneração após 5,25 horas (período 3).

Durante o período de crescimento mais intenso, o $\mu_{\text{máx}}$ médio ficou em torno de $0,11 \text{ h}^{-1}$, com uma variação de 420 mg.L^{-1} . A ocorrência de duas fases de crescimento separadas por um período de adaptação pode indicar a presença de mais de um substrato limitante, geralmente diversas fontes de carbono, o que é comum quando se trabalha com águas residuárias, mas também a presença de células em diferentes períodos proliferativos e mesmo de uma característica fisiológica da espécie (se considerarmos os agrupamentos naturais desse gênero em número de 4 células por “indivíduo”).

Apesar desta característica, os períodos de adaptação da microalga foram discretos, sugerindo que a vinhaça estava adequada para o cultivo microbiano e que muito possivelmente esse fenômeno, que se repetiu em todos os experimentos, esteve relacionado a características intrínsecas de *D. subspicatus*.

A composição da biomassa observada ao final do ensaio foi de 11,2% lipídios, 46,6% proteínas e 42,2% carboidratos, e mostrou-se, em parte, diferente daquela observada nos ensaios com vinhaça bruta e tratada com Ca(OH)_2 , possivelmente pelo estresse causado pela presença do íon Al^{3+} no meio.

O consumo de nutrientes foi baixo durante as 9 horas (Figura 5.34) e, de acordo com o perfil de TOC, foi obtida uma taxa de consumo de ordem zero de $45,7 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto para NT uma taxa de $7,4 \text{ mg.L}^{-1}$. Apesar das condições não limitantes do meio, as taxas de consumo foram inferiores ao experimento com vinhaça tratada com Ca(OH)_2 (123 e $8,4 \text{ mg.L}^{-1}$ para TOC e NT, respectivamente), o que pode ser possivelmente explicado também pelo estresse causado pela presença do íon Al^{3+} .

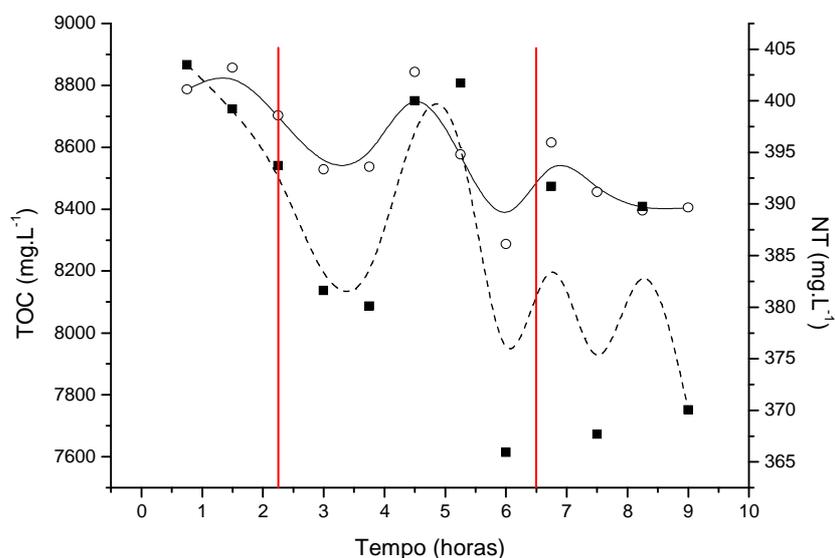


Figura 5.35: Curva de consumo de nutrientes. TOC (○), NT (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e autoclavada

Com a finalidade de compreender o comportamento do consumo de nutrientes, a figura 5.36 apresenta a curva de concentração celular de *D. subspicatus* sobre as curvas de consumo de TOC e NT, cuja análise de desenvolvimento concomitante com as velocidades de consumo e rendimento tenta elucidar as razões das oscilações na concentração desses nutrientes.

A produtividade média de células entre as 0,75 e 7,5 horas foi de $6,15 \times 10^5$ células.mL⁻¹.h⁻¹, com produtividade de biomassa de 37,7 mg.L⁻¹.h⁻¹ e velocidades de consumo de 49,2 e 5,3 mg.L⁻¹.h⁻¹ de TOC e NT respectivamente com rendimentos de 0,12 e 1,15 mg.10⁻⁵ células.mL⁻¹ destes nutrientes em células e 1,1 e 11,2 mg.mg⁻¹.L⁻¹ dos mesmos em biomassa.

No início do segundo período (2a), quando as concentrações de TOC e NT iniciaram seu declínio, observou-se o primeiro ponto de crescimento da biomassa, concomitante a um decréscimo na concentração celular de *D. subspicatus* a uma velocidade de $21,2 \times 10^5$ células.mL⁻¹.h⁻¹, o que parece sem sentido, porém como discutido nos ensaios com vinhaça bruta e tratada com Ca(OH)₂, pode estar ligado à fase de acumulação de material intracelular pelas células recém multiplicadas.

Ainda no segundo período da curva de crescimento de biomassa foi possível observar um patamar onde a concentração de biomassa oscilou antes de voltar a crescer. Neste momento, entre as 3 e 4,5 horas, observou-se o aumento nas concentrações de TOC e NT a velocidades de 210 e 12,3 mg.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente com pouca oscilação da concentração de biomassa, porém concomitante a uma fase de multiplicação celular de *D. subspicatus* de velocidade $24,6 \times 10^5$ células.mL⁻¹.h⁻¹.

Justifica o aumento nas concentrações de TOC e NT concomitantemente à multiplicação celular de *D. subspicatus* a mesma suposição afirmada na discussão dos ensaios com vinhaça bruta e tratada com Ca(OH)₂, de que possivelmente as células que encontraram dificuldades ao multiplicar-se tenham rompido-se liberando o seu conteúdo no meio alterando assim as concentrações de nutrientes do mesmo.

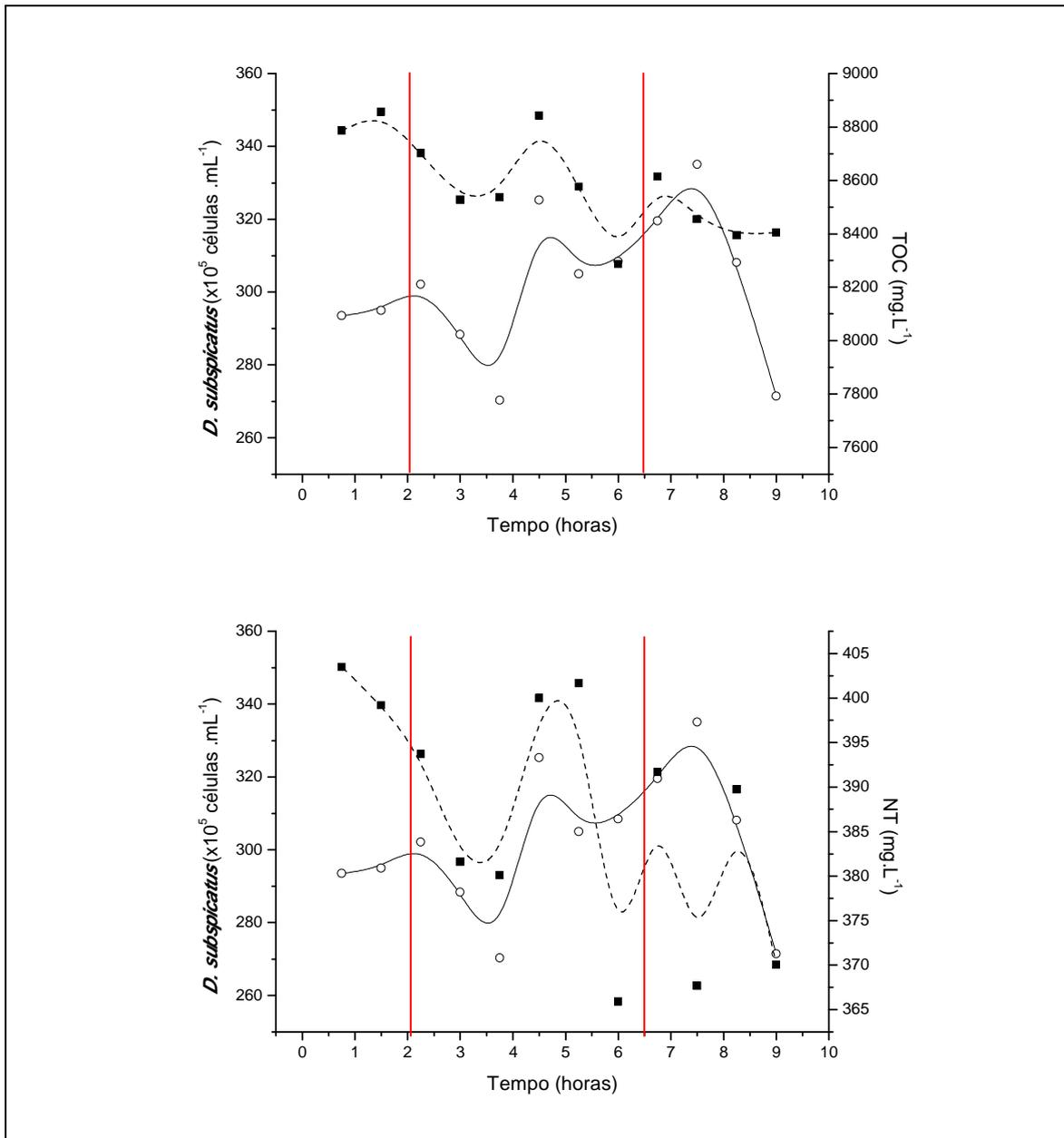


Figura 5.36: Comportamento das concentrações de TOC e NT(■) em comparação com o desenvolvimento de *D. subspicatus*(○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e autoclavada

A partir do patamar de concentração alcançado ao final da primeira fase de crescimento da biomassa (período 2a) observou-se uma segunda fase de crescimento (período 2b) com velocidade de $182,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, porém

concomitante a uma estagnação do crescimento da concentração celular de *D. subspicatus*.

Após o período 2b e antes do período 3, foi possível observar uma diminuição da concentração de biomassa a uma velocidade de $226 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ concomitante a um modesto aumento na concentração celular de *D. subspicatus* em velocidade de $7,5 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com μ_{max} de $0,02 \text{ h}^{-1}$ durante 1,5 hora. Nesse período a velocidade de consumo de TOC foi nula (por ter sido observado um aumento de sua concentração no meio) e a de NT foi de $6,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (relativamente baixa por questão de um “quase equilíbrio” entre as velocidades de liberação e consumo deste nutriente no meio).

O período 3 iniciou-se com um súbito aumento na concentração da biomassa concomitantemente ao fim da fase de multiplicação celular de *D. subspicatus* (período 3a). A produtividade de biomassa nesse instante foi de $426,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com μ_{max} de $0,26 \text{ h}^{-1}$. As velocidades de consumo de TOC e NT foram de $213,3$ e $32,1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com rendimentos de $2,0$ e $13,3 \text{ mg.mg}^{-1}.\text{L}^{-1}$ desses nutrientes em biomassa.

A comparação entre as velocidades de consumo de TOC e NT e seus rendimentos em biomassa para três períodos observados na curva de crescimento pode ser verificada na figura 5.37.

Pode-se observar que o rendimento de carbono em biomassa foi praticamente constante durante todo o cultivo, apenas das variações no consumo, o que indicam um crescimento equilibrado nestas condições.

Sobre a velocidade de consumo de NT, foi possível notar um aumento ao longo do tempo com sua nulidade no período 1 e um aumento progressivo até o período 3a até tornar-se nula novamente em 3b. Assim como a velocidade de consumo, o rendimento em biomassa deste nutriente aumentou ao longo do tempo, sendo praticamente idêntico entre os períodos 2a e 2b, porém duas vezes maior que nestes no período 3a.

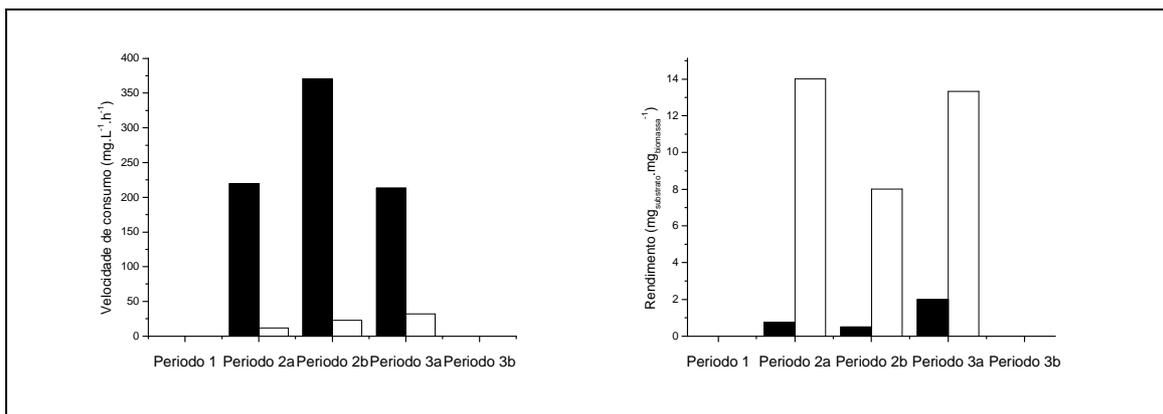


Figura 5.37: Ilustração da diferença entre as velocidades de consumo e rendimento de TOC (■) e NT (□) em biomassa entre os períodos 1, 2 e 3 no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e autoclavada

Apesar de parecerem baixas, tais oscilações na concentração de NT do meio refletem muito bem os eventos de lise celular e produção de biomassa pelas células de *D. subspicatus*, uma vez que a relação teórica entre NT e proteínas é de 6,25, e indica uma magnitude 6,25 vezes maior de qualquer variação neste parâmetro quando pensada em termos de proteínas e consequentemente em biomassa.

Após a última fase de crescimento, verificou-se a diminuição da concentração da biomassa (período 3b) com velocidade de $177,8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, concomitantemente a uma diminuição da concentração celular de *D. subspicatus* com velocidade de $42,4 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$, porém com variação nula nas concentrações de TOC, NT e PT, possivelmente causada pelo consumo crescente de nutrientes pelo aumento da concentração dos organismos contaminantes com velocidade de $9,0 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$, como se pode observar na figura 5.38.

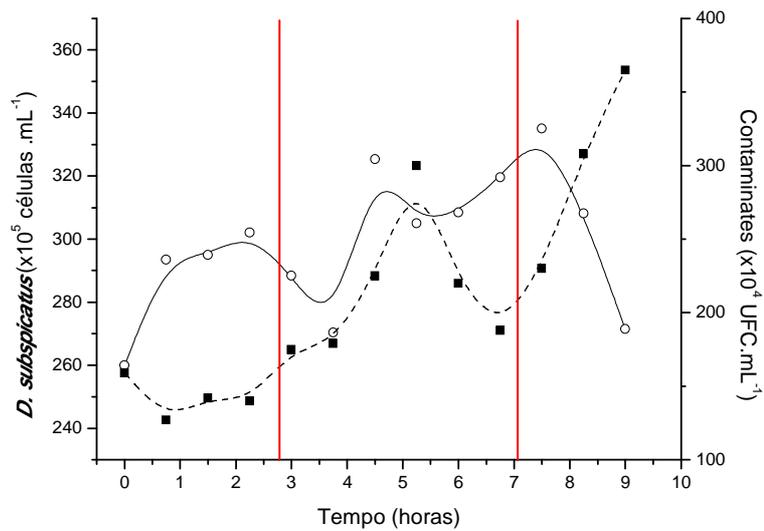


Figura 5.38: Desenvolvimento das concentrações de *D. subspicatus* (○) e dos organismos contaminantes (■) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e autoclavada

Pode-se notar uma ordem de grandeza 10 vezes menor entre a concentração dos contaminantes e a de *D. subspicatus* durante as 9 horas de ensaio, e que seu desenvolvimento foi exponencial ao longo do período, diferentemente das curvas de biomassa e concentração de *D. subspicatus*. A afirmação de um possível estresse de *D. subspicatus* pela presença de contaminantes só pode ser considerada para o final do ensaio, onde claramente foi possível observar a redução da concentração microalgal concomitantemente ao avanço da contaminação.

A figura 5.39 apresenta a evolução do consumo de O_2 e o aumento na produção de CO_2 ao longo das 9 horas, bem como a evolução do pH em comparação com o desenvolvimento de *D. subspicatus*.

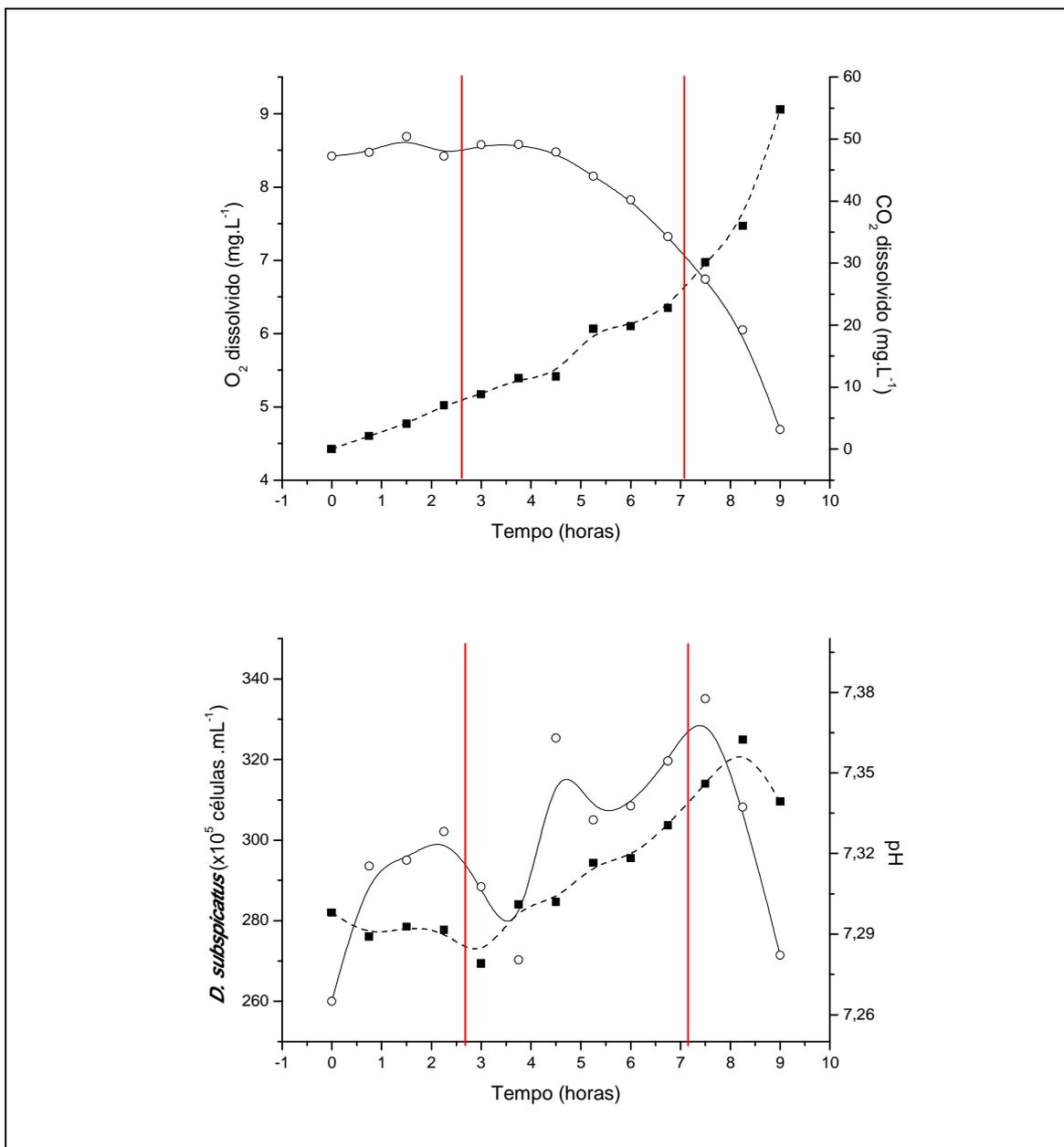


Figura 5.39: Evolução no consumo dos gases O₂ (○) e CO₂ (■) e evolução do pH (■) com o desenvolvimento de *D. subspicatus* (○) com a divisão entre os três períodos observados (I) no ensaio de 9 horas com vinhaça tratada com Al₂(SO₄)₃ e autoclavada

Foi possível observar que a velocidade de consumo de O₂ até as 4,5 horas manteve-se igual ou menor que a velocidade de alimentação deste gás no reator por meio da aeração, observação essa que se fundamenta na variação nula deste parâmetro durante esse período. A partir deste momento a velocidade de consumo passou a aumentar exponencialmente até atingir a

velocidade de $1,81 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ somada à velocidade de dissolução do O_2 borbulhado ao meio.

O consumo praticamente nulo de O_2 durante as 4,5 primeiras horas de ensaio, concomitantemente à primeira fase de multiplicação celular de *D. subspicatus* e ao primeiro pico de crescimento da biomassa sugere a pouca necessidade de oxigenação do meio para o desenvolvimento heterotrófico dessa microalga. O aumento do consumo principalmente a partir das 4,5 horas, quando a biomassa atingiu seu maior pico de crescimento, aponta que a necessidade de O_2 é maior após a fase de acúmulo de material intracelular, quando as células passam a consumir o material de reserva acumulado para o desempenho de suas funções celulares.

O aumento no consumo de O_2 e produção de CO_2 principalmente na segunda metade do ensaio, notavelmente no período 3, também pode estar fortemente relacionado com o aumento da concentração de organismos contaminantes já que, mesmo com a diminuição das concentrações de *D. subspicatus* e de biomassa, o aumento no consumo de O_2 e produtividade de CO_2 continuou crescente, juntamente com o avanço da contaminação.

Com relação ao pH, observou-se uma variação quase nula deste parâmetro ao longo das 9 horas de ensaio.

A Tabela 5.8 resume os parâmetros cinéticos obtidos para os cultivos de *D. subspicatus* em vinhaça bruta e tratada com Ca(OH)_2 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

De acordo com os dados, verifica-se um crescimento e produtividade levemente superior para o cultivo em vinhaça bruta quando comparado com vinhaça tratada com alumínio. Apesar disto, a amostra tratada com cálcio apresentou as maiores taxas de consumo de carbono e nitrogênio, não necessariamente sendo convertido em biomassa, haja vista as baixas produtividade e $\mu_{\text{máx}}$.

Tabela 5.8: Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos durante o cultivo de *D. subspicatus* em diferentes condições de tratamento da vinhaça

Parâmetro	Vinhaça Bruta	Vinhaça tratada com Ca(OH) ₂	Vinhaça tratada com Al ₂ (SO ₄) ₃
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,054	0,02	0,041
r_{TOC} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	14,3	123,3	45,7
r_{NT} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	4,26	8,6	7,4
Produtividade máxima (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	71,1	37,7	53,3
Teor de proteína na biomassa (mg.100 mg ⁻¹)	49,1	50	46,6
Teor de lipídios na biomassa (mg.100 mg ⁻¹)	14,4	14,9	11,2
Produtividade protéica (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	825,6	453,6	595,2
Produtividade lipídica (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	244,8	134,8	143,3

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica de crescimento máxima; r_{TOC} : taxa de consumo de carbono total; r_{NT} : taxa de consumo de nitrogênio total

Além disso, a composição em termos de proteínas e lipídios apresentou-se praticamente constante. Com isso, pode-se sugerir que, em termos de produção de biomassa, tanto vinhaça bruta como tratada com Al₂(SO₄)₃ seriam recomendadas, sendo que o tratamento físico-químico elevaria a remoção de carbono e nitrogênio. Por outro lado, pensando em termos de aplicação na despoluição da vinhaça, o tratamento com Ca(OH)₂ permitiria uma remoção maior da matéria orgânica, devido ao crescimento equilibrado (fase exponencial mantida por mais tempo), com a razão C/N do meio praticamente constante durante todo o período.

Analisando os resultados em termos de produtividade protéica e lipídica, nota-se que, comparando os dados com a Tabela 5.1, houve uma otimização do cultivo de *D. subspicatus* em vinhaça. Nos ensaios preliminares foram obtidas produtividades em termos de proteínas e lipídios em torno de 291 e 69 mg.L⁻¹.dia⁻¹, valores estes compatíveis com a literatura para produção de biomassa em sistemas fotoautotróficos convencionais com meio de cultivo padrão (Miao e Wu, 2006; Chisti, 2007). Após otimização de tempo de batelada e tratamento da vinhaça, a produtividade em proteínas elevou-se para 825,6 e em lipídios para 244,8 mg.L⁻¹.dia⁻¹ com vinhaça bruta.

De qualquer forma, para todas as condições de tratamento da vinhaça os valores de produtividade lipídica são inferiores apenas àqueles indicados para *Chlorella protothecoides*, microalga amplamente citada na literatura devido ao seu elevado teor inicial de lipídios. Desta forma, a otimização da produção de biomassa sugere a viabilidade de cultivo da microalga *D. subspicatus* em vinhaça, tanto para aproveitamento da sua fração protéica como lipídica.

6. Conclusões

Nas diferentes condições experimentais, foi possível concluir que:

- tanto pH como aeração apresentam pouca influência no cultivo da microalga clorofícea *Desmodesmus subspicatus* em biorreator de bancada com vinhaça;

- o tempo em batelada ideal para este tipo de cultivo é em torno de 9 horas, minimizando os efeitos da contaminação bacteriana sobre o crescimento da biomassa;

- o tratamento físico-químico com $Al_2(SO_4)_3$ foi mais eficiente em termos de remoção da DQO do que utilizando cal extinta, sendo obtidas remoções máximas de DQO na faixa de 40 a 60%;

- as produtividades em termos de proteínas e lipídios para *D. subspicatus* em vinhaça bruta e tratada com $Al_2(SO_4)_3$ são superiores aos valores citados na literatura;

- pode-se afirmar que é viável o cultivo heterotrófico de *D. subspicatus* em vinhaça para produção de proteínas ou lipídios.

7. Sugestões

Considerando os resultados obtidos, sugere-se para continuidade dos trabalhos deste grupo de pesquisa:

- estudar as etapas de *downstream*, ou seja, a separação da biomassa produzida em vinhaça e extração das proteínas e lipídios microalgais;
- avaliar ensaios em escala piloto de *D. subspicatus* em vinhaça;
- avaliar cultivos de outras microalgas e cianobactérias em vinhaça para produção de proteínas e lipídios;
- identificar os contaminantes mais comuns e determinar a razão entre a contagem de unidades formadoras de colônias e a biomassa desses contaminantes.

8. Referências bibliográficas

- ABOU-SHANAB, R.A.I.; JI, M.K.; KIM, H.C.; PAENG, K.J.; JEON, B.H. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. **Journal of Environmental Management**, v.115, p.257-264, 2013.
- ALAHARI, A.; BALLAL, A.; APTE, S.K. Regulation of potassium-dependent Kdp-ATPase expression in the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena torulosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p.5778 – 5781. 2001.
- ALVA, M.S.; LUNA-PABELLO, V.M.; CADENA, E.; ORTÍZ, E. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. **Biosource Technology**, no prelo, 2013.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21^o ed., 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS—AOAC (1995). Official Methods of Analysis. Washington, 1141p.
- BASTOS, R.G.; MATTOS, L.F.A.; DESSIA, V.C. GOLDEMBERG, S.; DA SILVA, D. Heterotrophic growth of *Desmodesmus subspicatus* using sugarcane vinasse in batch stirred reactor. Proceedings of Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Elsevier. San Diego, CA, Estados Unidos, 2012.
- BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I. Consumo e transferência de oxigênio no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, Brasil, 2008.
- BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I., ALMEIDA, R.V., ALMEIDA, T.L., BENERI, R.L.; PADILHA, M. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parbilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Revista da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES)** v.9 (2), p. 112-116. 2004.
- BASTOS, R.G.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; QUEIROZ, M.I. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscópica* nagélii. **Revista Ambiente & Água**, v.5(3), p.258-264, 2010.
- BASTOS, R.G.; SILVA, M.A.; RIGO, M.; VEIGA, G. E QUEIROZ, M.I, Growth of cyanobacteria *Aphanothece* sp. on exogenous sugars. **Bioscience Journal**. v. 27, p. 156-161, 2011.
- BERRY, S.; ESPER, B., KARADANSHOVA, I., TEUBER, M., ELANSKAYA, I., RÖGNER, M.; HAGEMANN, M. Potassium uptake in the cellular cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mainly depends on a ktr-like system encoded by slr1509(ntpJ). **FEBS Letters**, v. 548, p.53-58, 2003.
- BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K.C. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3425-3431, 2011.
- BLIGH, E.G.; DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BONINI, M. de A. Cultivo de *Aphanotece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça. Araras: UFSCAR, 2012. 112p. Dissertação Mestrado

- BOROWITZKA, M. Algae as food, In: Microbiology of fermented foods, Blackie Academic & Professional, pages 585 – 602, 1998.
- CHEN, C.; YEH, K.; AISYAH, R.; LEE, D.; CHANG, J. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, Vol.102, p. 71-81, 2011.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25(3), p. 294–306, 2007.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar, safra 2012/2013: Quarto levantamento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_30_34_boletim_cana_portugues_abril_2013_4o_lev.pdf (acessado em:14/10/2013), 2013.
- CORBI, J. J.; STRIXINO, S. T.; SANTOS, A. do; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, v.29, n.1, p. 61-65, 2006.
- DE-BASHAN, L. E. 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.
- DEWOLF, J.; DEMPSEY, B.; TAYLOR, M.; POTTER, J. Guidance Manual for Coagulant Changeover. Denver: AWWA Research Foundation e American Water Works Association, 2003. 185 p.
- DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press, 439p., 1995.
- DORAN, P.M. Bioprocess Engineering Principles. **Academic Press**. 1995.
- DUMAS, A.; LALIBERTÉ, G.; LESSARD, P.; DE LA NOÛE, J. Biotreatment of fish farm effluents using cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacultural Engineering*, v. 17, p.57-68.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13. p.113-125, 2003.
- FALCÃO, A. A. análises químicas de resíduos sólidos ára estudos agroambientais. Campinas: UNICAMP 2005. 98p. Dissertação Mestrado
- FARGASOVA, A.; ONDREJKOVICOVÁ, I.; KRAMAROVÁ, Z.; FÁBEROVÁ, Z. Changes in physiological activity of algae *Desmodesmus quadricauda* after active bioaccumulation of newly prepared and characterized Fe(III) complexes with pyridine-3-carboxamide (pca) by living algal cells. **Biosource Technology**, v.101, p.6410-6416, 2010.
- FAY, P. (1983) *The blue-greens (Cyanophyta-cyanobacteria)*. Ed. Edward Arnold Publishers, 5ª ed., London, 88p., 1998.
- FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiological Reviews**, v.56 (2), p.340-373, 1992.
- FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiological Reviews**, v.56 (2), p.340-373, 1992.
- FAY, P. *The blue-greens (Cyanophyta – Cyanobacteria)*. **Edward Arnold Publishes**. London, 1983.
- FELICI, E.M. Coagulação-floculação-sedimentação como pós-tratamento de efluente de sistema biológico em batelada aplicado a lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos. Londrina: UEL, 2010. 138p. Dissertação mestrado.

- FERREIRA, P. M. P. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. Instituto Nacional de Recursos Biológicos: IPIMAR, 2009. 239p.
- FLORES, E.; HERRERO, A. Assimilatory Nitrogen Metabolism and Its Regulation. In: BRYANT, D.A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. **Kluwer Academic Publishers**. p. 409-435, 1994.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. Vinhaça de cana-de-açúcar. 1.ed. **Livraria e Editora Agropecuária**: Piracicaba, 2000. 203p.
- GALACTION, A.I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C. & TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactor for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 84-94, 2004.
- GALACTION, A.I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactor for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 84-94, 2004.
- GANTZER, C.J.; MAIER, W.J. Biological degradation of cyanide by nitrogen-fixing cyanobacteria. In: Hazardous Waste Engineering Research Laboratory – Department of Civil and Mineral Engineering, University of Minnesota, USA, 55p, 1988.
- GAO, X.; LIU, Y.; CHEN, Z.; WU, L. Rapid screening and cultivation of oleaginous microorganisms. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.50, p. 282-289, 2012.
- GIORDANO, G. Tratamento e controle de efluente industriais. Disponível em: <http://www.cepuerj.uerj.br/insc_online/itaguai_2011/edital/superior/biologo/Apostila%20-%20Tratamento%20de%20efluentes%20industriais.pdf> Acessado em: 25/08/2012.
- GONÇALVES, C. A. S.; SILVA, E. L. Tratamento físico-químico da vinhaça. Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2000.
- GONZALES, L. E.; CANIZARES, R. O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v.60, p.259-262, 1997.
- GROSSMAN, A.R.; SCHAEFER, M.R.; CHIANG, G.G.; COLLIER, J.L. The Responses of Cyanobacteria to Environmental Conditions: Light and Nutrients. In: BRYANT, D. A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. p. 641-668, 1994.
- HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G.; DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p.1037-1047, 2010.
- HODAIFA, G.; MARTÍNEZ, M.E.; ÓRPEZ, R.; SÁNCHEZ, S. Inhibitory effects of industrial olive-oil mill wastewater on biomass production of *Scenedesmus obliquus*. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 30-34, 2012.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M.I. E NETTO, F.M. Protein characterization of the *Aphanothece microscopica* Nägeli cyanobacterium cultivated in parboiled rice effluent. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v. 26 (2), p.482-488, 2006.
- JI, M.K.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; KIM, S.H.; SALAMA, E.S.; LEE, S.H.; KABRA, A.N.; LEE, Y.S.; HONG, S.; JEON, B.H. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO₂ for nutrient removal and biomass production. **Ecological Engineering**, v.58, p.142-148, 2013.
- KRAMÁROVÁ, Z.; FARGASOVÁ, A.; MOLNÁROVÁ, M.; BUJDOS, M. Arsenic and selenium interactive effect on alga *Desmodesmus quadricauda*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.86, p.1-6, 2012.

- KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K.; Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculums source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6012–6018, 2010.
- LAZIC, S.; ZEC, S.; MILJEVIC, N.; MILONJIC, S. The effect of temperature on the properties of Hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid. **Thermochemical Acta**, v.374, p.13-22, 2001.
- LEESING, R.; SIHAWONG, S.; DUANGKEAW, N. Producing of microalgal lipid by isolated microalgae under photoautotrophic and heterotrophic cultivations. **APCBEE Procedia**, v. 7, p. 48-53, 2013.
- LI, X., HU, H., & ZHANG, Y. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, v. 102(3),p. 3098–3102, 2011.
- LODI, A.; BINAGHI, L.; SOLISIO, C.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. **J. Ind. Microbiol Biotechnol.**, v. 30, p. 656:660, 2003.
- MACEDO, R.V.T.; Estudo da utilização do vinhoto como substrato para o crescimento de leveduras e bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 151p. 1991.
- MALEV, O.; KLOBUCAR, R.S.; FABRETTI, E.; TREBSE, P. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6 cloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.104, p.178-186, 2012.
- MANETTI, A. G. S. Avaliação do reúso da água residuária oriunda de uma indústria processadora de pescado utilizando *Aphanothece microscopica* Nägeli. Rio Grande: UFRG, 2008. 85p. Dissertação Mestrado.
- MARTÍNEZ, M.E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J.M.; EL-YOUSFI, F.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorous removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Biosource Technology**, v.73, p.263-272, 2000.
- MIAO, X., & WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97(6), p. 841–846, 2006.
- MONTES, F.J.; CATALÁN, J. & GALÁN, M.A. Prediction of $k_L a$ in yeast broths. **Process Biochemistry**, v. 34, p.549-555, 1999.
- NAVARRO, A.R.; SEPÚLVEDA, M.C.; RUBIO, M.C.; Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Waste Management** 20, p.581-585. 2000.
- NUÑES, V.J.; VOLTOLINA, D.; NIEVES, M.; PIÑA, P.; MEDINA, A.; GUERRERO, M. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. **Biosource Technology**, v.78, p.161-164, 2001.
- OLIVEIRA, H.T.; Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* CCAP-211/11b. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil. 1988. Dissertação de mestrado.
- OREN, A.; SHILO, M. Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*: Sulfur respiration and lactate fermentation. **Archives of Microbiology**, v. 122 (1), p. 77-84, 1979.
- PAN, Y.Y.; WANG, S.T.; CHUANG, L.T.; CHANG, Y.W.; CHEN, C.N.N. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly

controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. **BiosourceTechnology**, v.102, p.10510-10517, 2011.

- PEREZ-GARCIA, O; ESCALANTE, F. M.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potencial products. **Water Research**, v.45, p. 11-36, 2011.
- PINTO, C. P. Tecnologia da digestão anaeróbia da vinhaça e desenvolvimento sustentável. Campinas: UNICAMP, 1999. 162p. Dissertação Mestrado
- POKORA, W.; TUKAJ, Z. The combined effect of anthracene and cadmium on photosynthetic activity of three *Desmodesmus* (Chlorophyta) species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.1207-1213, 2010.
- PRATHIMA DEVI, M.; VENKATA SUBHASH, G.; VENKATA MOHAN, S. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. **RenewableEnergy**, v. 43, p. 276-283, 2012.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V.65, p.635-648, 2004.
- QUEIROZ, M. I. The Nagele microscoca *Aphanothece* potential in the production of single-cell protein from the remaining water. In: Chames, S. W. Proceedings of the eighth international congress of engineering and food. Pennsylvania, EUA, 2001. p. 2027-2031.
- QUEIROZ, M. I., BASTOS, R.G., BENERI, R.L. & ALMEIDA, R.V. Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece* microscopica Nägeli en las aguas residuales de la parbolización del arroz. **RevistaInformaciónTecnologica**, Chile, v.13 (1). p. 61-65, 2002.
- QUEIROZ, M. L. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece* microscopica Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **AppliedEnergy**, v.88, p.3438-3443, 2011.
- QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L.Q.; BASTOS, R.G.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **BioresourceTechnology**, v.98 (11), p.2163-2169, 2007.
- RABOY, B.; PADAN, E. Active transport of glucose and α -methylglucoside in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253(9), p.3287-3291, (1978).
- REED, R.H.; ROWELL, P.; STEWART, W.D.P. Characterization of the transport of potassium ions in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* Kütz. **Eur. J. Biochem**, v.116, p.323 – 330, 1981.
- RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, 211: 195-214, 2002.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture. Wiley-Blackwell. Oxford, UK, 588p. 2004.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN; M.; Stanier; R.Y. Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Great Britain, n.111, p.1-61, 1979.
- RODOLFI, L., ZITTELLI, G. C., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G. AND TREDICI, M. R. "Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor." **Biotechnol. Bioeng.** v.102(1): p.100-112 2009.
- ROLEDA, M. Y., SLOCOMBE, S. P., LEAKEY, R. J. G., DAY, J. G., BELL, E. M., & STANLEY, M. S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six

oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 439–449, 2013.

- ROSA, E.; BARATA, C.; DAMÁSIO, J.; BOSCH, M. P.; Guerrero, A. Aquatic ecotoxicity of a pheromonal antagonist in *Daphnia magna* and *Desmodesmus subspicatus*. **Aquatic Toxicology** v.79, p.296-303, 2006.
- RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L.G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **BioresourceTechnology**, v.101, p. 58–64, 2010.
- SAMORÌ, G.; SAMORÌ C.; GUERRINI, F.; PISTOCCHI, R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, v.47, p.791-801, 2013.
- SARTORI, S. B. Atividade enzimática e valores nutricionais de *Pleurotus* spp. cultivados em vinhaça. Piracicaba: ESALQ, 2011. 109p. Dissertação Mestrado
- SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, p.27-32, 2007.
- TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of ammonia concentration on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. **Bioresource Technology**, v.57, p.45-50, 1996.
- TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution** v.107, 145-151, 2000.
- TAM, N.F.Y.; WONG; J.P.K.; WONG, Y.S. Repeated use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and WW1 for cyclic nickel biosorption. **Environmental Pollution**, v.114, p.85-92, 2001.
- THEVENIEAU, F. & NICAUD, J.-M. Microorganisms as sources of oils. **Oilseeds & Fatcrops and Lips Journal**, v.20(6), D. 603, 2013.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In:Handbook of Microalgal Culture. Richmond, A., p.3-19. **Blackwell**, Oxford, UK, 2004.
- VASCONCELOS, V.M.; PEREIRA, E. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). **Water Research** 35 (5), p. 1354-1357, 2001.
- VOLTOLINA, D.; GÓMEZ-VILLA, H.; CORREA, G. Nitrogen recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. **BioresourceTechnology**, v.96, p.359-362, 2004.
- WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 707–718, 2008.
- WU, L.F.; CHEN, P.C.; HUANG, A.P.; LEE, C.M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. **BioresourceTechnology**, v.113, p. 14–18, 2012.
- XIN, L.; HONG-YING, H; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentration of growth uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology** v. 101, p. 5494-5500, 2010.
- XIN, L., HONG-YING, H., & JIA, Y. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. **New Biotechnology**, v. 27(1), p. 59–63, 2010.
- XING, X.H.; JUN, B.M.; YANAGIDA, M.; TANJI, Y.; UNNO, H. Effect of C/N values on microbial simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous substances in wastewater by

single continuous-flow fluidized-bed bioreactor containing porous carrier particles.
Biochemical Engineering Journal, v. 5, p. 29–37, 2000.

ZHANG, E.; WANG, B.; WANG, Q.; ZHANG, S.; ZHAO, B. Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3787-3793, 2008.

9. Anexo

9.1. Artigos submetidos

9.1.1. Artigo submetido à revista Desalination and Water Treatment

Desalination and Water Treatment



COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp.

Journal:	<i>Desalination and Water Treatment</i>
Manuscript ID:	TDWT-2014-1344
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	07-Jul-2014
Complete List of Authors:	Bastos, Reinaldo; UFSCar, de Mattos, Luiz Felipe; UFSCar,
Keywords:	Vinasse, green algae, wastewater treatment, <i>Desmodesmus</i>

SCHOLARONE™
Manuscripts

COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp.

Luiz Felipe Arjonilla de Mattos¹, Reinaldo Gaspar Bastos^{1,*}

¹Center of Agricultural Sciences – Federal University of São Carlos – Araras, SP, Brazil

ABSTRACT. Vinasse is the main wastewater from the ethanol fermentation-distillation process, generated in large volumes due to Brazilian industrial sugarcane processing. *Desmodesmus* is a green algae genus with recognized ability to wastewater treatment with organic matter and nutrient consumption in heterotrophic growth conditions. Thus, the aim of this research was the evaluation of *Desmodesmus* sp. growth in sugarcane vinasse. Results indicated slight elevation of pH, low oxygen and carbon dioxide consumption, Nitrogen and COD (Chemical Oxygen Demand) removal was of 52.1% and 36.2%, respectively. Specific growth rate of 0.15 h⁻¹ and high yield of COD to biomass at first hours (0.5 mg mg⁻¹) suggest the feasibility of biomass production of this green algae in sugarcane vinasse.

Keywords: Vinasse, green algae; wastewater treatment; *Desmodesmus*.

*Corresponding author (Tel: +55 19 35432614)
E-mail address: reinaldo@cca.ufscar.br (Reinaldo Gaspar Bastos)

INTRODUCTION

Vinasse is the major effluent from the ethanol fermentation-distillation process. It has acid pH, which promotes its high corrosive characteristic, and has high concentration of organic matter, potassium and nitrogen, being capable of superficial water eutrophization and soil salinization when discharged in an arbitrary way [1,2]. Some industrial uses have already been studied like biodigestion, burn, thermal and chemical concentration and fertigation [3]. Nowadays, the fertigation alternative is widely used since potassium is capable of improving sugarcane crop biomass yield [2]. However, in these process a lot of organic matter is discarded without use, which seems that a good opportunity for biomass production is being lost [4,5].

Scenedesmus shows high cellular viability in domestic effluents tolerating high variations in temperature and pH parameters. Martinez *et al.* [6] reported specific growth rate of 0.044 h^{-1} in a secondary treatment effluent where this microalgae was able of removing almost all phosphorus and nitrogen present in that. In a similar experiment, Xin *et al.* [7] reported specific growth rate of 0.034 h^{-1} for *Scenedesmus* sp. LX1 grown in synthetic effluent using ammonia as a nitrogen source.

Alva *et al.* [8] reported phosphorous and nitrogen removal of 66% and 94%, respectively, by *Scenedesmus accutus* from domestic effluent at 18 hours cultivation, obtaining a biomass with 28% of lipid content.

In a piggery effluent, Abou-Shanab *et al.* [9] obtained 60% of phosphorous and nitrogen removal after 20 days cultivation of *Scenedesmus obliquus*, reporting a 70% removal of calcium after this period.

In autotrophic cultivations, most nitrogen removal is caused by pH alcalinization, what gives microalgae an important role in secondary effluent treatment [10]. Accordingly, Ji *et al.* [11] obtained 99% removal of nutrients after 96 hours autotrophic cultivation of *Scenedesmus obliquus* reporting a specific growth speed of 0.047 h^{-1} . The same was observed by Samori *et al.* [12] using *Desmodesmus communis* and by Martínez *et al.* [6] using *Scenedesmus obliquus*.

Desmodesmus, a recently detached genus from *Scenedesmus* accordingly to An *et al.* [13] due to its spiny formations and genotypic differences, has individuals with close capabilities of wastewater nutrient consumption under heterotrophic conditions.

Bastos *et al.* [14] using vinasse as growth media for *Desmodesmus* sp., reported specific growth rate of 0.096 h^{-1} and pointed that these results are promissory for high added value biomass generation in agro industrial effluents.

Biomass generated with microalgae production using industrial effluents as substrate seems to be an alternative for expensive wastewater treatment since it can be used in aquaculture as a valuable feed ingredient [15].

Thus, the aim of this research was the evaluation of COD and nitrogen removal and growth of *Desmodesmus* sp. in sugarcane vinasse.

MATERIAL AND METHODS

Vinasse

Vinasse was collected from a sugarcane processing industry in Araras city, São Paulo, Brazil, directly after the ethanol distillation at 96°C, fractionated in 2 L bottles at approximately 80°C in the laboratory and frozen until its utilization.

Inoculum and cultivation

Green microalgae (*Chlorophytae*) *Desmodesmus* sp. was maintained in our culture bank in modified BGN media [16] which composition is: 30 mg.L⁻¹ K₂HPO₄, 75 mg.L⁻¹ MgSO₄ . 7H₂O, 36 mg L⁻¹ CaCl₂ . 2H₂O, 6 mg L⁻¹ ferric ammonium citrate, 1 mg L⁻¹ Na₂ EDTA, 6 mg L⁻¹ citric acid, 20 mg L⁻¹ Na₂CO₃, 1.5 mg L⁻¹ NaNO₃, 72 mg L⁻¹ NaCl, 2.86 mg L⁻¹ H₃BO₃, 1.81 mg L⁻¹ MnCl₂ . 4H₂O, 0.22 mg L⁻¹ ZnSO₄ . 7H₂O, 0.39 mg L⁻¹ NaMoO₄ . 2H₂O, 0.079 mg L⁻¹ CuSO₄ . 5H₂O, 0.04 mg L⁻¹ CoCl₂ . 6H₂O.

Desmodesmus sp. inoculum was grown autotrophically in the bioreactor using BGN media with pH 7,5, at 25°C, aeration of 1VVM , 3xg mechanic agitation and photo flux of 45µmol/m².s until 1 g.L⁻¹ biomass concentration. After that, biomass was centrifuged at 1275 xg and inoculated in vinasse for the experiment.

Heterothrophic cultivation of *Desmodesmus* sp. was set up in the stirred batch bioreactor (covered to prevent light incidence) with vinasse at pH 7.0, 25°C, 1 VVM and 3 xg of stirrer speed. Parameters such as pH, DO and DCO were monitored and recorded each 30 minutes. Samples from the bioreactor were collected each 3 hours for 30 hours.

Analysis

COD of vinasse was obtained by the dichromate method, according to APHA [17], using an acid solution made of sulphuric acid and dichromate for the samples digestion at 150°C for 2 hours in an

HACH® digester block. Digested samples were cooled to ambient temperature and the absorbance read at 600nm in HACH® spectrophotometer using 4 mL glass cuvettes and calibration curve with biftalate solution.

NT of vinasse was made using Total Nitrogen Test'N Tube™ HACH® vials kit. In the first step samples were digested in an alkaline media with persulfate for 30 minutes at 105°C in HACH® digester block, similar to COD, cooled at ambient temperature. A bisulfate reagent was poured at the vial and mixed followed by a reaction time of 3 minutes, after that an indicator was added and let react for 2 minutes. For the final step, samples of 2mL from the digested tubes were added to acid reagent tubes for the color formation and absorbance reading in a HACH® spectrophotometer at 410nm.

Suspended solids for estimation of biomass was performed by vacuum filtration using a Millipore® filtration apparatus with 0,22µm Sartorius® cellulose acetate membranes previously dried at 105°C for 60 minutes and weighted. Filtration was performed with 5 mL samples and a blank from the suspended solids of vinasse was made before the inoculation of *Desmodemsus* sp. in the bioreactor. After filtration, membranes were dried at 105°C until constant mass measurement and the suspended solids dried mass was obtained by the weight difference between initial and after filtration weight of the membranes.

Green algae and bacteria cell counting

Desmodesmus sp. cells were counted using Improved Neubauer chamber, counting the corner squares and the central one. Average of the counted values was performed and this value multiplied by the dilution factor and 10^5 for the cells per mL concentration.

Colony forming units of bacteria was measured using Petrifilm Aqua™ from 3M® applying 1 mL of the samples per plate and incubating it for 48 hours at 37°C. In this method all plate area is counted, the value is multiplied by the dilution factor and the result is expressed in CFU.

Kinetic analysis

Percentage efficiency of substrate removal from COD or NT was determined by Equation 1:

$$E - S = \frac{S_o - S}{S_o} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

From the biomass concentration, COD and NT were calculated the specific growth rate and consumption of COD and TN, according to Equations 2, 3 and 4.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{d(X)}{dt} \quad (\text{Equation 2})$$

$$q_{COD} = \frac{1}{X} \frac{d(COD)}{dt} \quad (\text{Equation 3})$$

$$q_{NT} = \frac{1}{X} \frac{d(NT)}{dt} \quad (\text{Equation 4})$$

Biomass productivity was calculated according to Equation 5:

$$P = \frac{X-X_0}{t} \quad (\text{Equation 5})$$

In the log-phase, specific growth rate presents the maximum value, calculated by Equation 6:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(X_2 - X_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Equation 6})$$

Yields of COD and NT to biomass were calculated by ratio of growth and consumption rates, i.e., from the slope of curve biomass vs. substrates (Equation 7):

$$Y_{X/S} = -\frac{d(X)}{d(S)} \quad (\text{Equation 7})$$

RESULTS AND DISCUSSION

Initial chemical composition and pH of vinasse are shown at Table 1. From the data, there is a need for adjustment of pH for the cultivation of green algae, since the pH of propagation medium BGN is 7.6. Another important point is the C/N ratio of vinasse sample around 20. This value, calculated from the ratio in COD and TN is in the optimum range for growing these microorganisms [18].

Table 1: Vinasse composition

pH	COD (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	PT (mg L ⁻¹)	Total solids (mg L ⁻¹)
3.5	27.100	1.420	2.61	26.220

COD: Chemical oxygen demand; NT: Total nitrogen; PT: Total phosphorus

Figure 1 presents dissolved oxygen and carbon dioxide profiles in vinasse during growth of *Desmodemsu. sp.*. As shown, oxygen consumption increased until the 15th hour of cultivation, stabilizing at 20% of the oxygen pumped into reactor until the end of the experiment. In this period, oxygen consumption occurs at a constant rate (non-limiting) of $0.186 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$, following zero-order kinetics. On the other hand, the production of carbon dioxide remains constant from 6 to 21 hours at a rate of $2.608 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$.

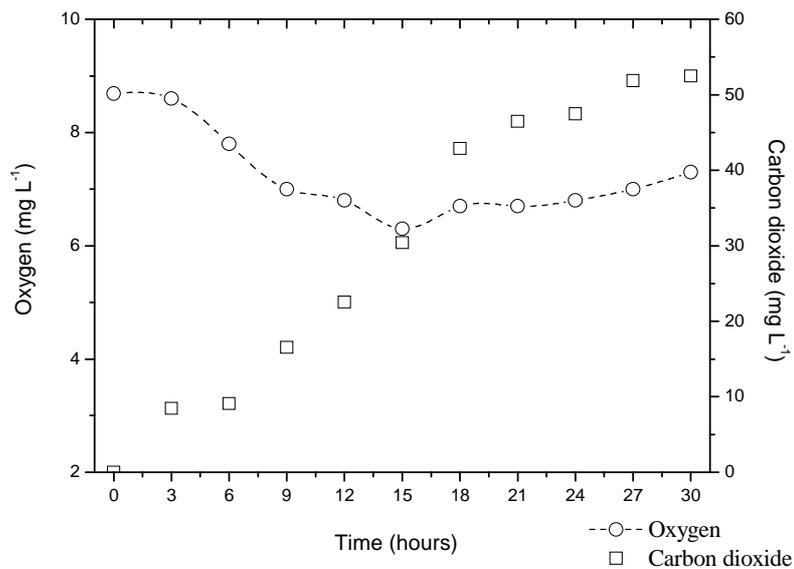


Figure 1: Oxygen consumption and CO₂ production during the growth of *Desmodemsu. sp.* in sugarcane vinasse.

This information points that oxygen consumption was high inside the bioreactor considering that 1 VVM aeration pH didn't acidified during the experiment (as expected for a controlled aerobic system), which may indicate that 1vvm aeration was higher than the cultivation process needed.

Likewise the low oxygen consumption observation, the low carbon dioxide accumulation in the bioreactor may be linked to the high aeration used of 1 VVM, and may support that this was excessive in term of biological demand.

Carbon dioxide production in bioreactor relates to organic matter consumption by the heterotrophic microorganisms present in there, which means that even being a stressing media, vinasse can be treated without dilution biologically.

pH in the bioreactor, different as related in literature, increased from 7,7 to almost 8,5 during the 30 hours. A faster increase was observed in the first 10 hours and continued in a slower manner for the last 20 hours as shown in Figure 2.

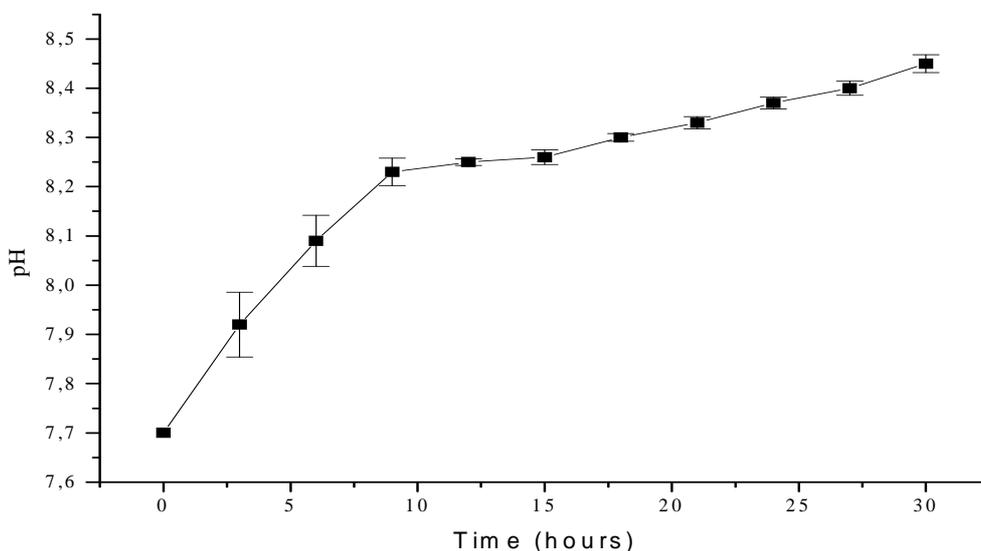


Figure 2: pH evolution during the growth of *Desmodesmus* sp. in sugarcane vinasse.

Increase in pH is related to the active transportation of some specific carbohydrates through the cell membrane by the symport system. It promotes media alkalization by a proton uptake accompanied with the carbohydrate transportation, lowering the free H^+ concentration in the media and so, misbalancing the pH [19,20]. This behavior suggests that vinasse presents specific organic molecules and *Desmodesmus* sp. was able to consume organic material in dark conditions.

Total nitrogen consumption during cultivation occurred in an almost linear uptake after 9 hours, reaching 52% at 30 hours, according to Figure 3.

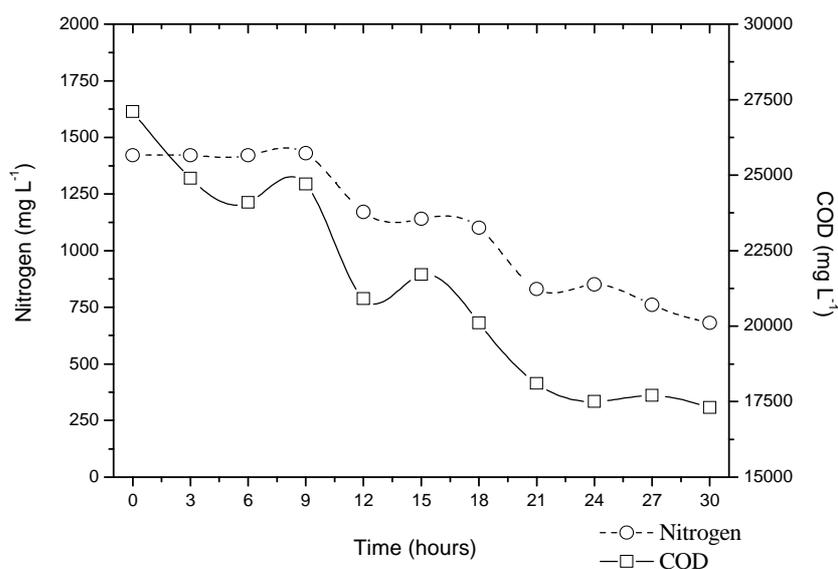


Figure 3: Nitrogen and COD consumption by *Desmodesmus* sp. in sugarcane vinasse at 30 hours experiment.

It could have been said that part of nitrogen depletion was caused by pH alkalization and ammonia volatilization supported by aeration. Despite this, nitrogen concentration only starts to decrease after 9 hours of cultivation and after pH was already at 8.1.

As it will be shown at biomass production topic, nitrogen concentration in the media started to decrease when the log phase of biomass growth was reached, indicating that its sequestration from the media didn't happen by physical-chemical ways but by biological consumption.

Table 2 presents the kinetic parameters as maximum specific growth rate of *Desmodesmus* sp. in vinasse, consumption rates and maximum removals of COD and TN.

According to Table 2, nitrogen consumption in bioreactor was of 32.88 mg L⁻¹ h⁻¹, with maximum removal of 52% at 30 hours, which agrees with results of nitrogen consumption by *Scenedesmus obliquus* in autotrophic cultivation using artificial wastewater shown by Nuñez *et al.*

COD in the media decreased in an exponential behavior, reaching 36.2% in the 30 hours cultivation, as shown in Figure 3, with consumption rate of 342.8 mg L⁻¹ h⁻¹

Table 2: Kinetic parameters

Parameter	Value
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0.15 ($R^2 = 0.87$)
q_{COD} ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	342.8 ($R^2 = 0.95$)
q_{TN} ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	32.88 ($R^2 = 0.95$)
E – COD (%)	36.2 (30 hours)
E – TN (%)	52.1 (30 hours)

$\mu_{\text{máx}}$: maximum specific growth rate; q_{COD} : COD consumption specific rate; q_{TN} : TN consumption specific rate; E – COD: maximum COD removal; E – TN: maximum TN removal; R^2 : coefficient of correlation for linear fit of growth, COD and TN curves.

The faster consumption period was in the first 20 hours stabilizing after that, may be for the quality of the rest of organic matter present after that. A possible explanation is that in the first 20 hours, low molecular weight organic compounds supported biomass growth, and after its consumption only high molecular weight organic compounds were left. As this is a hard consumption substrate, COD depletion slowed down, accompanied by a shock in the biomass that stabilized the growth after that.

The log phase of biomass growth started at the 9th hour lasting until the 18th and biomass implementation in the bioreactor after 30 hours cultivation with maximum specific growth rate of 0.15 h^{-1} (Figure 4).

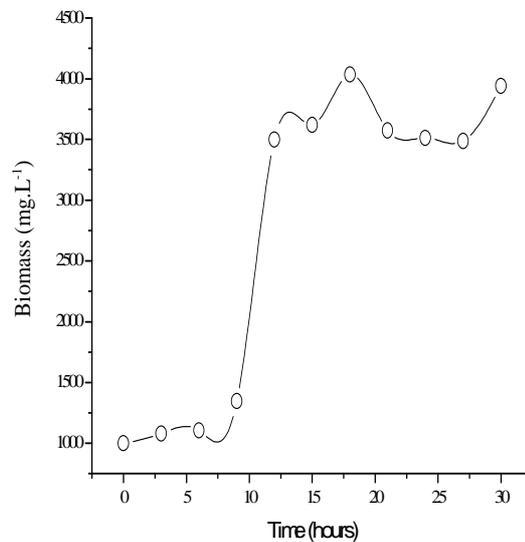


Figure 4: Biomass concentration profile during the growth of *Desmodesmus* sp. in sugarcane vinasse.

The carbon dioxide production, oxygen consumption, COD and NT concentration has higher variations after the log phase of biomass growth was reached confirming that biomass was not only surviving the stressing media, but growing in it.

C/N ratio near to 20 for sugarcane vinasse is suitable for the growth of such microorganisms [17]. In the fact, Xing *et al.* [21] found that variations in the C/N ratio in cultivation medium resulted in different rates of incorporation of the carbon and nitrogen in the cells.

Thus, a possible explanation for the shortness of the log phase is the misbalancing of C/N ratio as nitrogen was consumed faster than carbon, which may cause stressing situation in organic systems. Nevertheless, other possible explanation is that said before related with the high consumption of the low weight organic matter and the difficult of consuming larger molecules by the microorganisms.

The biomass productivity in this experiment was of $101,1 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ and the specific growth rate was of 0.022 h^{-1} , which was found high for a microalgae cultivation beside other authors [7,12,22] had similar or higher results in heterotrophic cultivations.

Figure 5 presents yield COD to biomass profile suggesting that considerable growth with high conversion to biomass in the 15th first hours, agreeing with the profiles of biomass and oxygen. These results suggest that it is possible to obtain high yield of this green algae in vinasse as byproduct of sugarcane processing, which is a industrial activity that has large scale operations in Brazil.

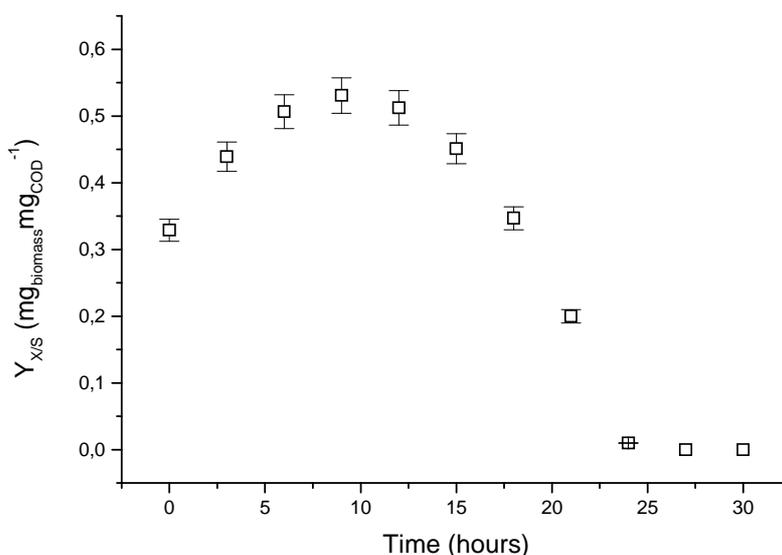


Figure 5: Yield COD to biomass during the growth of *Desmodesmus* sp. in sugarcane vinasse.

Results of *Desmodesmus* sp. counting pointed that green algae was growing slowly (Figure 6). Cell productivity calculated for *Desmodesmus* sp. in this experiment was $13 \cdot 10^5$ cells $L^{-1} h^{-1}$ and points the usual problem of contamination in heterotrophic cultivations.

These results are different of the conventional total solids analysis and as suggests the high yield COD to biomass (Figure 5).

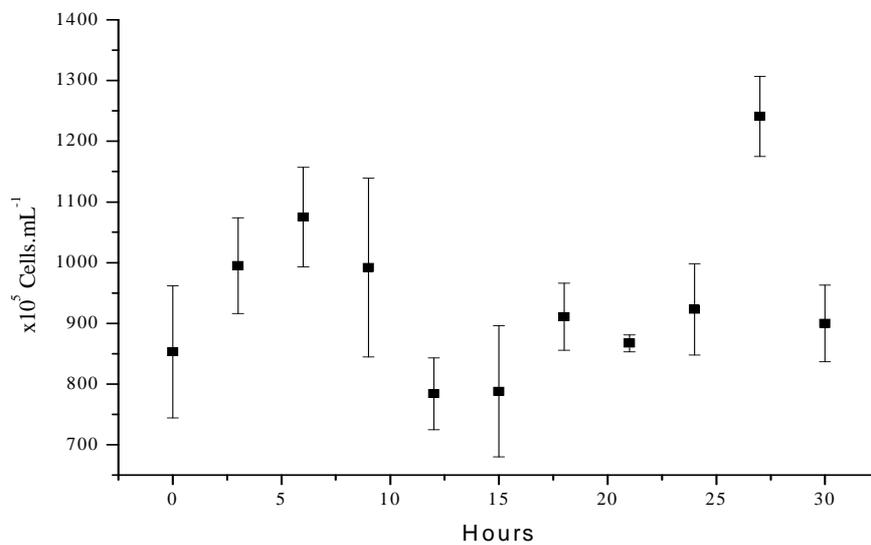


Figure 6: *Desmodesmus* sp. cells performance in the 30 hours experiment

However, according to Figure 7, results of bacteria counting showed that bacteria grew fast in vinasse in an exponential fit, with a lag phase of 9 hours. At 10 hours-cultivation the bacterial contamination is still small, which indicates that, at this period, the biomass yield is due to growth of green algae.

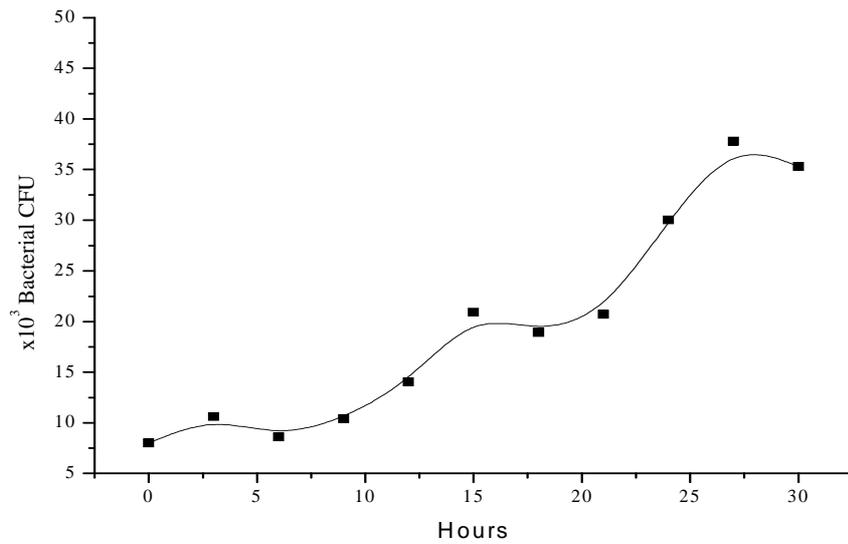


Figure 7: Bacteria contamination in the 30 hours experiment

Moreover, these results confirm that biomass growth measured by total solids was masked by the bacterial contamination, and that bacteria were responsible for part of the nitrogen and COD consumption. This situation, although very clear when it is heterotrophic crops green algae or cyanobacteria, is not addressed more consistently in the literature. Additionally, these findings also would prevent the application of these microorganisms, since research pointed enhancing in algae systems with bacteria [23].

Bacterial biomass production in the experiment was of almost 10^3 UFC.h⁻¹, which indicates high affinity of bacteria for vinasse's nutrients and the risk of it contaminating eukaryotic microalgal cultivation systems.

High affinity for nutrients let bacteria in a most favorable position for nutrients competition causing stress in green algae that without light for a mixotrophic metabolism, slows or stop growing by lack of nutrients. Therefore, alternative proposals to minimize problems of bacterial contamination in these heterotrophic cultivations would be to change the composition of the medium without disturbing the algal growth and/or set up batch of just a few hours.

CONCLUSIONS

Green algae *Desmodesmus* sp. can be grown in sugarcane vinasse at specific rate of 0.15 h^{-1} with 36.2 and 52.1% of COD and TN removal, respectively. Cultivation presented high and crescent yield of COD to biomass at the first 10 hours.

Nevertheless, there is an incidence of bacterial contamination monitored in this research, which must be controlled to optimize the growing conditions of green algae in vinasse.

The results are promising and help the analysis of the bottlenecks in the production of algae biomass from industrial wastewaters.

NOTATION

μ_{\max} : Maximum specific growth rate (h^{-1})

μ : Specific growth rate (h^{-1})

CFU: Colony forming units(CFU.mL^{-1})

COD: Chemical oxygen demand (mg.L^{-1})

DCO: Dissolved carbon dioxide (mg.L^{-1})

DO: Dissolved oxygen (mg.L^{-1})

E-S: Percentage efficiency of substrate removal (%)

NT: Total nitrogen (mg.L^{-1})

P: Biomass productivity ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

PT: Total phosphorous (mg.L^{-1})

q_{COD} : COD consumption (mg.h^{-1})

q_{NT} : NT consumption (mg.h^{-1})

R^2 : Coefficient of correlation for linear fit

S: Final concentration of the substrate (mg.L^{-1})

S_0 : Initial concentration of the substrate (mg.L^{-1})

t: Growth time (h)

$t_2 - t_1$: Interval of log-phase (h^{-1})

VVM : Volume of air per volume of liquid per minute (L.L^{-1})

X: Final concentration of the biomass (mg.L^{-1})

X_0 : Initial concentration of biomass (mg.L^{-1})

xg: Relative centrifugal force (xg)

$Y_{x/s}$: Biomass yield per substrate consumption ($\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$)

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Algae Biotecnologia LTDA and CAPES/CNPq for supporting our research group in this study.

REFERENCES

- [1] Souza, R.P.; Girardi, F.; Santana, V.S.; Fernandes-Machado, N.R.C.; Gimenes, M.L., Vinasse treatment using a vegetable-tannin coagulant and photocatalysis, *Acta scientiarum, Technology*, 35, n.1, p. 89-95 (2013).
- [2] Silva, A.P.M.; Bono, J.A.M.; Pereira F.A.R., Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos, *Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental*, 18, n.1, p.38-43 (2014).
- [3] Freire, W. J.; Cortez, L. A. B., Vinhaça de cana-de-açúcar, 1.ed. Livraria e Editora Agropecuária, Piracicaba (2000).
- [4] Manetti, A. G. S., Avaliação do reúso da água residuária oriunda de uma indústria processadora de pescado utilizando *Aphanothece microscopica* Nägeli. Master degree Thesis, Universidade Federal do Rio Grande (2008).
- [5] Wang, B.; Li, Y.; Wu, N.; Lan, C. Q., CO₂ bio-mitigation using microalgae, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, p. 707–718 (2008).
- [6] Martínez, M.E.; Sánchez, S.; Jiménez, J.M.; El-Yousfi, F.; Muñoz, L., Nitrogen and phosphorous removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Biosource Technology*, 73, p.263-272 (2000).
- [7] Xin, L.; Hong-Ying, H; Ke, G.; Ying-Xue, S., Effects of different nitrogen and phosphorus concentration of growth uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp., *Biosource Technology*, 101, p. 5494-5500 (2010).
- [8] Alva, M.S.; Luna-Pabello, V.M.; Cadena, E.; Ortíz, E., Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production, *Biosource Technology*, no prelo (2013).
- [9] Abou-Shanab, R.A.I.; Ji, M.K.; Kim, H.C.; Paeng, K.J.; Jeon, B.H., Microalgal species growing on piggy wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production, *Journal of Environmental Management*, 115, p.257-264 (2013).
- [10] Nuñez, V.J.; Voltolina, D.; Nieves, M.; Piña, P.; Medina, A.; Guerrero, M., Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater, *Biosource Technology*, 78, p.161-164 (2001).
- [11] Ji, M.K.; Abou-Shanab, R.A.I.; Kim, S.H.; Salama, E.S.; Lee, S.H.; Kabra, A.N.; Lee, Y.S.; Hong, S.; Jeon, B.H. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO₂ for nutrient removal and biomass production. *Ecological Engineering*, v.58, p.142-148, 2013.
- [12] Samorì, G.; Samorì C.; Guerrini, F.; Pistocchi, R., Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I, *Water Research*, 47, p.791-801 (2013).

- [13] An, S.S.; Friedl, T. & Hegewald, E., Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from IT-2 rDNA sequence comparisons, *Plant Biology*, 1, p.418-428 (1999).
- [14] Bastos, R.G.; Mattos, L.F.A.; Dessia, V.C. Goldemberg, S.; Da Silva, D., Heterotrophic growth of *Desmodesmus* sp. using sugarcane vinasse in batch stirred reactor, Proceedings of Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, Elsevier, San Diego, CA, United States (2012).
- [15] Ferreira, P. M. P., Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos, Instituto Nacional de Recursos Biológicos - IPIMAR (2009).
- [16] Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M.; Stanier, R.Y., Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*, 111, p.1-61 (1979).
- [17] American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21^o ed., (2005).
- [18] Queiroz, M.I.; Lopes, E.J.; Zepka, L.Q.; Bastos, R.G.; Goldbeck, R., The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor, *Bioresource Technology*, v. 98 (11), p.2163-2169 (2007).
- [19] Raboy, B.; Padan, E., Active transport of glucose and α -methylglucoside in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*, *The Journal of Biological Chemistry*, vol.253, 9, p.3287-3291 (1978).
- [20] Hong, S.J.; Lee, C.G., Evaluation of Central Metabolism Based on a Genomic Database of *Synechocystis* PCC6803, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, p.165-173 (2007).
- [21] Xing, X.H., Jun, B.M., Yanagida, M., Tanji, Y., Unno, H., Effect of C/N values on microbial simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous substances in wastewater by single continuous-flow fluidized-bed bioreactor containing porous carrier particles, *Biochemical Engineering Journal*, 5, p. 29-37 (2000).
- [22] Prathima Devi, M.; Venkata Subhash, G.; Venkata Mohan, S., Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation, *Renewable Energy*, 43, p. 276-283 (2012).
- [23] Kim, H.S. Algal sphere bacteria enhance the growth of eukaryotic microalga *Chlorella vulgaris*. World Congress on Biotechnology and Bioprocessing, Orlando, United States. (2012).

9.1.2. Artigo enviando para publicação na revista *Engenharia Sanitária e Ambiental* (ESA – ABES)



engenharia sanitária e ambiental

[PÁGINA INICIAL](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#)

[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões](#) > [#105494](#) > [Avaliação](#)

#ESA-699 Remoção de DQO e nutrientes de esgoto doméstico por *Desmodesmus subspicatus*

RESUMO	AVALIAÇÃO	EDIÇÃO
Submissão		
Autores	Reinaldo Gaspar Bastos, Vanessa Ribeiro Urbano, Fabiane Karen Godoy, Luiz Felipe Arjonilla de Mattos, Claudinei Fonseca Souza	
Título	Remoção de DQO e nutrientes de esgoto doméstico por <i>Desmodesmus subspicatus</i>	
Seção	Artigos Técnicos	
Editor	Allan Cardoso Rodrigues	
Avaliação		
Rodada 1		
Versão para avaliação	ESA-699-105494-529495-2-RV.DOC 2013-03-07	
Iniciado	2013-03-29	
Última alteração	2014-01-19	
Arquivo enviado	Avaliador B ESA-699-105494-645457-1-RV.DOC 2014-01-19 Avaliador A ESA-699-105494-580262-1-RV.DOC 2013-04-22 Avaliador A ESA-699-105494-580262-2-RV.DOCX 2013-04-22	
Versão do editor	105494-566170-1-ED.DOC 2013-03-07	
Versão do autor	ESA-699-105494-648779-1-ED.DOC 2014-02-03	
Rodada 2		
Versão para avaliação	105494-529495-3-RV.DOC 2014-02-05	
Iniciado	2014-02-05	
Última alteração	2014-05-17	
Arquivo enviado	Nenhum(a)	
Decisão Editorial		
Decisão	-	
Notificar editor	Comunicação entre editor/autor 2014-02-03	
Versão do editor	105494-566170-2-ED.DOC 2014-02-05	
Versão do autor	Nenhum(a)	

**Remoção de DQO e nutrientes de esgoto doméstico por
Desmodesmus subspicatus
COD and nutrient removal from urban effluent by
*Desmodesmus subspicatus***

Vanessa Ribeiro Urbano, Gestora Ambiental pela UNIARARAS, Mestranda em
Agricultura e Ambiente pela UFSCar.

Fabiane Karen Godoy, Engenheira Ambiental pela UNESP *Campus* Sorocaba,
Mestranda em Agricultura e Ambiente pela UFSCar

Luiz Felipe Arjonilla de Mattos, Farmacêutico pela UMEESP, Mestrando em Agricultura
e Ambiente pela UFSCar

Claudinei Fonseca Souza, Engenheiro Agrônomo pela UNESP, Professor Adjunto do
Departamento de Recursos Naturais e Proteção Ambiental CCA/UFSCar

Resumo

O trabalho teve como objetivos avaliar o crescimento heterotrófico e potencial de remoção de DQO e nutrientes (nitrogênio e fósforo) da microalga clorofícea *Desmodesmus subspicatus* em esgoto doméstico coletado em estação piloto de tratamento e reúso de água do CCA/UFSCar. Os resultados indicaram velocidades específicas de crescimento máximas de $0,084 \text{ h}^{-1}$, com concentrações de biomassa ao redor de 1000 mg L^{-1} em 24 horas de cultivo. Devido à composição do efluente esterilizado, tanto a quantidade de matéria orgânica como nitrogênio são limitantes para o crescimento microbiano. Entretanto, para valores de DQO acima de 200 mg L^{-1} , houve uma elevada conversão de matéria orgânica do efluente em biomassa. Estes resultados sugerem a viabilidade de aplicação desta microalga para produção de biomassa e remoção de parte dos nutrientes e matéria orgânica deste efluente, podendo ser considerada como uma das etapas de adequação para reúso agrícola de esgoto doméstico.

Abstract

The aim of this research was to evaluate the heterotrophic growth and removal of COD and nutrients (nitrogen and phosphorus) of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* from domestic wastewater collected in pilot plant of treatment and water reuse of the CCA/UFSCar. The results showed maximum specific growth rates of 0.084 h^{-1} , with biomass concentrations around 1000 mg.L^{-1} in 24 hours of the experiment. Due to the chemical content of the sterilized effluent, both the organic matter as nitrogen are limiting to microbial growth. However, for COD above 200 mg L^{-1} , there was a high conversion of organic matter into biomass. These results suggest the feasibility of microalgae in one of the stages of suitability for agricultural reuse of domestic wastewater.

Título resumido do artigo em português para o cabeçalho: Remoção de nutrientes de esgoto doméstico por microalgas

Introdução

O uso de microalgas na purificação de águas residuárias industriais e domésticas vem sendo estudado como alternativa aos processos convencionais de despoluição (MARTÍNEZ *et al.*, 2000). Estes processos apresentam como grande vantagem o aproveitamento da biomassa gerada na produção de proteínas unicelulares, compostos celulares como pigmentos ou obtenção de biodiesel através da transesterificação do óleo microalgal. Nesse sentido, diferentes espécies da microalga clorofícea *Desmodesmus* (*Scenedesmus*) vêm sendo cultivadas na forma de células livres e imobilizadas em águas residuárias industriais, domésticas e artificiais, apresentando velocidades específicas de crescimento similares às obtidas em meios sintéticos (MARTÍNEZ *et al.*, 2000; VOLTOLINA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2008; RUIZ-MARIN *et al.*, 2010; XIN *et al.*, 2010; BHATNAGAR *et al.*, 2011; HODAIFA *et al.*, 2012; PRATHIMA DEVI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012). Esta microalga verde tem apresentado alta viabilidade celular em águas residuárias domésticas, tolerando variações de temperatura e pH. MARTÍNEZ *et al.* (2000) avaliaram o cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* em efluente coletado do tratamento secundário da cidade de Granada, Espanha. Estes autores reportam velocidades específicas de crescimento máximas em torno de $0,0438\text{h}^{-1}$ a 30°C , com remoção de praticamente total de fósforo e nitrogênio do meio. XIN *et al.* (2010) avaliaram o cultivo de *Scenedesmus sp.* LX1 em diferentes fontes de nitrogênio, obtendo remoção de nutrientes próxima a 90% utilizando nitrato ou uréia. Neste mesmo estudo, os autores obtiveram a velocidade específica de crescimento máxima ($0,034\text{h}^{-1}$) com amônia, apesar da inibição causada pela redução do pH. BASTOS *et al.* (2012a) avaliaram o cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça de Usinas de Açúcar e Álcool, constatando crescimento a velocidade específica máxima de $0,096\text{h}^{-1}$, com produtividade de biomassa em torno de $1,8\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$. Os autores destacam que estes resultados são promissores para geração de biomassa com valor agregado em termos de lipídios e proteínas a partir de águas residuárias agroindustriais.

Apesar de apresentarem como metabolismo preferencial a fotossíntese, diversas linhagens de microalgas e cianobactérias podem crescer em condições mixotróficas e heterotróficas dependendo das condições de cultivo, ou seja, crescimento a expensas de compostos orgânicos. Este tipo de processo apresenta vantagens econômicas consideráveis quando comparado aos cultivos autotróficos, além de uma produção de biomassa superior e conseqüente consumo de substratos. Nesse sentido, o tratamento de águas residuárias através do cultivo heterotrófico de células livres e imobilizadas de microalgas e cianobactérias é promissor tanto para a remoção de nutrientes como matéria orgânica solúvel (BASTOS *et al.*, 2004; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011a). O cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em água residuária municipal apresentou os melhores resultados em meio suplementado de acetato (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011b). Os autores demonstraram a viabilidade da condução de cultivos com alta concentração celular ($> 10^7$ células/mL), dez vezes superior ao que normalmente ocorre em processos autotróficos, com remoção similar de amônia. Estas diferenças metabólicas podem ser explicadas pelo maior rendimento de ATP em biomassa ($19,3\text{ g/mmol}$) em condições aeróbias heterotróficas. Desta forma, a utilização de altas concentrações de biomassa geralmente aumenta o sucesso do tratamento biológico de águas residuárias.. Esta microalga é citada na literatura como eficiente na remoção de nitrogênio quando comparado ao fósforo também em condições mixotróficas (ASLAN E KAPDAN, 2006).

No caso da utilização de águas residuárias industriais ou domésticas, devido à sua turbidez geralmente elevada, a limitada penetração de luz reduz a eficiência dos cultivos autotróficos. Nesse sentido, seria recomendada a utilização de microorganismos passíveis de crescimento via consumo ou assimilação de moléculas orgânicas, com conseqüente redução da DBO e nutrientes. BHATNAGAR *et al* (2011) comprovaram crescimento mixotrófico de *Chlamydomonas globosa*, *Chlorella minutissima* e *Scenedesmus bijuga* em meio suplementado com diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, acetato de sódio, metanol, glicerol) e em efluentes urbano e agroindustrial (frigorífico de aves). Nesse sentido, WU *et al* (2012) avaliaram o cultivo de *Chlamydomonas sp.* TAI-2 e *Desmodesmus sp.* TAI-1 em fotobiorreator usando efluente do parque industrial de Taichung, Taiwan. Os melhores resultados indicaram remoções de 100% NH_4^+ - N e NO_3^- - N e 33% de PO_4^{3-} - P para *Chlamydomonas*, obtendo 18,4% em lipídios na biomassa, um promissor resultado visando a subsequente produção de biodiesel. PRATHIMA DEVI *et al.* (2012) estudaram o cultivo heterotrófico misto de microalgas em efluente doméstico suplementado com diferentes nutrientes e glicose, apresentando alta produção de biomassa e remoção de nutrientes. Os autores sugerem a produção de microalgas dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* (*Desmodesmus*) a partir de águas residuárias visando o aproveitamento da biomassa para obtenção de biodiesel.

Efluentes domésticos e municipais compreendem uma mistura complexa de sólidos solúveis e em suspensão. A maioria destes efluentes apresenta matéria orgânica solúvel mesmo após o tratamento secundário biológico, o que sugere a presença de fontes de carbono prontamente disponíveis para bactérias, mas de difícil assimilação por microalgas (Perez-Garcia *et al.*, 2011a). Entretanto, mesmo que não se obtenha remoções de matéria orgânica e nutrientes comparáveis aos processos convencionais de tratamento de efluentes, o cultivo levaria a geração de biomassa com valor agregado e adequaria a composição da água visando seu reúso agrícola.

Nesse sentido, o Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em Araras/SP vem realizando sendo realizando pesquisas sobre reúso agrícola do esgoto doméstico gerado no próprio *Campus*. O reúso de água para fins agrícolas é uma tecnologia já aplicada em diversos países, sendo apontada como uma das possíveis soluções para os problemas de escassez hídrica e combate a poluição de rios e mananciais, aumentando a disponibilidade de água limpa para o consumo humano. Destacam-se como águas para reúso aquelas oriundas de efluentes domésticos, por conterem elevados teores de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal. O CCA apresenta uma estação piloto de tratamento e reuso de água que consiste de uma unidade de tanque séptico, um filtro anaeróbio de fluxo ascendente, um tanque com microalgas e/ou cianobactérias, seguido de um sistema de leitos cultivados de macrófitas para a adequação final do efluente. O efluente tratado vem sendo avaliado quanto à sua disposição no solo, qualidade e aplicabilidade em culturas de alface e rabanete (MENDONÇA *et al*, 2013; MENDES *et al.*, 2013). Além disso, é importante o estudo do desenvolvimento de microalgas no efluente por tratar-se de uma etapa fundamental principalmente na remoção de nitrogênio e fósforo.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de remoção de DQO, nitrogênio e fósforo de esgoto doméstico do CCA/UFSCar pela microalga clorofícea *Desmodesmus subspicatus*.

Metodologia

Inóculo

A microalga clorofícea *D. subspicatus* foi mantida em meio de cultura Braun – Grunow (BGN) (RIPKA et al., 1979) no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/DTAiSER/CCA) da UFSCar, sendo utilizada uma concentração inicial de inóculo de aproximadamente 500 mg.L⁻¹ nos ensaios com a água residuária, que corresponde a 10⁶ células/mL.

Para a separação da biomassa, foram centrifugados 200 mL do meio de cultura por 5 minutos a 3000 rpm em centrífuga Elcesa II 206 BL. Após a centrifugação a biomassa foi adicionada à água residuária.

Ensaio

O efluente coletado na estação piloto de tratamento e reúso de água do CCA/UFSCar foi autoclavado e homogeneizado com o inóculo de *D. subspicatus*, sendo distribuídos em erlenmeyers de 125 mL. Os frascos foram protegidos da luz e os ensaios foram conduzidos em incubadora com agitação orbital (Tecnal[®] TC-420) a 150 rpm. A amostra de efluente utilizada apresentou pH 7,1, demanda química de oxigênio (DQO) de 406 mg.L⁻¹, nitrogênio total (NT) de 332 mg.L⁻¹ e fósforo (P) 15,4 mg.L⁻¹. Os ensaios foram monitorados a cada três horas com determinação dos perfis de concentração celular e substratos em 30 horas.

Análises

A concentração da biomassa foi determinada por gravimetria após filtração de volume conhecido da suspensão amostrada durante os cultivos em filtro 0,22µm e secagem a 105°C por 24 horas (APHA, 2005). Com estes dados, foram obtidas curvas de crescimento, sendo calculadas velocidades específicas de crescimento máximas.

A DQO foi determinada pelo método colorimétrico em refluxo fechado, sendo as amostras acrescidas de solução digestora (H₂SO₄ + K₂Cr₂O₇) digeridas durante 2 horas em bloco digestor HACH[®] DRB200 a 150°C, com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro HACH[®] DR 5000 a 600nm. A curva-padrão para análise de DQO foi construída utilizando biftalato de potássio.

O teor de nitrogênio total (NT) do efluente foi determinado através do método da digestão com persulfato de potássio e NaOH, em bloco digestor HACH[®] DRB200 durante 30 minutos, com leituras a 410 nm em Espectrofotômetro HACH[®] DR 5000.

O teor de fósforo do meio líquido (P) foi determinado por digestão da amostra com ácido sulfúrico, seguido de reação colorimétrica usando kit LABORLAB[®] e leitura em espectrofotômetro a 340 nm.

Avaliação cinética

A partir dos valores de concentração celular (X), DQO e NT calculou-se as velocidades específicas de crescimento (µ), consumo de DQO (q_{DQO}) e NT (q_{NT}) conforme equações 1, 2 e 3:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{d(X)}{dt} \quad (\text{Equação 1})$$

$$q_{DQO} = -\frac{1}{X} \frac{d(DQO)}{dt} \quad (\text{Equação 2})$$

$$q_{NT} = -\frac{1}{X} \frac{d(NT)}{dt} \quad (\text{Equação 3})$$

Os rendimentos dos substratos (DQO, NT e P) em biomassa ($Y_{X/DQO}$) foram calculados pela relação das taxas de crescimento e consumo, ou seja, pela inclinação da curva biomassa vs Substratos (S), de acordo com a Equaçã 4:

$$Y_{X/S} = -\frac{d(X)}{d(S)} \quad (\text{Equação 4})$$

Resultados e discussão

Os efluentes domésticos contêm diversos compostos orgânicos, tais como ácidos voláteis e não voláteis solúveis, aminoácidos e carboidratos, os quais podem ser assimilados por microalgas em cultivos mixotróficos e heterotróficos (ZHANG et al, 2008). A elevada turbidez dos efluentes brutos limita a aplicação de micro-organismos puramente fotossintetizantes, sugerindo que microalgas e cianobactérias que apresentam metabolismo heterotrófico possam se desenvolver a partir dos nutrientes e matéria orgânica disponível no meio. De fato, a Tabela 1 apresenta as variáveis cinéticas e as remoções máximas de DQO, nitrogênio e fósforo no cultivo de *D. subspicatus* em efluente doméstico do CCA/UFSCar que comprovam esta hipótese.

Tab. 1 Velocidade específica de crescimento máxima, taxas específicas de consumo e remoções máximas de DQO, NT e PT no cultivo de *D. subspicatus* em efluente doméstico

Parâmetro	
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,084 ($R^2 = 0,98$)
q_{DQO} (h^{-1})	0,029 ($R^2 = 0,94$)
q_{NT} (h^{-1})	0,034 ($R^2 = 0,95$)
E – DQO (%)	65,75 (18 horas)
E – NT (%)	60,24 (21 horas)
E – P (%)	16,47 (24 horas)

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica de crescimento máxima; q_{DQO} : taxa específica de consumo de DQO; q_{NT} : taxa específica de consumo de NT; E – DQO: remoção de DQO máxima; E – NT: remoção de NT máxima; E – P: remoção de fósforo máxima; R^2 : coeficiente de correlação obtido pelo ajuste linear das curvas de crescimento, consumo de DQO e NT

As razões C/N e N/P calculadas pelos teores de DQO, NT e P da água residuária foram de 1,2 e 21, respectivamente. A razão C/N em particular estaria abaixo do valor considerado ótimo para o crescimento destes micro-organismos, ou seja, por volta de 20 (DE LOURENZO, 1995; QUEIROZ E KOETZ, 1997; QUEIROZ et al, 2002). Apesar desta composição em termos de carbono e nitrogênio no efluente, verifica-se uma tendência de crescimento microbiano até 24 horas a uma velocidade específica de crescimento de $0,084 \text{ h}^{-1}$, com máximos de concentração de biomassa ao redor de 1000 mg L^{-1} (Figura 1). Esta velocidade específica de crescimento é praticamente duas vezes superior ao encontrado por MARTÍNEZ et al (2000) em ensaios com este mesmo gênero de microalga em efluente doméstico. Neste estudo, os autores destacaram a importância da composição deste efluente e da alta razão N/P no crescimento microbiano. As diferenças entre os resultados podem ser atribuídas a um inóculo superior e tempo de monitoramento em batelada inferior ao utilizados por estes autores.

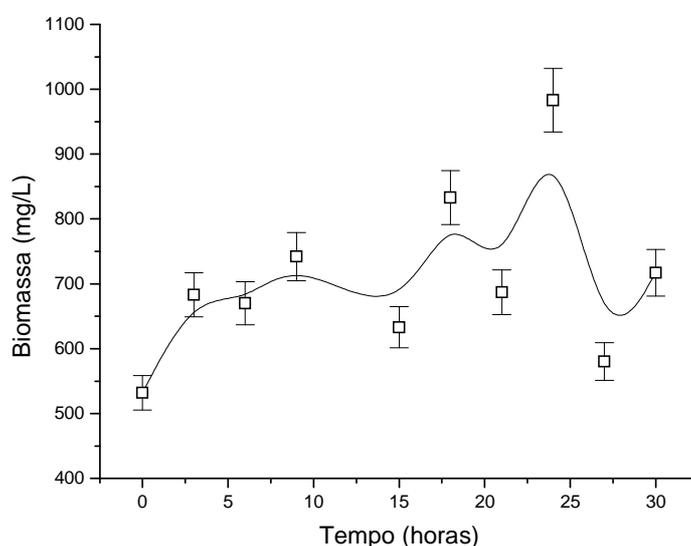


Fig. 1 Perfil de biomassa de *D. subspicatus* em efluente doméstico do CCA/UFSCar

As características do efluente utilizado nos experimentos indicam que é pouco viável a manutenção destes experimentos por mais de 30 horas sem a incidência e influência da contaminação bacteriana. Devido à grande variabilidade do efluente testado, a amostra de meio apresentou os valores iniciais de DQO e NT na mesma ordem de grandeza, tornando tanto a quantidade de matéria orgânica como nitrogênio limitantes para o crescimento microbiano nessas condições. Isto é corroborado pelos valores das taxas de consumo de DQO (q_{DQO}) e NT (q_{NT}), as quais apresentam um comportamento de 1ª ordem. Os perfis de DQO e NT apresentados na Figura 2 sugerem que o cultivo de *D. subspicatus* nesta água residuária é altamente dependente da concentração de matéria orgânica e nitrogênio, sendo grande parte destes constituintes convertidos em biomassa microalgal aproveitável. O sistema de reúso agrícola da água apresenta etapas iniciais de tratamento por tanque séptico e filtro anaeróbio, os quais são responsáveis pela remoção da maior parte da matéria orgânica. Desta forma, a razão C/N na entrada do tanque de microalgas responsável pela remoção de nutrientes tende a ser baixa, devido à baixa redução na quantidade de nitrogênio total nas etapas anteriores. Desta forma, há o crescimento da microalga com elevadas remoções de

nitrogênio nas primeiras horas e máximo em torno de 60% para 21 horas de batelada. Este consumo corresponde a um rendimento global médio de nitrogênio em biomassa de 13 mg mmol^{-1} . Considerando este intervalo de tempo, os resultados sugerem que a vazão de entrada no tanque de microalgas deve ser ajustada de modo que o tempo de residência celular ideal para o consumo de nitrogênio fique em torno de 21 horas. Neste caso, este processo de caráter heterotrófico diferencia-se dos tratamentos de águas residuárias por microalgas, os quais geralmente utilizam altos tempos de residência celular em lagoas e sistemas abertos. Além disso, a utilização de um reator heterotrófico com microalgas em águas residuárias possibilitaria não apenas a remoção dos nutrientes, mas a elevada conversão de matéria orgânica em biomassa passível de uso.

De acordo com FLORES E HERRERO (1994), diversas formas de nitrogênio podem ser assimiladas por cianobactérias e microalgas, incluindo alguns aminoácidos, os quais são transportados para o interior das células com o auxílio de proteínas específicas chamadas porinas. Desta forma, as características deste efluente explicam o consumo de nitrogênio apresentado na Figura 2. Mesmo após este tratamento via cultivo *D. subspicatus*, o teor de nitrogênio permanece acima de 100 mg L^{-1} , o que é interessante uma vez que pretende-se aproveitar este nutriente na irrigação de culturas agrícolas, permitindo desta forma o reúso desta água residuária. De acordo com o Boletim técnico do IAC (TRANI et al, 2011), é recomendado um total de 149 g de NT por hectare da cultura de alface. Desta forma, esta concentração residual de nitrogênio do efluente desta estação experimental piloto poderia suprir aproximadamente 80 ha desta cultura, considerando apenas este nutriente como base de cálculo para a fertirrigação.

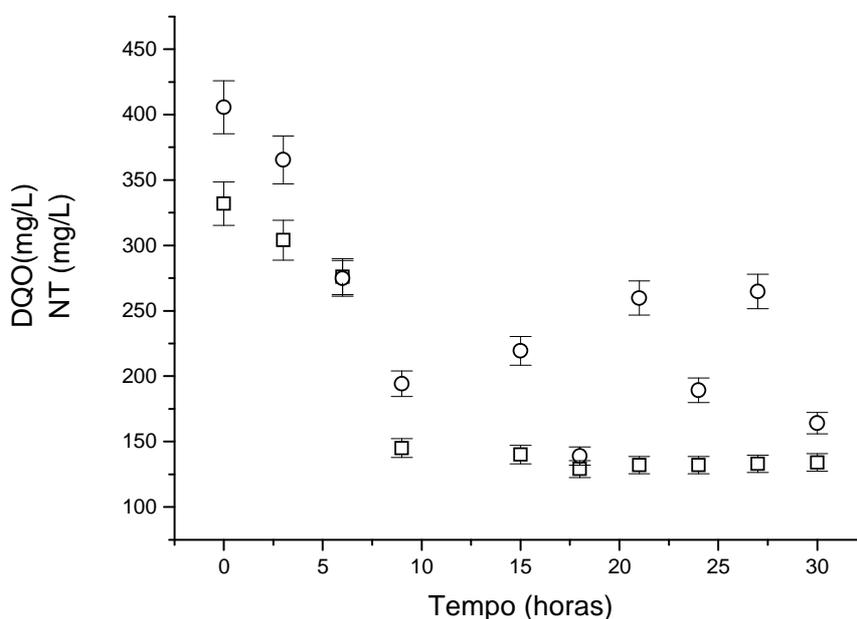


Fig. 2 Perfis de DQO (○) e NT (□) do efluente doméstico em cultivo de *D. subspicatus*

De acordo com os perfis de biomassa e DQO da Figura 3, verifica-se a existência de duas regiões distintas, as quais caracterizam uma alteração do rendimento obtido a partir do consumo de matéria orgânica. Para concentrações de DQO acima de 200 mg L^{-1} (nas primeiras horas de cultivo), há uma elevada conversão de DQO em biomassa praticamente constante, indicando que a maior parte da matéria orgânica disponível é convertida em biomassa de microalgas. Entretanto, abaixo de 200 mg L^{-1} , o rendimento varia com o consumo de DQO. De acordo com estes perfis e considerando a conversão de matéria orgânica em biomassa como parâmetro de processo importante, o tempo de batelada deste processo poderia ser reduzido, com a manutenção do rendimento máximo nas primeiras 15 horas.

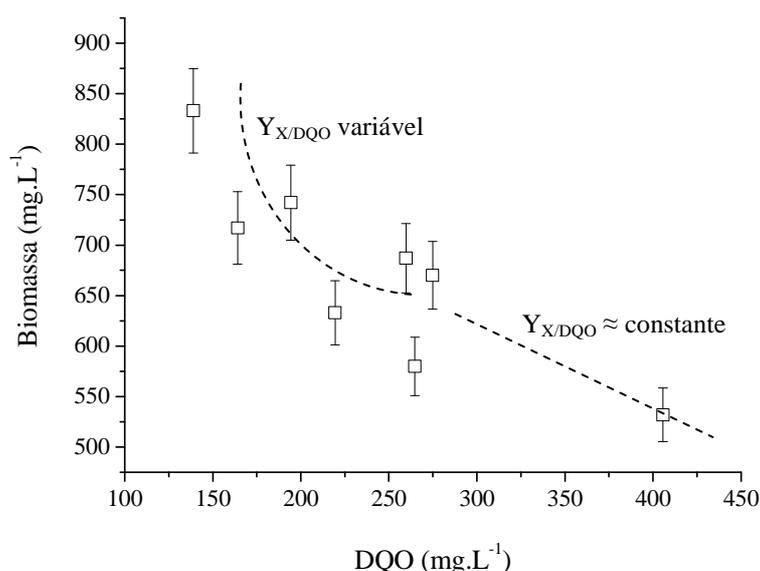


Fig. 3 Relação entre DQO consumida e biomassa de *D. subspicatus* produzida a partir de efluente doméstico

Os perfis de fósforo e pH do meio são apresentados na Figura 4. Apesar de diversos relatos na literatura a respeito da utilização de cianobactérias na remoção de fósforo, os resultados indicam que estes nutrientes não foram consideravelmente assimilados durante o período experimental, provavelmente devido à alta razão N/P inicial. Após as 30 horas de amostragem, considerando os valores finais de NT e P, a razão N/P ficaria reduzida pela metade, o que se aproxima mais da condição ideal de cultivo de microalgas e cianobactérias (COLMENARES-ROLDAN et al, 2012). Entretanto, BASTOS et al (2012b) trabalhando com a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli nesta mesma água residuária obtiveram remoções de fósforo na ordem de 92%, o que sugere a importância das condições iniciais para remoção de nutrientes e o tipo de micro-organismo. XIN et al (2010), determinaram a composição elementar da microalga *Scenedesmus* sp., obtendo como fórmula empírica da biomassa $\text{CH}_{2,48}\text{O}_{1,04}\text{N}_{0,15}\text{P}_{0,0094}$. De acordo com esta estimativa, pode-se perceber que a necessidade de nitrogênio que será incorporado à biomassa é cerca de 15 vezes superior às exigências de fósforo, o que sugere a menor remoção deste nutriente. Por outro lado, estes mesmos autores indicam constantes de saturação de Monod (k_s) de 12 e $0,28 \text{ mg L}^{-1}$ para nitrogênio e fósforo, respectivamente, as quais representam concentrações bem

inferiores ao fornecido pela água residuária doméstica, explicando o crescimento da microalga nessas condições. Além disso, conforme já reportado na literatura para este gênero de microalga, a baixa remoção de fósforo do meio não afeta o consumo de nitrogênio (ZHANG et al., 2008). Entretanto, o discreto consumo de fósforo sem interferência direta no crescimento da microalga torna-se interessante devido a manutenção deste nutriente para irrigação de culturas agrícolas. A quantidade recomendável de fósforo como P_2O_5 para a cultura de alface é 149g/ha, o que seria suprido por este efluente (TRANI et al, 2011).

Em termos de conversão em biomassa, o rendimento global médio de $5,5 \text{ g mmol}^{-1}$ em termos de fósforo é muito superior ao reportado por MARTÍNEZ et al (2000) em ensaios com *Scenedesmus* ($2,48 \text{ mg } \mu\text{mol}^{-1}$). Apesar deste rendimento inferior, os autores indicam remoções de fósforo máximas de 98%, o que sugere crescimento lento e elevado acúmulo deste nutriente na biomassa das microalgas. A remoção biológica convencional de fósforo de águas residuárias alterna condições aeróbias e anaeróbias, as quais permitem o acúmulo de fósforo por determinadas bactérias (VON SPERLING, 1996). Desta forma, considerando que a demanda de oxigênio por microalgas é baixa (BASTOS et al., 2011), dificilmente seria possível a formação de zonas aeróbias e anaeróbias mesmo em cultivo heterotrófico destes micro-organismos.

O pH do meio permanece praticamente constante, por volta de 7, apesar das condições de cultivo heterotrófico e a tendência de redução. Desta forma, este parâmetro manteve-se próximo de um valor ótimo para crescimento destes micro-organismos, o que facilita a condução deste processo já que não é necessário nenhum ajuste e monitoramento ou etapa anterior de neutralização dos despejos.

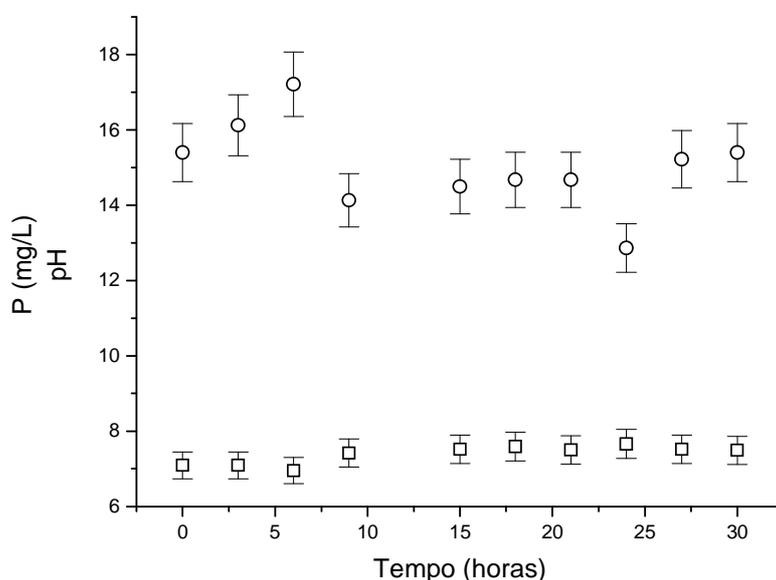


Fig. 4 Perfis de fósforo (○) e pH (□) do efluente doméstico em cultivo de *D. subspicatus*

Conclusões

A microalga *Desmodesmus subspicatus* apresenta um potencial de crescimento no esgoto doméstico visando à remoção de parte do nitrogênio e matéria orgânica, permitindo o reúso agrícola da água. O elevado rendimento a partir de DQO e NT indica a valoração destes resíduos em biomassa microalgal, passível de utilização e aproveitamento biotecnológico. Além disso, o enfoque de cultivo heterotrófico mostra-se uma alternativa interessante para aplicação destes micro-organismos no tratamento de águas residuárias.

Referências

APHA - American Public Health Association (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21^a ed. Washington: AWWA/APHA/WEF.

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

BASTOS, R. G. ; SOUZA, C.F. ; URBANO, V.R. ; PULSHEN, A. (2012b). COD and nutrient removal from urban wastewater by cyanobacteria *Aphanothece microscopica Nægeli*. *Proceedings of Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts*. Elsevier. San Diego, CA, Estados Unidos.

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

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

BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K.C. (2011) Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3425-3431.

COLMENARES-ROLDAN, G.; RENDÓN-CASTRILLÓN, L.; RAMÍREZ-CARMONA, M.; VELEZ-SALAZAR, Y. (2012) Wastewater treatment by using algae as potential for biodiesel production. *Proceedings of Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts*. Elsevier. San Diego, CA, Estados Unidos.

DE LORENZO, M. (1995) Relação de Nutrientes e de Fatores ambientais na ocorrência de Cianobactéria *Aphanothece sp* ao redor da cidade de Rio Grande. Trabalho de Curso de Graduação em Oceanografia. Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

FAY, P. (1983) *The blue-Greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)*, first ed., Great Britain. 88p.

- FLORES, E.; HERRERO, A. (1994) Assimilatory Nitrogen Metabolism and Its Regulation. IN: BRYANT, D.A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. p. 409-435.
- HODAIFA, G.; MARTÍNEZ, M.E.; ÓRPEZ, R.; SÁNCHEZ, S. (2012) Inhibitory effects of industrial olive-oil mill wastewater on biomass production of *Scenedesmus obliquus*. Ecological Engineering, v. 42, p. 30-34.
- MARTÍNEZ, M.E., SÁNCHEZ, S., JÍMENEZ, J.M., YOUSFIS, F.E.; MUÑOZ, L. (2000) Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology, v. 73, p. 263-272.
- MENDES, P. E. F. ; SOUZA, C. F. ; FERREIRA, A. J. D. ; MATTOS, L. F. A. (2013). Água de reúso na agricultura: implicações agronômicas e ambientais em rabanete (*Raphanus sativus* L.). In: Anais do XLII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (CONBEA), Fortaleza.
- MENDONCA, T. G. ; URBANO, V.R. ; BASTOS, REINALDO GASPAR ; SOUZA, C.F. (2013). Efeitos da aplicação de água de reúso no solo cultivado com alface (*Lactuca sativa* L.). In: Anais do XLII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, Fortaleza.
- PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M.E. (2011b) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Phycology, v. 47, p. 190-199.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. (2011a) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, Water Research, v. 45, p. 11-36.
- PRATHIMA DEVI, M.; VENKATA SUBHASH, G.; VENKATA MOHAN, S. (2012) Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. Renewable Energy, v. 43, p. 276-283.
- QUEIROZ, M. I., BASTOS, R.G., BENERI, R.L. & ALMEIDA, R.V. (2002) Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece microscopica Nægeli* en las aguas residuales de la parbolización del arroz. Revista Información Tecnológica, Chile, v. 13, n. 1, p. 61-65.
- QUEIROZ, M.I.; KOETZ, P.R. (1997) Caracterização do Efluente da Parbolização do Arroz. Revista Brasileira de Agrociência, v. 3, n. 3, p. 139-143.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. (1979) Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Journal of General Microbiology. Great Britain, n.111. p.1-61.
- RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L.G.; STEPHENSON, T. (2010) 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.

TRANI, P.E.; TIVELLI, S.W.; CARRIJO, O.A. (2011) Boletim técnico do Instituto Agrônômico de Campinas, Governo do Estado de São Paulo. Fertirrigação em Hortaliças. 2ª Edição, 51 p.

VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVES, M.; SOTO, L. (1999) Growth of *Scenedesmus sp.* in artificial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 68, p.265-268.

VON SPERLING, M. (1997) Lodos ativados. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias, Vol. 4. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, Brasil.

WU, L.F.; CHEN, P.C.; HUANG, A.P.; LEE, C.M. (2012) The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 113, p. 14–18.

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

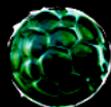
ZHANG, E.; WANG, B.; WANG, Q.; ZHANG, S.; ZHAO, B. (2008) Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus sp.* isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3787-3793.

9.2. Trabalhos apresentados

9.2.1. Trabalho apresentado no 2nd e 3rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts

23/02/12

Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2012 Conference



2nd International Conference on
Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts
10-13 June 2012 - Westin San Diego, USA

ABSTRACT SUBMISSION

Title: Heterotrophic growth of *Desmodesmus subspicatus* using sugarcane vinasse in batch stirred reactor

Abstract No. 0288

Title Heterotrophic growth of *Desmodesmus subspicatus* using sugarcane vinasse in batch stirred reactor

Abstract [Abstract 2.doc](#)

Template used Yes

Approval Confirm

Affiliations (1) CCA/UFSCar, n/a, Brazil
(2) Algae Biotecnologia Ltda., n/a, Brazil

Authors R.G. Bastos (1) Presenting
L.F.A. de Mattos (1)
V. Dessia (1)
S. Goldemberg (2)
D. da Silva (2)

Presenter email reinaldo@cca.ufscar.br

Categories Algal Cultivation - Heterotrophic Systems, including utilization of waste waters for algal production

Keyword1 heterotrophic growth

Keyword2 Desmodesmus

Keyword3 vinasse

Keyword4 batch stirred reactor

Presentation Poster

Registration Confirm

[P2.25]

Heterotrophic growth of *desmodesmus subspicatus* using sugarcane vinasse in batch stirred reactor

R.G. Bastos¹, L.F.A. de Mattos¹, V. Dessia¹, S. Goldemberg², D. da Silva²
¹CCA/UFSCar, Brazil, ²Algae Biotecnologia Ltda., Brazil

Conventional processes of COD (chemical demand oxygen) and nitrogen removal of wastewater are based on aerobic tanks or anaerobic reactors with generate of non-valued biomass, representing a loss of nutrients contained in the effluents. Accordingly, the use of microalgae or cyanobacteria in the wastewater treatment can become an alternative to traditional high cost processes. In this sense, heterotrophic cultivation of microalgae, i.e., the use of organic compounds for growth in absente of light, must be research for effluents bioremediation. This non-conventional cultivation overcomes deficiencies of illuminated autotrophic process, allowing reduction in costs. Under some heterotrophic cultures, the microalgal yields are consistent, reaching cell concentrations higher than photosynthetic conditions. Glucose, glycerol, acetate and agro industrial wastewaters have been used as organic source for these processes. Vinasse is a main wastewater from sugarcane processing, being generated by fermentation-distillation at a ratio of approximately 10L for each liter of ethanol produced, which presents acid pH, high organic load and potassium content. Thus, the aim of this research was evaluate of heterotrophic growth of microalgae *Desmodesmus subspicatus* in vinasse from sugarcane processing. Experiments were set up in batch stirred reactor of 3L with 1VVM air flow rate, 25°C and vinasse from industrial sugarcane. The results indicated a slight decrease in pH and dissolved oxygen, with total nitrogen and COD removals around 20%. Biomass profile indicated maximum specific growth rate of 0.096h⁻¹, with approximately 20 hours of log phase. Biomass productivity was around 1.8g per liter per day, which leads to lipid productivity of about 69mg per liter per day. These values are higher than those reported in the literature for this microorganism, suggesting the feasibility of biomass and lipids production by heterotrophic microalgae in vinasse.

Keywords: heterotrophic growth, *Desmodesmus*, vinasse, batch stirred reactor

[P1.044]

Influence of C/N ratio on growth of *Desmodesmus subspicatus* in sugarcane vinasse

V.C. Déssia, L.F.A. Mattos, R.G. Bastos*

CCA/UFSCar, Brazil

Conventional biological processes of wastewater treatment are based on aerobic tanks with generate of non-valued biomass or anaerobic reactors, representing a loss of nutrients contained in the effluents. Accordingly, the use of microalgae or cyanobacteria in the wastewater treatment is becoming an alternative to traditional high cost processes. Heterotrophic cultivation of microalgae uses organic compounds for growth in absente of light, which is very interesting for effluents. This non-conventional cultivation overcomes deficiencies of illuminated autotrophic process, allowing reduction in costs and consumption of organic substrates. Vinasse is a main wastewater from sugarcane processing, being generated by fermentation-distillation at a ratio of approximately 10 L for each liter of ethanol produced, which presents acid pH, high organic load and potassium content. As the composition of vinasse is extremely variable, it is important to research of the microalgae cultivation on different carbon-nitrogen ration (C/N). Thus, the aim of this research was evaluate of heterotrophic growth of microalgae *Desmodesmus subspicatus* in vinasse from sugarcane processing at C/N ratio between 1.5 to 90. Experiments were set up in stirred flasks using vinasse from industrial sugarcane. Original C/N ration of vinasse was adjusted with glucose (to increase) and sodium nitrate (to decrease). The results indicated high nitrogen removal in smaller C/N ratio and high organic matter removal by in major C/N ratios at 15 hours. In this time, the maximum biomass production was 1.3 g L^{-1} in C/N ration 1.5. Moreover, in this C/N ratio there was less contamination by heterotrophic bacteria, suggesting that most availability nitrogen over the carbon facilitates the heterotrophic growth of *Desmodesmus subspicatus*, limiting the development of contaminants. Considering that the contamination is one of the most critical bottlenecks in the scale-up of microalgae production, these results suggest that the design of the culture medium may minimize this problem.

Keywords: *Desmodesmus subspicatus*, sugarcane vinasse, C/N ratio, wastewater treatment

Trabalho apresentado no Congresso Latino-americano de Biotecnologia de Algas

Título: Perspectiva de utilização de *Desmodesmus subspicatus* em cultivo heterotrófico em águas residuárias

¹Bastos, R.G., ²Silva, D., ²Mattos, L.F.A.

[1] Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de São Carlos.

Autor para correspondência (e-mail): reinaldo@cca.ufscar.br

Os processos tradicionais de despoluição biológica de águas residuárias sistemas aeróbios e/ou anaeróbios, com geração de biomassa sem valor comercial e perda dos nutrientes contidos nos efluentes. Alternativamente, vem sendo estudada a aplicação de microalgas com potencial produção de proteínas, lipídios ou outros constituintes da biomassa, representando a valorização dos resíduos. Nesse sentido, o cultivo heterotrófico de microalgas é uma proposta que vem ao encontro da viabilidade destes processos, uma vez que envolve a utilização de compostos orgânicos para o crescimento destes micro-organismos na ausência de luz, sendo pesquisado conjuntamente com a bioremediação de efluentes. Esse tipo de cultivo não convencional de microalgas apresenta algumas vantagens com relação ao processo autotrófico convencional, tais como a obtenção de altas concentrações celulares e redução de custos, principalmente por não estar dependente de energia luminosa. As principais fontes de carbono orgânico utilizadas nestes cultivos são glicose, acetato, glicerol, além do aproveitamento de efluentes. *Desmodesmus subspicatus* é uma microalga clorofícea que tem apresentado alta viabilidade celular em cultivos utilizando águas residuárias industriais e domésticas, tolerando variações de temperatura e pH. Neste contexto, o trabalho teve como objetivos avaliar o crescimento heterotrófico da microalga clorofícea *Desmodesmus subspicatus* e potencial de remoção de DQO e nutrientes de esgoto doméstico e vinhaça de cana-de-açúcar. A água residuária doméstica foi coletada da estação piloto de tratamento e reúso de água do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), enquanto a vinhaça foi utilizada na forma bruta, diretamente da saída de colunas de destilação de uma Usina de Açúcar e Álcool de Araras/SP. Os resultados indicaram velocidades específicas de crescimento máximas de $0,084 \text{ h}^{-1}$, com concentrações de biomassa ao redor de 1000 mg L^{-1} em 24 horas de experimento com esgoto. Para DQO acima de 200 mg L^{-1} , houve elevada conversão de DQO em biomassa. Para os experimentos em vinhaça, as velocidades específicas de crescimento máximas ficaram na ordem $0,1 \text{ h}^{-1}$, com fase exponencial perfazendo 20 horas, enquanto a produtividade em biomassa máxima foi de $1,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Os parâmetros cinéticos apresentaram valores superiores aos reportados em literatura para este micro-organismo, sugerindo viabilidade do cultivo heterotrófico desta microalga

9.2.2. Trabalho apresentado no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos



XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS

30 de julho-02 de agosto de 2013

Foz de Iguaçu, PR, Brasil



CULTIVO HETEROTRÓFICO MISTO (*Desmodesmus* sp./*Chlorella* sp.) EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

D. SILVA¹, D. B. GARNICA², L. F. A. MATTOS³ e R. G. BASTOS¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias

² Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Biotecnologia

³ Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente

E-mail para contato: reinaldo@cca.ufscar.br

RESUMO – As microalgas apresentam diversas aplicações biotecnológicas reconhecidas e, mais recentemente, têm sido estudadas como agentes potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias. Atualmente, acredita-se que o cultivo heterotrófico apresenta produção de biomassa microalgal superior quando comparado ao cultivo autotrófico convencional. Sendo assim, é fundamental o aprofundamento dos conhecimentos a respeito do metabolismo heterotrófico destes microorganismos, principalmente no que diz respeito às pesquisas com diferentes linhagens e fontes de carbono ideais para intensificar sua produtividade. Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o cultivo heterotrófico microalgal misto (*Desmodesmus* sp./*Chlorella* sp.) em diferentes fontes de carbono. Os resultados indicaram viabilidade de cultivo para todas as fontes de carbono testadas, sendo que as maiores taxas de crescimento foram obtidas com frutose. Dessa forma, observaram-se resultados promissores em termos de perspectiva de produção de

biomassa de microalgas com valor agregado a partir de diferentes substratos orgânicos.

1. INTRODUÇÃO

“Microalga” é um termo genérico, sem efeito taxonômico, que filogeneticamente engloba tanto organismos eucarióticos, como grupos representados por clorófitas, quanto procarióticos, como cianobactérias, formalmente conhecidas como cianofíceas (Raven *et al.*, 2001). Estes micro-organismos durante décadas têm sido foco de diversas investigações biotecnológicas visando à produção de biomassa para diversos usos, como na biofixação de CO₂, ração para a aquicultura, como alimento rico em ácidos graxos essenciais, na produção de pigmentos, como fertilizante na agricultura, na produção de biocombustíveis, de moléculas com capacidade surfactante e agentes potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias. Neste último caso, sua importância econômica, nutricional e ecológica deve-se à habilidade de remover matéria orgânica, nutrientes e metais tóxicos, incorporando-os à biomassa (Antelo *et al.*, 2010; Dal Magro *et al.*, 2011). Assim, é importante destacar a eficácia destes micro-organismos quando se trata de sua utilização como agentes biorremediadores de águas residuárias, diante de reconhecida capacidade de redução da demanda química e biológica (Wang *et al.*, 2010).

Atualmente, o sistema de cultivo autotrófico ainda é o mais empregado para obtenção de biomassa microalgal. Porém, segundo Harel e Place (2004), a produção fotossintética tanto em tanques externos quanto em fotobiorreatores pode ser considerada muito dispendiosa, devido ao efeito adverso do autossombreamento que impacta a produtividade celular, além da necessidade de água potável, sais minerais e, em alguns casos, iluminação artificial, elevando os custos de operação. Diante deste cenário, uma alternativa viável ao cultivo autotrófico, embora limitada a algumas espécies de microalgas, é a utilização da sua capacidade de crescimento heterotrófico na ausência de luz, dispensando a necessidade de energia solar e substituindo a fixação de CO₂ atmosférico por fontes de carbono orgânico assimiláveis no meio de cultivo, tais como açúcares, ácidos orgânicos e acetato (Perez-Garcia *et al.*, 2010).

De acordo com Huang *et al.* (2010), o cultivo heterotrófico apresenta diversas vantagens frente ao cultivo autotrófico, tais como a independência da luz, melhor controle do cultivo, possibilidade de utilização de águas residuárias como fonte de nutrientes, além da diminuição do custo na separação devido ao aumento da produtividade. O processo de adição de fontes orgânicas de carbono melhora consideravelmente o crescimento, levando a concentrações celulares três vezes superiores às aquelas obtidas em cultivos puramente fotoautotróficos (Brennam e Owende, 2010). Assim, a produção heterotrófica pode gerar redução dos custos de produção e elevada quantidade de biomassa.

Dessa forma, é fundamental o aprofundamento dos conhecimentos a respeito do metabolismo heterotrófico destes micro-organismos, principalmente no que diz respeito às pesquisas com diferentes linhagens e fontes de carbono ideais para intensificar a produção de

biomassa. Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o cultivo heterotrófico microalgal misto (*Desmodesmus sp./Chlorella sp.*) em diferentes fontes de carbono.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As microalgas *Desmodesmus sp.* e *Chlorella sp.* foram isoladas e mantidas em meio de cultivo sintético BGN (Ripka *et. al.*, 1979), sob condições controladas de luz, temperatura e agitação, no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle, do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar. Sendo que, a partir destas culturas mantidas em tubos de ensaio com meio líquido, foram desenvolvidos novos cultivos em erlenmeyers de 500 mL para obtenção de biomassa suficiente ao desenvolvimento dos experimentos.

Assim, ao meio BGN novo, acrescentou-se 300 mg L⁻¹ (10⁶ células mL⁻¹) de biomassa, que foi então suplementado de glicose (100 g L⁻¹), frutose (100 g L⁻¹), sacarose (50 g L⁻¹), lactose (50 g L⁻¹), xilose (100 g L⁻¹), arabinose (100 g L⁻¹), glicerol (4,6 g L⁻¹) e acetato (1,25 g L⁻¹). O pH do meio foi ajustado a 6,8 em todas as condições. Os cultivos foram mantidos em mesa agitadora a 150 rpm, temperatura de 28°C e na ausência de luz.

Para acompanhar e avaliar os perfis de biomassa nas fontes de carbono orgânico avaliadas, alíquotas foram retiradas a cada 3 horas, sendo que a duração de cada experimento total foi de 30 horas. A concentração celular expressa em células mL⁻¹ foi determinada diretamente por contagem celular em câmara de Neubauer, de acordo com metodologia padrão (Arredondo-Vega e Voltolina, 2007). A cinética de crescimento foi determinada segundo os parâmetros indicados por Ahmad e Holland (1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de avaliar o crescimento do cultivo misto de microalgas (*Desmodesmus sp./Chlorella sp.*) em função da suplementação de meio de cultivo sintético com diferentes fontes de carbono orgânico, estabeleceram-se as oito curvas de crescimento que são apresentadas na Figura 1.

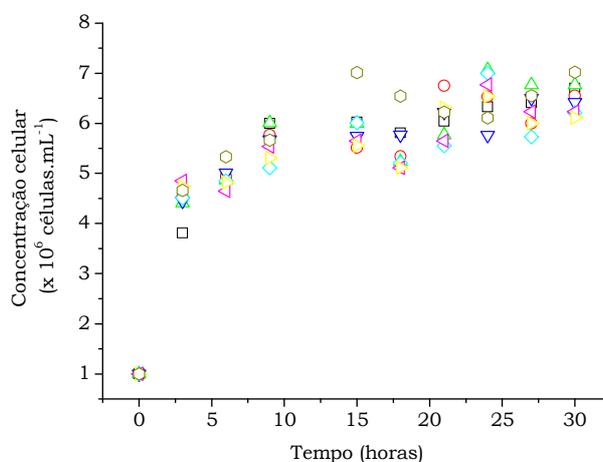


Figura 1 – Curvas de crescimento do cultivo misto (*Desmodesmus sp./Chlorella sp.*) sob diferentes fontes de carbono orgânico, conduzidos por 30

hs. Frutose (□), lactose (○), sacarose (△), glicerol (▽), arabinose (◇), xilose (◁), acetato (▷) e glicose (◇).

As curvas de crescimento na ausência de luminosidade sugerem diferentes mecanismos de assimilação e incorporação das moléculas orgânicas, vinculado ao tipo e massa molar do substrato.

Sendo assim, conforme Tabela 1, podemos observar que os resultados indicam viabilidade de cultivo para todas as fontes de carbono testadas, sendo que as maiores velocidades específicas de crescimento máximas foram obtidas com frutose ($0,021\text{h}^{-1}$), seguido de sacarose ($0,015\text{h}^{-1}$), glicerol ($0,013\text{h}^{-1}$) e glicose ($0,012\text{h}^{-1}$). Mesmo as pentoses (arabinose e xilose), que são reconhecidamente açúcares pouco usuais para qualquer cultivo microbiano heterotrófico, sustentaram um crescimento mais lento das microalgas.

Tabela 1 – Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (tg) para o cultivo microalgal misto nas diferentes fontes de carbono orgânico

Fonte de Carbono	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) *	tg (h)
Frutose	0,021 a	33
Lactose	0,011 bc	63
Sacarose	0,015 b	46
Glicerol	0,013 bc	53
Arabinose	0,009 c	77
Xilose	0,01 bc	69
Acetato	0,009 c	77
Glicose	0,012 bc	58

* Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5%.

4. COCLUSÕES

As curvas de crescimento na ausência de luminosidade sugerem diferentes mecanismos de assimilação e incorporação das moléculas orgânicas, vinculado ao tipo e massa molar do substrato. Nesse sentido, a assimilação de frutose permitiu uma velocidade específica de crescimento significativamente superior, quando comparada as demais fontes analisadas. Dessa forma, foram observados resultados promissores em termos de perspectiva de produção de biomassa de microalgas com valor agregado a partir de diferentes substratos orgânicos.

5. REFERÊNCIAS

- ANTELO, F. S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J.A.V.; KALIL, S. J. Extraction and Purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* and Integrated Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 5, p. 921-926, 2010.
- ARREDONDO-VEGA, B. O.; VOLTOLINA, D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *In: Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. ARREDONDO-VEGA, B. O.; VOLTOLINA, D. (Eds.). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, p. 17-25, 2007.

- AHMAD, M. N.; HOLLAND, C. R. Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. *Journal of Food Engineering*, v. 26, p. 443-452, 1995.
- BRENNAM, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of Technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, p. 557-577, 2010.
- DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul: Editora da UCS, 2011.
- HAREL, M.; PLACE, A. L. Heterotrophic production of marine algae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (ed.) *Handbook of Microalgae Culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, p. 513-524, 2004.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, v.87, p. 38-46, 2010.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, p. 1-26, 2010.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 6a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 906 p.
- WANG, L.; MIN, M.; LI, Y.; CHEN, P.; CHEN, Y.; LIU, Y.; WANG, Y.; RUAN, R. Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. In Different Wastewater Treatment Plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 162, p. 1174-1186, 2010.