



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA - DB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – PPGERN

**CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* EM
VINHAÇA CONVENCIONAL E BIODIGERIDA
TRATADAS: UMA ABORDAGEM
ECOFISIOLÓGICA**

Camila Candido

São Carlos - 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA - DB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – PPGERN

**CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* EM
VINHAÇA CONVENCIONAL E BIODIGERIDA
TRATADAS: UMA ABORDAGEM
ECOFISIOLÓGICA**

Camila Candido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: **Prof^a. Dra. Ana Teresa Lombardi**

São Carlos – 2015

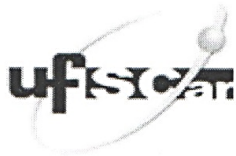
**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C217cc Candido, Camila.
Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça convencional e
biodigerida tratadas : uma abordagem ecofisiológica /
Camila Candido. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
64 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Microalga. 2. Filtragem. 3. Fotossíntese. 4. Resíduos. I.
Título.

CDD: 589.3 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Candido, realizada em 23/10/2015:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

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

Agradecimentos

À professora Ana Teresa Lombardi pela orientação, companhia, ideias e correções;

À minha família, em especial meus pais Nivaldo e Matilde e meus irmãos Caroline e Caio, por ser minha base, me permitindo chegar até aqui;

Ao técnico do Departamento de Botânica Carlos Aparecido Casali, pela grande ajuda na parte prática do trabalho;

Aos colegas de laboratório, Grazi, Dani, Jaque, Leonardo, Farid, Eduardo, Silvia, Dalva, Moira e Hirla, pela companhia e ajuda.

À Mônica e Andréa, por compartilharem comigo as dificuldades do trabalho com a vinhaça e ao Alex e Raquel, pela grande ajuda na interpretação dos resultados.

Ao Tinho, pela companhia na coleta da vinhaça, nas noites e finais de semana no laboratório e pela participação em cada etapa deste trabalho;

Aos meus amigos, Carol Prampero, Ana, Diene, Irinéia, Alfredo, Joelma, José, Rodolfo e Lucas, pela ajuda nos momentos difíceis, pelas distrações e conselhos;

Ao professor Clóvis Wesley de Souza, do Departamento de Morfologia e Patologia (UFSCar), pela contribuição nas análises microbiológicas;

Ao professor Reinaldo Gaspar Bastos, do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio Economia Rural (UFSCar – *campus* Araras), pela disponibilidade dos equipamentos ao longo do trabalho;

À FAI e UFSCar pela presteza dos serviços prestados em relação à solicitação da patente;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida;

Em especial agradeço, com carinho, a Profa. Dra. Maria Inês Salgueiro Lima, recentemente aposentada pelo Departamento de Botânica da UFSCar, por suas ideias e incentivo iniciais, imprescindíveis para minha busca pelo bacharelado e por este mestrado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE SÍMBOLOS	5
Resumo	6
Abstract	7
1.0 INTRODUÇÃO	8
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Etanol e vinhaças	11
2.2 Cultivo de microalgas em vinhaça	12
2.3 Fisiologia fotossintética de microalgas	15
3.0 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivos específicos	18
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Vinhaças	19
4.2 Culturas algais	22
4.3 Parâmetros monitorados nos experimentos	26
4.4 Análise dos resultados	32
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Crescimento de <i>C. vulgaris</i> em diferentes concentrações de vinhaça	33
5.1.1 Resultados	33
5.1.2 Discussão	38
5.2 Estudo ecofisiológico de <i>C. vulgaris</i> em vinhaça tratada	41
5.2.1 Resultados	41
5.2.2 Discussão	51
7.0 CONCLUSÃO	57
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Etapa fotoquímica da fotossíntese.** Esquema mostrando os fotossistemas I e II, e a cadeia transportadora de elétrons. Fonte: RAVEN (2007). 14
- Figura 2. Filtragem das vinhaças.** Esquema representando o processo de filtragem das vinhaças convencional e biodigerida. 20
- Figura 3. Fluxograma dos experimentos realizados.** Tratamentos das vinhaças convencional e biodigerida utilizados nos cultivos de *Chlorella vulgaris*. 24
- Figura 4. Fluorescências emitidas após estimulação luminosa.** Representações gráficas das emissões de fluorescência após pulso luminoso sobre as microalgas adaptadas ao escuro (centros de reação abertos) e ao claro (centros de reação fechados). 28
- Figura 5. pH e condutividade.** Valores médios de (a) pH e (b) condutividade (mS cm^{-1}) para o (×) controle em LC Oligo e os tratamentos (○) vinhaça convencional filtrada, (●) vinhaça convencional centrifugada, (□) vinhaça biodigerida filtrada e (■) vinhaça biodigerida centrifugada. 34
- Figura 6. Material particulado.** Valores médios ($n = 3 \pm \text{SD}$) de absorvância 570 nm (U.A.) no sexto dia de cultura para: (×) controle em LC Oligo e os tratamentos (○) vinhaça convencional filtrada, (●) vinhaça convencional centrifugada, (□) vinhaça biodigerida filtrada e (■) vinhaça biodigerida centrifugada. 35
- Figura 7. Curvas de crescimento.** Ln dos valores médios de densidade celular (células $\text{mL}^{-1} \times 10^5$) para os controles em (×) LC Oligo e (+) BG11 e para as diferentes concentrações de vinhaças tratadas: (○) 10%, (▲) 20%, (▽) 30%, (◆) 40%, (◁) 50%, (►) 60%, (◇) 70%, (★) 80%, (◆) 90% e (■) 100%. 6a) vinhaça convencional filtrada, 6b) vinhaça convencional centrifugada, 6c) vinhaça biodigerida filtrada e 6d) vinhaça biodigerida centrifugada. 36
- Figura 8. Densidade celular final.** Valores médios ($n = 3 \pm \text{SD}$) de densidade celular (células $\text{mL}^{-1} \times 10^5$) para os controles (×) LC Oligo e (+) BG11 e tratamentos (○) vinhaça convencional filtrada, (●) vinhaça convencional centrifugada, (□) vinhaça biodigerida filtrada e (■) vinhaça biodigerida centrifugada no último dia de cultivo. 36
- Figura 9. Taxa de crescimento.** Valores médios ($n = 3 \pm \text{SD}$) de taxa de crescimento (dia^{-1}) para os controles LC Oligo (barra hachurada) e BG11 (barra quadriculada) e as vinhaças (a) convencional e (b) biodigerida. Barra branca: filtrados; preta: centrifugados. Mesma letra representa tratamentos que não diferiram significativamente entre si. 37
- Figura 10. pH e condutividade.** Valores médios de (a) pH e (b) condutividade (mS cm^{-1}) para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaças: (●) convencional filtrada 60% e (■) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada e para o controle em LC Oligo (△) e as

culturas em vinhaças (○) convencional filtrada 60% e (□) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* não aclimatada. 43

Figura 11. Absorbância em 570 nm. Valores médios (n = 3) de absorbância em 570 nm (U.A.) para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaças (●) convencional filtrada 60% e (■) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada e para o controle em LC Oligo (△) e as culturas em vinhaça (○) convencional filtrada 60% e (□) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* não aclimatada. 43

Figura 12. Curvas e taxa de crescimento. Valores médios (n = 3) de (a) densidade celular diária (células mL⁻¹10⁵) em função do tempo experimental (dias) para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaça (●) convencional filtrada 60% (vc) e (■) biodigerida filtrada 80% (vb) com *C. vulgaris* aclimatada e para o controle em LC Oligo (△) e as culturas em vinhaça (○) convencional filtrada 60% (vc) e (□) biodigerida filtrada 80% (vb) com *C. vulgaris* não aclimatada. (b) Taxa de crescimento média (n=3) para os tratamentos com *C. vulgaris* aclimatada (barras pretas) e não aclimatadas (barras brancas). 44

Figura 13. Clorofila a. Valores médios (n = 3) da (a) concentração total de clorofila a (mg L⁻¹) e (b) quantidade de clorofila a por célula (pg célula⁻¹) para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaça (●) convencional filtrada 60% e (■) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada. 45

Figura 14. Parâmetros fotossintéticos. Valores médios (n = 3) de rendimento fotossintético máximo (ϕ_m), operacional (ϕ_m'), decaimento fotoquímico (qP), decaimentos não-fotoquímicos (qN e NPQ) e taxa de crescimento (μ_c) na (a) fase exponencial e (b) ao final do experimento. Barras hachuradas representam o controle em LC Oligo, barras brancas cultivos em vinhaça convencional filtrada 60% e barras pretas em vinhaça biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada. 46

Figura 15. Curvas de luz. Taxa de transporte de elétrons (ETR_{relativa}) em função da intensidade luminosa ($\mu\text{mol de fótons m}^2 \text{ s}^{-1}$) das três réplicas. (a) controle em LC Oligo; (b) vinhaça biodigerida filtrada 60%; (c) vinhaça convencional filtrada 80%. 47

Figura 16. Densidade celular de contaminantes. Valores médios (n = 3) de densidade celular (UFC mL⁻¹) de (a) bactérias e (b) leveduras para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaça: (●) convencional filtrada 60% e (■) biodigerida filtrada 80% e de (b) fungos filamentosos para as culturas em vinhaça: (○) convencional filtrada 60% e (□) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada. 48

Figura 17. Carbono e nitrogênio orgânicos totais. Valores médios (n = 3) de (a) carbono orgânico total (mg L⁻¹10³) e (b) nitrogênio orgânico total (mg L⁻¹) no controle, vinhaça convencional 60% (vc) e vinhaça biodigerida 80% (vb) antes dos cultivos (barras pretas) e após os cultivos de *C. vulgaris* aclimatada (barras brancas). Barra de erro representa o desvio padrão. 50

Figura 18. Proteínas e carboidratos. Valores médios ($n = 3$) de proteínas (barra preta) e carboidratos (barra branca) por célula (pg célula^{-1}) para as culturas no controle, vinhaça convencional 60% (vc) e vinhaça biodigerida 80% (vb) na (a) fase exponencial e (b) ao final do experimento. 50

Figura 19. Razão proteína / carboidratos. Valores médios da razão proteínas / carboidratos para as culturas no controle em meio LC Oligo, em vinhaça convencional filtrada 60% e em vinhaça biodigerida filtrada 80% na fase exponencial (barra branca) e ao final do experimento (barra preta). 51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Meio LC Oligo.** Composição das soluções utilizadas (1 – 7) para confecção do meio LC Oligo (AFNOR, 1980). Para preparação de um litro de meio adiciona-se 0,5 mL de cada solução em volume complementar de água destilada. 22
- Tabela 2. Meio BG11.** Composição das soluções utilizadas para confecção do meio BG11 (RIPPKA, 1979). Para preparação de um litro de meio adiciona-se 1 mL de cada solução - estoque em volume complementar de água destilada e 1,5 g do componente sólido. 23
- Tabela 3. Tampão fosfato-salino (PBS).** Composição da solução PBS para diluição das culturas. Quantias dos reagentes para um litro de água destilada. 31
- Tabela 4. Condições ótimas para o cultivo algal.** Valores médios ($n = 3 \pm SD$) e desvios padrões de densidade celular no sexto dia (144 h) e de taxa de crescimento (dia^{-1}) dos controles em LC Oligo e em BG11 e nas melhores condições de vinhaça convencional (vc) e biodigerida (vb). Os números entre parênteses representam os desvios padrões da média. Letras minúsculas iguais representam tratamentos que não diferem significativamente. 38
- Tabela 5. Ativação fisiológica de *C. vulgaris* em meio LC Oligo.** Valores médios ($n = 3$, desvio padrão entre parênteses abaixo do valor médio) de densidade celular ($\text{células mL}^{-1} 10^6$), taxa de crescimento (dia^{-1}), concentrações totais de clorofila a (mg L^{-1}), concentrações de clorofila a por célula (pg célula^{-1}) e rendimentos fotossintéticos máximos (ϕ_m) e operacionais ($\phi_{m'}$) no final do experimento (144 h). Mesma letra representa tratamentos que não diferiram significativamente entre si. 42
- Tabela 6. Parâmetros fotossintéticos oriundos das curvas de luz.** Valores médios ($n = 3$, desvio padrão entre parênteses) de $\text{ETR}_{\text{relativa}}$ máxima (ETR_m), inclinação da curva ao início (α), intensidade luminosa de saturação (I_K) e perdas por respiração (R^B) para o controle em LC Oligo e as vinhaças convencional (vc) 60% e biodigerida (vb) 80% tratadas. 47
- Tabela 7. Caracterização das vinhaças pré e pós - cultivos.** Caracterização físico-química da vinhaça convencional filtrada 60% e da biodigerida filtrada 80% antes e após o cultivo de *C. vulgaris* aclimatada. Todas as concentrações reportadas são em mg L^{-1} , exceto K_2O ($\text{kg K}_2\text{O m}^{-3}$). 49

LISTA DE SÍMBOLOS

ATP – trifosfato de adenosina

DBO – demanda bioquímica de oxigênio

DQO – demanda química de oxigênio

ETR – eficiência no transporte de elétrons

HCl – ácido clorídrico

NADPH - fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NaOH – hidróxido de sódio

PAM - fluorescência com amplitude de pulso modulada

pH – potencial hidrogeniônico

PSI – fotossistema I

PSII – fotossistema II

Q_A – acceptor de elétrons plastoquinona A

qP – quenching (decaimento) fotoquímico

qN – quenching (decaimento) não fotoquímico na forma de fluorescência

NPQ – quenching (decaimento) não fotoquímico na forma de calor

Resumo

A vinhaça é um resíduo da indústria sucroalcooleira que, devido à presença de matéria orgânica e nutrientes minerais, tem sido utilizada para fertirrigação das próprias culturas de cana-de-açúcar. Porém, a composição desse resíduo limita sua aplicação no solo, pois pode levá-lo à salinização. A fermentação anaeróbia da vinhaça gera biogás que é usado como fonte de energia para a própria usina. Essa fermentação resulta na vinhaça biodigerida. Técnicas que permitam utilizar as vinhaças, convencionais ou biodigeridas, contribuem para um sistema de produção mais limpo e rentável. Propusemos nesta pesquisa, avaliar o uso de vinhaça tratada. Para tanto usamos vinhaça convencional e biodigerida, filtradas em argila esmectita e carvão ativado, ou centrifugadas. Nelas cultivamos *Chlorella vulgaris* (BEYERINCK, 1890). As vinhaças tratadas foram testadas em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%. Avaliamos diariamente a densidade celular, absorvância em 570 nm, pH e condutividade eletrolítica ao longo de seis dias. Com os resultados de densidade celular, calculamos as taxas de crescimento para cada tratamento. Os melhores crescimentos se deram em vinhaça convencional filtrada 60% e centrifugada 10% e, em vinhaça biodigerida filtrada 80% e centrifugada 20%. Em geral, as vinhaças filtradas suportaram o crescimento das microalgas em concentrações superiores em relação às centrifugadas. A produção de biomassa foi maior nos filtrados em comparação com centrifugados. Após aclimação da microalga em vinhaça avaliaram-se os parâmetros fotossintéticos e bioquímicos da biomassa produzida em vinhaça biodigerida filtrada 80% e em vinhaça convencional centrifugada 60%. Taxas de crescimento específicas de *C. vulgaris* de 1,6 d⁻¹ foram obtidas na vinhaça filtrada convencional 60% e 1,5 d⁻¹ na biodigerida filtrada 80%, representando aumentos de até 84 x nas densidades celulares em relação às iniciais. No controle LC Oligo esse valor foi de 0,9 d⁻¹ e no BG11 foi de 1,1 d⁻¹. Apesar do melhor crescimento algal nas vinhaças, a eficiência fotossintética e os parâmetros relacionados foram melhores no controle do que nas vinhaças. Esses resultados sugerem que a microalga na vinhaça possa ter utilizado a via mixotrófica como fonte de carbono. Observou-se que houve maior acúmulo de biomassa nos cultivos em vinhaça do que nos controles. Houve redução do conteúdo de carbono orgânico total dissolvido e de elementos minerais na vinhaça em até 50%, bem como da contaminação por fungos e bactérias ao final dos cultivos. Este estudo é uma contribuição para o conhecimento da fisiologia de microalgas em resíduos e para o desenvolvimento de uma produção de etanol mais sustentável.

Palavras chave: microalgas; filtragem; fotossíntese, resíduo sucroalcooleiro.

Abstract

Vinasse is a waste of sugarcane industry and, due to the presence of organic matter and mineral nutrients, it has been used for the irrigation of the sugarcane crops. However, its composition limits such application due to soil salinization. The anaerobic fermentation of vinasse generates biogas that is used as energy source in the sugarcane industry itself. The fermented vinasse results in biodigested vinasse. The development of techniques for residue use can contribute to cleaner production systems. In this research, we evaluated treated conventional and biodigested vinasses for the growth of *Chlorella vulgaris*. The treatment consisted of filtering the vinasses through smectite clay and activated carbon, or centrifugation. Concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100% of treated vinasses were tested. Cell density, absorbance at 570 nm, pH and electrolyte conductivity were quantified daily in a six day experiment. Based in cell density, specific growth rates were calculated. Growth rates higher than the controls were obtained in 60% conventional filtered vinasse and 10% conventional centrifuged one, as well as in 80% biodigested filtered vinasse and 20% biodigested centrifuged vinasse. In general, the filtered vinasse was superior in relation to the centrifuged one regarding higher residue concentration that supported microalgae growth. After microalgae acclimation we evaluated the photosynthetic performance of *C. vulgaris* in the best vinasses conditions and the biochemical composition of the biomass present in the vinasse, which besides the microalgae contained other microorganisms, such as bacteria and fungi, since it was not sterilized. Specific growth rate for *C. vulgaris* in 60% filtered conventional vinasse was 1.6 d^{-1} and 1.5 d^{-1} in the 80% filtered biodigested vinasse, representing increases of up to 84 x in cell density compared to the initial. In the LC Oligo control the growth rate was $\sim 0.9 \text{ d}^{-1}$ and in the BG11 it was $1,1 \text{ d}^{-1}$. Although the better *C. vulgaris* growth in the treated vinasses, photosynthetic efficiency and its related parameters were better in the control than in the vinasses. These results together with those of chlorophyll a concentration suggest that the microalgae have possibly used a mixotrophic metabolism while in the vinasses. We observed higher biomass accumulation in the vinasses than in the controls. A reduction of total dissolved organic carbon and dissolved mineral elements up to 50%, as well as bacteria and fungi, were detected in the vinasse after microalgae growth. This study is a contribution to the knowledge of microalgae physiology in a residue and to the development of cleaner ethanol production system.

Keywords: microalgae culture; filtering; photosynthesis; residue.

1.0 INTRODUÇÃO

Etanol é um combustível renovável produzido a partir da fermentação de extratos de vegetais que apresentam elevada concentração de carboidratos, como por exemplo a cana-de-açúcar e beterraba, dentre outros. O etanol ganha destaque mundialmente como possível substituto dos combustíveis fósseis, tal qual a gasolina, subproduto do petróleo. Após a crise do petróleo em meados da década de 70, teve início no Brasil o Programa Pró-álcool, em que o governo investiu no aumento do cultivo de cana-de-açúcar e na produção de etanol. Desde então as indústrias do setor vêm crescendo, com investimentos em produção e novas tecnologias. O Brasil é atualmente um dos grandes produtores de etanol da cana-de-açúcar do mundo com safra 2014/2015 de $28 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ de etanol (UNICA, 2015).

A produção de etanol gera considerável quantidade de resíduo, a vinhaça ou vinhoto, ou ainda vinhaça convencional e, dependendo da tecnologia empregada pela usina produtora e da natureza da matéria-prima utilizada, são gerados de 12 a 18 L de vinhaça por litro de etanol (EMBRAPA, 2011). Se a vinhaça for biodigerida, será gerado o biogás, usado pelas usinas sucro-alcooleiras como fonte de energia, mas seu poder poluidor permanece.

A vinhaça é um resíduo líquido, turbido, fétido, rico em matéria orgânica e em elementos minerais, incluindo nutrientes vegetais, dentre eles os nitratos e o potássio. Apresenta alta corrosividade, elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e baixo pH (~ pH 4). Essas características dão à vinhaça elevado poder contaminante, que é cerca de cem vezes maior do que o do esgoto doméstico (SILVA et al., 2007). Freire e Cortez (2000) mencionam ainda que, por causa de sua elevada DBO e temperatura com que é gerada, o descarte da vinhaça em ecossistemas aquáticos é nocivo a toda biota. Dada a esse e outros efeitos deletérios, tais como o potencial eutrofizador, a legislação brasileira proíbe seu descarte em corpos d'água. Isso obriga as indústrias do etanol a buscarem por outras formas de descarte.

Uma das alternativas de menor custo e amplamente utilizada como descarte da vinhaça é a irrigação dos solos das culturas de cana-de-açúcar, em terreno das próprias usinas, aproveitando assim os nutrientes para a fertilização. De acordo com Giachini e Ferraz (2009), essa adubação/fertirrigação causa uma redução do pH do solo, mas que

posteriormente é corrigido naturalmente através do estímulo sobre a atividade e a proliferação microbiana. Segundo os autores, outras vantagens no uso da vinhaça na fertirrigação das lavouras de cana-de-açúcar é a economia de adubo comercial e de água. Entretanto, essa atividade pode levar ao acúmulo de íons no solo, tornando-o inutilizável para culturas posteriores. A infiltração e a lixiviação desses íons podem acarretar a contaminação das águas subterrâneas e superficiais (SILVA et al., 2007). De acordo com Junqueira et al. (2009), a utilização de vinhaça para fertilização em solos agriculturáveis elevou a contaminação em aquíferos no município de Descalvado/SP. Tendo em vista que a produção da vinhaça tende a aumentar, conforme o aumento da demanda energética brasileira, os problemas com seu descarte também aumentarão.

Devido à riqueza em nutrientes, uma aplicação para a vinhaça é seu uso como meio de cultura para microalgas fotossintéticas. Esse uso tem como consequência a redução do poder eutrofizador da vinhaça, pois as microalgas transformam os nutrientes em biomassa. Essa biomassa algal carrega consigo lipídios, proteínas e carboidratos em quantidade significativa, além de moléculas específicas como os carotenos e outros compostos antioxidantes (CHIA et al., 2013a). São produtos com interesse nas industrial na área de suplemento nutricional, ração animal, cosméticos, medicamentos, biocombustível, dentre outras. Outra vantagem aliada ao crescimento algal é a fixação do gás carbônico, através da fotossíntese. Esse gás tem um papel importante no efeito estufa e o aumento de sua concentração na atmosfera contribui para o aumento das temperaturas globais e extremos climáticos (IPCC, 2013). Além de todos esses aspectos, aproveitar um resíduo líquido para cultivar microalgas pode reduzir o custo de produção algal, pois a água necessária em grande demanda em cultivos algais já está presente no resíduo.

Assim como mencionado por Silva et al. (2007), a vinhaça é um resíduo rico em nutrientes minerais, principalmente nitratos e potássio, e em matéria orgânica, o que lhe confere, ao mesmo tempo, altas capacidades fertilizantes e poluidoras. Ao ser utilizada para fertirrigação do solo, bem como para o cultivo algal, a vinhaça pode favorecer o desenvolvimento desses seres fotossintetizantes disponibilizando nutrientes essenciais aos seus crescimentos. Porém, o excesso desses nutrientes é prejudicial aos organismos, como demonstrado por Kadioglu e Algur (1992), os quais cultivaram *Chlamydomonas reinhardtii* em concentrações baixas (até 5%) de vinhaça e relataram que sua toxicidade deve-se ao alto potencial osmótico, gerado pela presença acentuada dos elementos minerais. No caso do cultivo algal, outra característica da vinhaça que pode prejudicar

seu uso como meio de cultura é a coloração escura. De acordo com Robles-González (2012), essa coloração da vinhaça deve-se à presença de melanoidinas, polímeros formados pela reação de Maillard entre açúcares e aminoácidos, e caramelos, formados pela degradação térmica do açúcar. Além disso, a elevada quantidade de material particulado na vinhaça dificulta a entrada de luz e, portanto, o processo fotossintético algal. Sendo assim, são necessários tratamentos desse resíduo para que ele possa ser utilizado para o fim de produção de biomassa algal.

Apesar da necessidade de tratamento, a vinhaça é um resíduo gerado em grande quantidade (12 a 18 L/L etanol), sendo um recurso barato para o cultivo de microalgas. Acién et al. (2012), que avaliaram os custos da produção de biomassa algal de *Scenedesmus almeriensis*, afirmam que os materiais utilizados para confecção dos meios e o uso de energia são custos significativos no ciclo de vida do produto. Sendo assim, o uso de resíduos líquidos na suplementação dos meios de cultivo e resíduos gasosos no borbulhamento das culturas são formas de tornar a biomassa algal um produto com preços mais competitivos. Nesse quesito, apesar da toxicidade, a vinhaça pode ser uma alternativa ao barateamento desses custos.

Nesta pesquisa buscamos primeiramente tratar a vinhaça para a remoção de sua cor e, assim viabilizar a entrada de luz fotossinteticamente ativa para que a microalga pudesse realizar a fotossíntese. Assim, a vinhaça foi filtrada ou centrifugada, removendo parte de sua cor e do material particulado. Testamos os processos em vinhaça convencional e biodigerida e, em seguida, cultivamos a microalga *Chlorella vulgaris* nas vinhaças tratadas sob condições ambientais controladas. Tendo em vista que vinhaça é um resíduo rico em elementos minerais não foram acrescidos nutrientes às vinhaças. Os experimentos em vinhaça foram comparados com controles em meio de cultura sintético e os resultados foram promissores.

Os resultados aqui apresentados resultaram em uma solicitação de patente submetida ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI), sob identificação 10 2015 024100 3, que contou com o apoio da Fundação de Apoio Institucional da Universidade Federal de São Carlos (FAI/UFSCar).

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etanol e vinhaça

O etanol é um dos biocombustíveis mais utilizados no mundo (BRASIL, 2007) e é originado da fermentação de extratos de vegetais ricos em carboidratos, como é o caso da beterraba (Europa), do milho (Estados Unidos) e da cana-de-açúcar na Austrália e no Brasil (SILVA et al., 2007). Nas usinas sucroalcooleiras brasileiras, a cana-de-açúcar é moída e o caldo produzido é precipitado, filtrado, fermentado, centrifugado, para separação das leveduras fermentadoras, e finalmente destilado. A partir dessa destilação é obtido o etanol, restando nesse processo a vinhaça (ZANG; FONSECA-ZANG; 2012).

Rica em matéria orgânica e em nutrientes minerais como o potássio, o cálcio e o magnésio, a vinhaça apresenta pH em torno de 4, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de ter uma temperatura de saída do destilador de 85 – 90 °C. Com essas características justifica-se seu alto poder poluente, que segundo Rosseto (1987) é maior do que o do esgoto doméstico. A principal aplicação dada à vinhaça é a fertirrigação dos próprios cultivos de cana-de-açúcar e, a dose a ser aplicada é definida com base no teor de potássio e em análise química do solo, pois seu excesso pode levar à salinização do mesmo. Tendo em vista que o transporte ou bombeamento de vinhaça para canais distantes mais do que 10 Km da matriz industrial das usinas é economicamente inviável, de acordo com os próprios funcionários da usina visitada neste trabalho, a aplicação da vinhaça na fertirrigação é limitada.

Em meio ao excedente de vinhaça produzido, insuficiência em seu descarte e demanda energética nas usinas, desenvolveu-se a tecnologia de biodigestão da vinhaça visando à produção energética (SZYMANSKY, 2010). De acordo com Luz et al. (2010) já se produzia energia por meio da combustão do bagaço e da palha da cana nas usinas, mas a biodigestão da vinhaça é um método mais rentável e econômico, pois resulta no biogás.

A biodigestão da vinhaça consiste em fermentá-la em biodigestores anaeróbios para gerar um biogás que contém metano e gás carbônico dentre outros compostos. Sua

queima é vantajosa em relação à queima de combustíveis fósseis, pois é mais barato e menos poluente (GRANATO; SILVA, 2002). De acordo com esses pesquisadores, a queima desse biogás é capaz de mover geradores e produzir energia elétrica, podendo sustentar as próprias usinas sucroalcooleiras, assim como ocorre nas usinas termelétricas. Lamonica (2006) analisou o potencial de geração de energia elétrica a partir da biodigestão da vinhaça de cana-de-açúcar (safra 2004/2005), e concluiu que poderiam ser produzidos 9.292 TJ/ano (2,6 TWh/ano ou $2,6 \cdot 10^9$ KWh/ano), representando 0,75% do consumo nacional de energia elétrica no ano de 2003.

Com a crescente prosperidade da tecnologia de biodigestão da vinhaça, possíveis aplicações para o resíduo biodigerido, evitando seu descarte diretamente no ambiente vem de encontro ao desenvolvimento sustentável.

2.2 Cultivo de microalgas em vinhaça

O grandioso volume de água que recobre a superfície terrestre possibilita a existência de uma ampla diversidade de algas, as quais se mostram importantes para manutenção do equilíbrio ambiental e, muitas vezes, na atividade econômica (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). As algas são organismos uni ou pluricelulares, autótrofos, que habitam principalmente ambientes aquáticos e são incluídas no Reino Protista.

Como organismos fotossintetizantes, as microalgas realizam a fixação do dióxido de carbono, um gás importante em relação ao efeito estufa. As microalgas sintetizam grande variedade de compostos orgânicos, desde simples carboidratos até polissacarídeos complexos, compostos com alto valor energético como os triglicerídeos, além de proteínas. De acordo com Borowitzka (2014), as microalgas são fonte de carotenóides, ficobilinas, vitaminas, esteróis e outras substâncias bioativas, bem como de ácidos graxos poli-insaturados, importantes para a saúde humana. Sendo produtoras de compostos bioativos, as microalgas encontram especial destaque como suplemento alimentar. Em comparação com vegetais vasculares, as microalgas podem ter até 50% de seu conteúdo de biomassa seca em proteínas, enquanto que nos vegetais superiores apenas algumas porções, como raízes, frutos e sementes são digeríveis e podem ser aproveitados nutricionalmente (BURLEW, 1976).

A espécie *Chlorella vulgaris*, que foi utilizada neste trabalho, é cosmopolita e robusta, podendo resistir a condições ambientais que seriam estressantes para outras algas. Segundo Marchello et al. (2015) essa espécie mostrou-se dominante na comunidade de efluente secundário resultante do tratamento de esgoto doméstico, reduzindo o potencial eutrofizante e a quantidade de bactérias heterotróficas, incluindo coliformes fecais, nesse efluente. Alves (2012) reportou a remoção de fósforo e nitrogênio em efluente sanitário inoculado com *C. vulgaris*. O autor chama a atenção para o fato de que utilizar microalgas como sistema de polimento em efluente secundário gera menos poluentes do que os processos químicos conhecidos para a remoção dos nutrientes.

Devido à qualidade nutricional e presença de água, a vinhaça pode ser um bom meio para o desenvolvimento algal, tendo sido realizados diversos estudos nesse sentido. Oliveira (1988) foi uma das pioneiras em estudos sobre o cultivo de microalgas utilizando vinhaça. Em seus testes, que incluíam vinhaça em concentração de 0,1 e 0,5% com adição de ureia como fonte de nitrogênio, foi observado o crescimento heterotrófico da espécie *Chlorella vulgaris*, em ausência total de luz, e também o crescimento mixotrófico, em presença de luz, indicando a importância dos nutrientes e da matéria orgânica oferecida pelo resíduo. Entretanto, foi mais recentemente, com o interesse na produção de microalgas em larga escala, que cultivos de microalgas fotossintéticas em vinhaça ganharam impulso. Em 2010, Barrocal et al. otimizaram o crescimento da cianobactéria fotossintética, *Spirulina maxima*, em meio sintético acrescido de 0,5% de vinhaça de beterraba. Bonini (2012) cultivou a cianobactéria *Aphanothece microscópica* e a Chlorophyceae *Chlorella vulgaris* em vinhaça e em meio contendo fontes de carbono orgânico, e demonstrou que houve redução na concentração de glicose, na DQO e no potássio dos meios.

No ano de 2013, foram divulgados três trabalhos com cultivos de microalgas em vinhaça. Marques (2013) cultivou *C. vulgaris* em vinhaça biodigerida acrescida de esgoto doméstico até concentração de 2 g DQO/L e obteve taxa de crescimento 0,76 dia⁻¹. Vieira (2013) demonstrou que a vinhaça diluída constitui um meio orgânico que resulta em maior rendimento de biomassa algal do que a glicerina. O autor obteve densidade algal final de 1,8 10⁷ células mL⁻¹ em vinhaça 10%. Lóio (2013) tratou vinhaça com polímeros filtrantes e coagulantes (polímero LAB TAE 409 20 mg L⁻¹) objetivando sua clarificação. O autor cultivou *C. vulgaris* e obteve taxas de crescimento máximas de 0,15 d⁻¹ em um período de 10 dias.

Em 2014, outras três pesquisas tratando de microalgas em vinhaça vieram a público. Budyono et al. (2014) mostrou que quantidades superiores a 0,8% de vinhaça biodigerida ocasionam redução da produção de pigmentos fotossintéticos e degradação de membranas na Cyanobacteria *Spirulina platensis*, com taxas de crescimento máximas de 0,15 d⁻¹. Ramirez et al. (2014) cultivou *Scenedesmus* sp. em meio inorgânico com até 40% de vinhaça, obtendo 0,45 g L⁻¹ de biomassa final. Coca et al. (2014) obtiveram maiores concentrações de proteínas em *Spirulina platensis* em meio de cultura sintético contendo até 0,1 g L⁻¹ de vinhaça obtendo 3,6 g L⁻¹ de biomassa.

De acordo com Bohnenberger (2012), a manipulação das características bioquímicas e de temperatura dos cultivos algais pode ampliar a disponibilidade dos compostos que elas sintetizam e permitir um uso mais direcionado da biomassa algal. Segundo apresentado em Marques (2013), a composição da biomassa possibilita sua aplicação na produção de biocombustíveis e, os gases liberados no processo de anaerobiose, como gás carbônico e metano, podem encontrar destino na geração de energia.

Entretanto, cultivar microalgas em resíduos significa ter outros organismos convivendo e habitando o mesmo meio. *Chlorella vulgaris* cresce em meio contendo levedura, como já mostrado na literatura em cultivos sinérgicos, onde um organismo contribui ao crescimento do outro provendo nutriente (CHEIRSILP et al., 2011). Estudos mostram estímulo e maior rendimento em cultivos mistos, considerando consórcios de microorganismos (GONZALEZ; BASHAN, 2000;). Apesar da presença de leveduras e bactérias nas culturas, esta pesquisa restringiu-se ao estudo da microalga *C. vulgaris*. Portanto, a composição bioquímica apresentada nesta pesquisa refere-se àquela do consorcio *C. vulgaris*, fungos e bactérias. As informações obtidas são importantes pois permitem o direcionamento da aplicação da biomassa obtida.

Assim, cultivar microalgas em vinhaça é um desafio apesar do valor nutritivo desse resíduo. Os motivos são vários, sua coloração marrom escura dificulta a entrada de luz, o elevado teor nutritivo aumenta sua condutividade, podendo causar problemas iônicos às microalgas, a contaminação por heterótrofos aliado à constituição da vinhaça contribuem para as dificuldades. Essa somatória de fatores torna a vinhaça tóxica às microalgas, levando à necessidade de elevadas diluições do resíduo para que seja possível o cultivo algal. Por outro lado, tratar previamente a vinhaça pode auxiliar no desenvolvimento das microalgas. Esta pesquisa aborda o tratamento de duas vinhaças,

uma biodigerida e outra convencional, aos olhos do cultivo microalgal, enfocando na remoção da cor para o uso do resíduo em alta concentração.

2.3 Fisiologia fotossintética de microalgas

As microalgas, como organismos fotossintetizantes, são os produtores em ecossistemas aquáticos, sintetizando carboidratos a partir de constituintes inorgânicos e suportando toda a cadeia trófica nesses ambientes (Reynolds, 2007).

A fotossíntese pode ser didaticamente dividida em duas etapas, chamadas de etapa fotoquímica, demonstrada na **figura 1**, e etapa bioquímica. Na etapa fotoquímica a energia luminosa é captada, ocorre a quebra das moléculas de água, geração de oxigênio, síntese de ATP e NADPH. No início dessa etapa os fótons de energia luminosa incidem sobre complexos moleculares conhecidos como fotossistema II (PSII), presentes nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, e geram uma energia de ressonância que faz vibrar as clorofilas e outros pigmentos presentes no local. Graças ao sistema antena e o seu conjunto de pigmentos, a energia luminosa é captada e transferida ao par de clorofilas a P680 no centro de reação. Deste, partem os elétrons excitados, que serão conduzidos através de uma cadeia transportadora de elétrons composta por proteínas presentes nas membranas dos tilacóides do cloroplasto (TAIZ; ZEIGER, 2002).

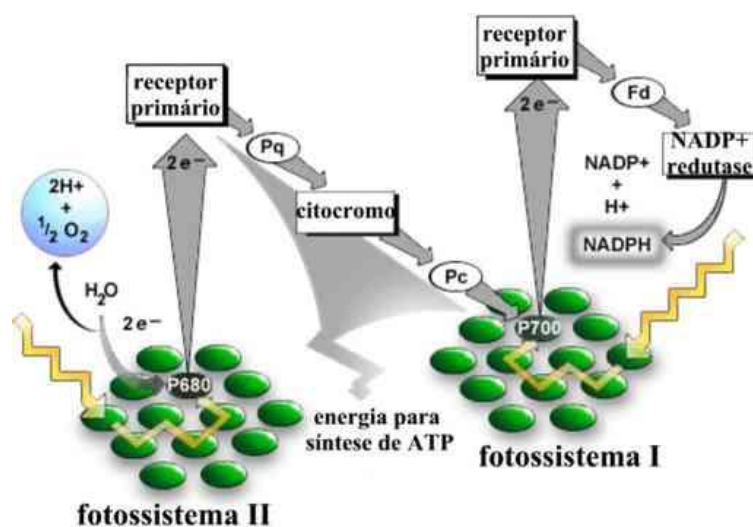


Figura 1. Etapa fotoquímica da fotossíntese. Esquema mostrando os fotossistemas I e II, e a cadeia transportadora de elétrons. Fonte: RAVEN (2007).

A plastoquinona A (Q_A) é o primeiro acceptor e transportador móvel do elétron. A dissociação da água irá liberar elétrons para as clorofilas que os perderam, além de prótons para o estroma. A cada duas moléculas de água hidrolisadas, dois íons OH^- se unem, formando uma molécula de água oxigenada (H_2O_2) e, a cada duas dessas moléculas decompostas, uma molécula de oxigênio (O_2) é produzida e duas de água são recuperadas. Portanto, nessa etapa temos o consumo de H_2O , que fornecerá prótons e elétrons, e a produção de O_2 , que será liberado para o ambiente (RAVEN, 2007).

Os elétrons transportados pela plastoquinona passam então para o complexo Citocromo b6-f e os prótons transportados são liberados para o lúmen dos tilacóides, juntamente com mais dois prótons. Os elétrons são transferidos para a Plastocianina, um transportador móvel que os levará até o fotossistema I (PSI), onde receberão mais energia de novos fótons. Essa energia fará os pigmentos desse complexo ressonarem até chegar ao par de clorofilas P_{700} , de onde serão liberados dois elétrons. Os elétrons energizados são transferidos então para outro transportador, a Ferredoxina, que os transportará até a Ferredoxina-NADP-redutase. Essa enzima irá transferir os elétrons para o $NADP^+$, que se unirá a um próton e será convertido em NADPH. O gradiente de concentração de prótons no lúmen dos tilacóides, gerado durante o transporte de elétrons, causa uma redução de pH nesse local. Essa condição é responsável por ativar o complexo ATP-sintase, o qual irá fosforilar moléculas de ADP em moléculas de ATP (TAIZ; ZEIGER, 2002). Portanto, nesta fase dependente da luz são gerados O_2 , que é liberado ao ambiente, ATP e NADPH, que são compostos energéticos e com poder redutor para a célula. Este processo recebe o nome de fotofosforilação acíclica. Mas, em uma via alternativa, a fotofosforilação cíclica gera ATP via citocromo bf, plastocianina e fotossistema I.

Na etapa bioquímica, as moléculas de ATP e NADP serão usadas na fixação do CO_2 , que tem como produto final a glicose. A enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo) é a enzima principal nesse processo e responsável por catalizar a inserção do C oriundo do CO_2 via ligação covalente à molécula de ribulose 1,5-bifosfato, que é imediatamente quebrada em 2 moléculas de 3-fosfoglicerato.

Mecanismos de concentração de carbono são comuns em microalgas como por exemplo a locação da enzima Rubisco em regiões específicas da célula, evitando o contato com o O_2 . Outro mecanismo presente é a capacidade de concentração do íon bicarbonato (HCO_3^-) e a de conversão do bicarbonato em CO_2 na região celular de

localização de RuBisCo (MORONEY; SOMANCHI, 1999). Dessa maneira, a capacidade fotossintética algal e, conseqüentemente, de fixação de carbono, e geração de biomassa podem ser intensificada.

Devido à necessidade dos produtos da primeira etapa da fotossíntese (etapa fotoquímica) para a ocorrência da fixação de carbono, a produção de glicose na etapa bioquímica é diretamente proporcional à geração de ATP e NADPH na etapa fotoquímica da fotossíntese. A formação das moléculas orgânicas depende da cadeia transportadora de elétrons que ocorre na etapa fotoquímica, cuja eficiência pode ser mensurada. O desenvolvimento da fluorometria de pulso modulado foi um grande impulsionador no entendimento dos mecanismos fotossintéticos (CAMPOSTRINI, 2010).

Morris et al. (2008) mostraram que a taxa de transporte de elétrons (ETR) pode ser calculada a partir de medidas de fluorescência com amplitude de pulso modulada (PAM). Segundo os autores, há fortes indícios de que esta se relacione às medidas obtidas pelo método de de determinação de produção primária através da incorporação do ^{14}C . Napoléon e Claquin (2012) mostraram que parece, de fato, haver uma relação entre ETR e fixação do CO_2 no fitoplâncton e, que essa relação não é linear, mas sim logarítmica. Barranguet e Kromkamp (2000) ressaltaram que a fluorescência do fotossistema II através da técnica da fluorescência PAM pode ser útil para análise da produtividade primária, desde que se utilize uma conversão adequada. Entretanto, esta conversão ainda está por ser publicada e, para os autores, novos estudos são necessários para que medidas de ETR possam ser relacionadas à produtividade primária.

A fluorescência com amplitude de pulso modulada fornece informações precisas sobre a eficiência fotossintética, permitindo inferir sobre a qualidade fisiológica algal. Informações sobre a energia que segue para a fotoquímica da fotossíntese ou que é perdida em decorrência de situações de estresse são facilmente detectadas. De acordo com Lombardi e Maldonado (2011), problemas no fotossistema II (principalmente, pois é neste que ocorre a maior parte da fluorescência), podem ser detectados através da fluorescência com amplitude de pulso modulada.

Assim, ao usarmos a técnica fluorescência com amplitude de pulso modulada nesta pesquisa, pudemos inferir sobre o estado fisiológico relativo à fotossíntese da microalga.

3.0 OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi avaliar o crescimento de *Chlorella vulgaris* quanto aos aspectos cinéticos e ecofisiológicos em vinhaças convencional e biodigerida tratadas e em baixa diluição. Para que isso se tornasse possível, utilizaram-se dois procedimentos para tratamento prévio das vinhaças: filtração ou centrifugação.

3.1 Objetivos Específicos

- a) Cultivar *Chlorella vulgaris* em condições controladas de laboratório, tendo vinhaças convencional e biodigerida tratadas como meio nutritivo ou parte dele;
- b) Avaliar o crescimento (cinética e produção algal) de *Chlorella vulgaris* nas vinhaças convencional e biodigerida tratadas;
- c) Definir as melhores concentrações das vinhaças convencional e biodigerida tratadas para o crescimento algal;
- d) Analisar a influência dos processos de ativação fisiológica e aclimação em vinhaça no crescimento do organismo de interesse;
- e) Avaliar os parâmetros fotossintéticos das microalgas cultivadas nas condições selecionadas;
- f) Quantificar os contaminantes heterotróficos (bactérias e fungos), nos cultivos algais;
- g) Determinar as quantias de proteínas e carboidratos na biomassa produzida.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados e os resultados obtidos neste trabalho foram divididos em duas etapas principais. Na primeira etapa, realizaram-se cultivos de rastreamento (10 – 100% vinhaças) com *C. vulgaris*. Definimos na primeira etapa o tratamento das vinhaças e a concentração que rendeu maior crescimento e biomassa algal para prosseguir à etapa número 2 deste estudo. Os melhores rendimentos de biomassa algal foram obtidos em vinhaça biodigerida filtrada 80% e vinhaça convencional filtrada 60% que, portanto, seguiram para a segunda etapa. Nesta detalharam-se os aspectos da fisiologia algal em vinhaça, tendo como base o metabolismo fotossintético. Em ambas as etapas, as vinhaças utilizadas e os tratamentos a que foram submetidas foram os mesmos, assim como os cuidados com as culturas algais.

4.1 Vinhaças

Duas vinhaças foram usadas neste estudo, a vinhaça convencional e a biodigerida. A vinhaça convencional é resultante do processo de destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado destinado à produção de etanol (SILVA et al., 2007). Já a vinhaça biodigerida, consiste na vinhaça convencional que sofreu uma biodigestão anaeróbia, visando à produção de biofertilizante e biogás, usado como fonte de energia elétrica na indústria sucroalcooleira que a produziu (SILVA et al., 2010). Essas vinhaças foram doadas pela Usina São Martinho, localizada na cidade de Pradópolis/SP, em junho de 2014. Tendo em vista que a safra de moagem de cana nesse ano iniciou-se no final do mês de abril e que a vinhaça começou a ser produzida em meados de maio, de acordo com informações fornecidas pela própria Usina, realizamos a coleta do resíduo na fase inicial de sua geração. Observamos que na Usina São Martinho, toda a vinhaça convencional gerada é destinada à fertirrigação das plantações ou à biodigestão, não havendo, portanto, tanques de armazenamento, mas apenas tubulações percorridas pelo resíduo.

A coleta das vinhaças foi feita usando-se galões plásticos previamente lavados com água e detergente neutro, enxaguados e deixados por 24 h em HCl 10%. Foram enxaguados com água destilada, secos em temperatura ambiente e estavam prontos para uso. Foram coletados 40 L de vinhaça convencional e 40 L de vinhaça biodigerida. No laboratório, as vinhaças, que foram obtidas em temperaturas próximas de 95° C, foram deixadas resfriar naturalmente até atingirem 40° C, o que demorou cerca de 10 h. Em seguida foram distribuídas em garrafas plásticas descartáveis com capacidade de 1 L, as quais sofreram o mesmo procedimento de lavagem e enxague dos galões de coleta. Essas garrafas foram colocadas em freezer à temperatura de – 6 °C e estocadas congeladas até o momento de uso.

Um dos processos de tratamento da vinhaça constou de, primeiramente, filtrá-la em argila esmectita e, posteriormente, em carvão ativado, o que contribuiu para reduzir a quantidade de material particulado do meio, clarificando-o e, simultaneamente elevando seu pH (CANDIDO, 2014). Esse processo de filtragem encontra-se descrito em detalhes no depósito de patente número BR 10 2015 024100 3 do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Desse modo, a vinhaça tornou-se mais adequada ao cultivo algal. Seguindo essa ideia, foi realizado esse procedimento tanto com a vinhaça convencional como também com a biodigerida.

Assim, de acordo com o cultivo a ser realizado, descongelava-se volume necessário de vinhaça para imediatamente tratá-la. Dois dias antes do início do cultivo, a vinhaça era filtrada, passando por funis com capacidade máxima de 150 ml contendo uma folha de papel de filtro e volume de 50 mL, correspondente a quatro centímetros de altura em relação à base do funil, com uma mistura de argila esmectita e areia grossa de construção, com granulometria de 0,5 a 1,0 mm. Posteriormente, esse filtrado inicial era submetido à filtragem de maneira similar, mas com carvão ativado no lugar da argila, gerando o filtrado final. A **figura 2** esquematiza o procedimento realizado.

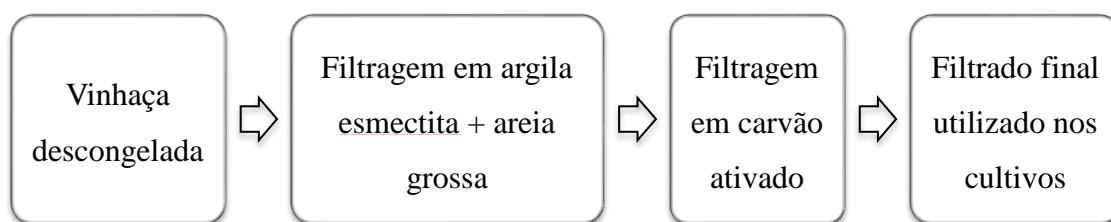


Figura 2. Filtragem das vinhaças. Esquema representando o processo de filtragem das vinhaças convencional e biodigerida.

Na primeira etapa do estudo e para cada uma das vinhaças avaliou-se o crescimento algal em 10 tratamentos, equivalentes às concentrações de vinhaças filtradas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%. O controle constou do cultivo da microalga em meio sintético autoclavado, sem qualquer adição de vinhaça. Todos os tratamentos foram feitos com 3 réplicas experimentais. Os frascos de cultivo continham volume de 150 mL e as diluições das vinhaças foram realizadas com água destilada autoclavada. O pH inicial das culturas foi ajustado para 6,8 - 7,0 utilizando-se HCl ou NaOH, antes da microalga ser inoculada.

A fim de termos uma maneira para avaliar a eficiência do processo de filtração realizado em ambas as vinhaças quanto à capacidade de tratamento dos resíduos, buscou-se efetuar os cultivos algais nas mesmas diluições descritas anteriormente nas vinhaças brutas. Entretanto, por meio de testes preliminares, percebemos a presença de grande quantidade de leveduras nas vinhaças brutas no início dos experimentos (10^5 células mL^{-1}) na vinhaça convencional e 10^8 células mL^{-1} na vinhaça biodigerida. De acordo com Martins e Batistote (2012), as leveduras são fungos unicelulares fermentadores, de formato esférico, oval ou elíptico e com dimensões que variam de acordo com diversos fatores, como a espécie, nutrição e idade. Nas análises prévias, as leveduras apresentaram um aspecto morfológico e dimensões visualmente semelhantes às de *Chlorella vulgaris* e, por isso, a contagem sob o microscópio óptico para obtenção da densidade celular da microalga tornou-se inviável nesses cultivos. Além disso, a grande densidade de contaminantes poderia interferir no crescimento da alga através de competição por nutrientes ou mesmo reduzindo a entrada de luz no meio devido ao aumento da turbidez provocado pelo sombreamento celular. Assim, o cultivo da microalga em vinhaça bruta não foi realizado.

Nas usinas sucroalcooleiras, uma das maneiras utilizadas para se separar as leveduras da vinhaça, objetivando a obtenção da biomassa seca de leveduras e seu destino à produção de rações, é a centrifugação (MEURER et al., 2000). Dessa maneira, optamos por utilizar também esse método, submetendo as vinhaças à centrifugação por 10 minutos a 4500 rpm e 10 °C em centrífuga refrigerada (Sorvall-Thermo, modelo Legend XTR, E.U.A) antes do uso nos experimentos. Os inóculos algais foram efetuados apenas quando os líquidos resultantes atingiram a temperatura de 21°C. Foram realizados testes prévios e, assim, selecionados para os tratamentos os menores

valores de velocidade de rotação (4500 rpm) e tempo de centrifugação (10 min) que resultaram na remoção de qualquer levedura nas suspensões de vinhaças.

4.2 Culturas algais

A cepa da microalga *Chlorella vulgaris* foi isolada da Estação de Tratamento de Esgoto de Água Vermelha, município de São Carlos/SP e mantida no Banco de algas do Laboratório de Biotecnologia de Algas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), vinculado ao Departamento de Botânica, sob a numeração LBA 01. Todas as culturas foram mantidas em frascos plásticos para cultivo de células com 250 mL de capacidade e tampa ventilada por filtro embutido, contendo 150 mL de meio. Os frascos de cultivo foram lavados com água e detergente neutro, imersos em ácido clorídrico 10%, e finalmente enxaguados com água deionizada e deixados secar em estufa a 45 °C. Como controle foram utilizadas amostras cultivadas em meio LC Oligo (AFNOR, 1980) com pH ajustado para 7,0, cuja composição é mostrada na **tabela 1**.

Tabela 1. Meio LC Oligo. Composição das soluções utilizadas (1 – 7) para confecção do meio LC Oligo (AFNOR, 1980). Para preparação de um litro de meio adiciona-se 0,5 mL de cada solução em volume complementar de água destilada.

Solução	Componentes	Concentração final (mol L ⁻¹)
1	Nitrato de sódio (NaNO ₃)	4,7 x 10 ⁻⁴
2	Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	5,0 x 10 ⁻⁴
3	Nitrato de cálcio (Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O)	1,7 x 10 ⁻⁴
4	Sulfato de magnésio (MgSO ₄ · H ₂ O)	1,2 x 10 ⁻⁴
5	Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	2,3 x 10 ⁻⁴
6	Sulfato de cobre (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	6,0 x 10 ⁻⁸
	Molibdato de amônia ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O)	2,4 x 10 ⁻⁸
	Sulfato de zinco (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	1,0 x 10 ⁻⁷
	Cloreto de cobalto (CoCl ₂) · 6H ₂ O	1,3 x 10 ⁻⁷
	Sulfato de manganês (MnSO ₄ · H ₂ O)	1,2 x 10 ⁻⁷
	Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	4,9 x 10 ⁻⁷

7	Citrato de ferro ($C_6H_5FeO_7 \cdot 5H_2O$)	$2,9 \times 10^{-4}$
	Cloreto de ferro ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	$3,1 \times 10^{-4}$
	Sulfato de ferro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	$2,2 \times 10^{-4}$
8	Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$)	$1,8 \times 10^{-4}$

Apesar de ser muito utilizado em testes de toxicidade e em culturas algais, o meio LC Oligo é relativamente pobre em nutrientes se comparado com outros meios sintéticos como, por exemplo, o meio BG11 (RIPPKA, 1979). Com o propósito de propiciar comparações com culturas em meio sintético que apresente alto rendimento celular, realizamos também um cultivo em triplicata de *C. vulgaris* em meio BG11. Esse é um meio altamente nutritivo e comumente utilizado em culturas em larga escala, porém com um custo de preparo maior. A **tabela 2** apresenta a composição desse meio e a **figura 3**, um fluxograma dos experimentos realizados.

Tabela 2. Meio BG11. Composição das soluções utilizadas para confecção do meio BG11 (RIPPKA, 1979). Para preparação de um litro de meio adiciona-se 1 mL de cada solução - estoque em volume complementar de água destilada e 1,5 g do componente sólido.

Solução	Componentes	Concentração final ($mol L^{-1}$)
1	Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)	$3,1 \times 10^{-5}$
2	Citrato férrico de amônio	$\sim 3 \times 10^{-5}$
3	Nitrato de sódio ($NaNO_3$) – sólido	$1,8 \times 10^{-2}$
4	Fosfato de potássio bibásico ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	$1,8 \times 10^{-4}$
5	Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	$3,0 \times 10^{-4}$
6	Cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	$2,5 \times 10^{-4}$
7	Carbonato de sódio (Na_2CO_3)	$1,9 \times 10^{-4}$
8	EDTA ($MgNa_2EDTA \cdot H_2O$)	$2,8 \times 10^{-6}$
9	Ácido bórico (H_3BO_3)	$4,6 \times 10^{-5}$
	Cloreto de manganês ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	$9,5 \times 10^{-6}$
	Sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 5H_2O$)	$7,7 \times 10^{-7}$
	Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	$3,6 \times 10^{-7}$
	Molibdato de sódio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	$1,6 \times 10^{-6}$
	Nitrato de cobalto ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	$1,7 \times 10^{-7}$

Experimentos anteriores feitos em nosso laboratório mostraram que a esterilização em autoclave de meios contendo vinhaça modifica a sua turbidez. Esse resíduo é contaminado por diversos grupos de microrganismos e, mesmo após as tentativas de esterilização e manipulação em cabine de fluxo, a contaminação persistiu. Sendo assim, os procedimentos de manipulação dos cultivos foram realizados sem esse cuidado, nos aproximando das condições de manipulação da vinhaça nas indústrias sucroalcooleiras. A diluição das vinhaças para os experimentos foram feitas com água deionizada autoclavada a 121 °C, 1 atm durante 20 minutos, para evitar a contaminação externa, porém as vinhaças não sofreram qualquer tipo de esterilização.

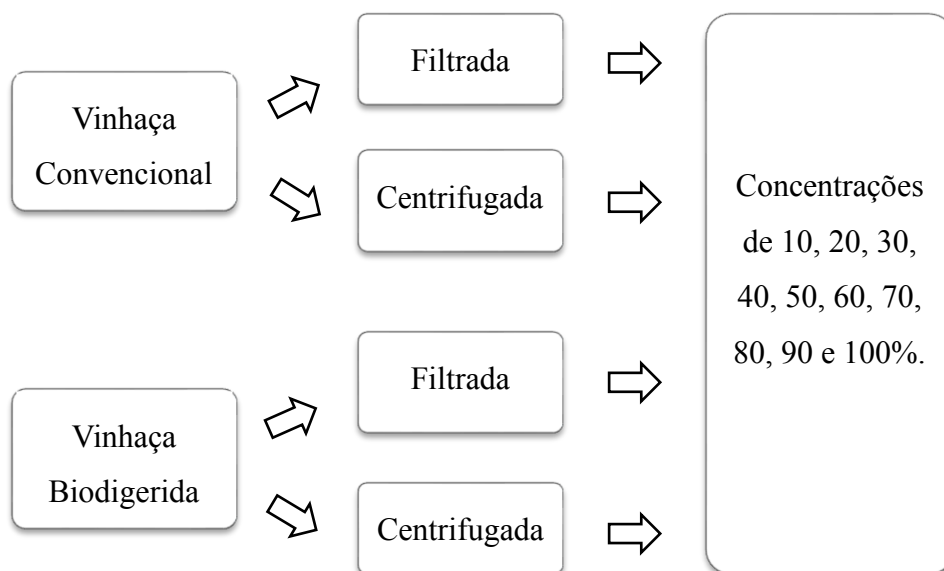


Figura 3. Fluxograma dos experimentos realizados. Tratamentos das vinhaças convencional e biodigerida utilizados nos cultivos de *Chlorella vulgaris*.

Os meios com vinhaças filtradas ou centrifugadas e os controles foram inoculados com a concentração celular inicial de 5×10^4 células mL⁻¹. As células inoculadas foram obtidas de culturas na primeira metade da fase exponencial de crescimento, de acordo com o sugerido em Lombardi e Maldonado (2011). Na fase exponencial, a quantidade de proteínas nas células algais aumenta devido à síntese de enzimas envolvidas nos processos de absorção e assimilação dos nutrientes e à

produção dos demais compostos nitrogenados estruturais (AIDAR et al., 1991). Portanto, nessa etapa as células encontram-se metabolicamente mais ativas e aptas a se desenvolverem em um novo meio. Acompanhando as curvas de crescimento das culturas estoque, percebemos que esse período ideal para repicagem correspondeu ao terceiro dia de cultivo das algas no meio LC Oligo.

Os frascos contendo os respectivos meios inoculados foram mantidos em uma sala de cultivo com condições padronizadas de temperatura, de 24 ± 2 °C e luminosidade, gerada por lâmpadas fluorescentes. Os frascos foram distanciados das lâmpadas dependendo da concentração dos meios contidos e sua turbidez, de forma que, na parte de trás dos frascos, a luminosidade refletida era de $150 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Logo, os frascos com maiores concentrações de vinhaça, que eram menos transparentes à luz, ficaram mais próximos da fonte luminosa. Para as medições desse parâmetro foi utilizado um sensor quântico de luz da marca Spectrum Technologies (E.U.A.). Dessa forma as algas em seu interior desfrutaram da mesma intensidade luminosa que os tratamentos mais diluídos.

Experimentos preliminares, que utilizaram as mesmas condições descritas anteriormente, mostraram que borbulhar culturas de microalgas em vinhaça com ar ambiente foi prejudicial ao crescimento, por isso todos os tratamentos foram realizados sem borbulhamento de ar.

As microalgas foram ativadas fisiologicamente (aclimatação) a fim de otimizar seu crescimento em vinhaça somente para os experimentos da etapa 2. O procedimento de aclimatação, promovido por meio de diversas repicagens é descrito abaixo.

A ativação fisiológica é importante para que a cultura manifeste ajustes fisiológicos de acordo com o meio em que está inserida. Como a microalga foi obtida de banco de cultura, a mesma foi fisiologicamente aclimatada ou reativada ao meio LC Oligo (WOOD et al., 2005). Em geral, cerca de 4 ou 5 repicagens são suficientes para que se estabilize a taxa de crescimento, o que pode ser interpretado como ajuste fisiológico às condições experimentais.

As culturas da aclimatação foram iniciadas com uma alíquota da cepa *C. vulgaris* oriunda do banco de manutenção de cepas do Laboratório de Biotecnologia de Algas. Quando a cultura atingiu a metade de sua fase exponencial, inoculou-se 5×10^4 células mL^{-1} em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio LC Oligo. Esse processo de repicagem foi repetido por diversas vezes até taxa de crescimento constante. Durante a aclimatação, as culturas foram monitoradas para densidade celular

(contagem de células ao microscópio óptico), rendimento fotossintético máximo e efetivo (fluorímetro Phyto PAM) e fluorescência da clorofila **a**.

4.3 Parâmetros monitorados nos experimentos

As vinhaças usadas foram caracterizadas físico-quimicamente. Para isso o resíduo foi enviado ao laboratório São Lucas – ASL Análises Ambientais, localizado em Rio Claro, onde foi submetido a protocolo padrão de análise de vinhaças. O objetivo dessas caracterizações foi o de comparar os resíduos antes e após o cultivo algal, fornecendo assim informações sobre a atividade biológica dos microrganismos, incluindo as microalgas, nas vinhaças.

Os cultivos tiveram a duração de 6 dias e as culturas foram amostradas diariamente e submetidas à determinações de densidade celular, taxa de crescimento, absorvância a 570 nm, pH e condutividade. Essas determinações foram realizadas nos experimentos da etapa 1 e da etapa 2.

A concentração de carbono e nitrogênio orgânico total dissolvidos foram determinadas nas vinhaças. Em relação à atividade da microalga na cultura, foi determinada a eficiência fotossintética máxima e operacional, e outros parâmetros relacionados à fotossíntese, e.g., decaimentos de fluorescência, taxa de transporte de elétrons e intensidade luminosa de saturação. A composição bioquímica da biomassa total presente nos cultivos foi quantificada através da determinação de proteínas totais e carboidratos totais. Todas essas determinações foram realizadas somente na etapa 2 dos experimentos. Abaixo são descritos os detalhes de cada uma das determinações mencionadas acima.

DENSIDADE CELULAR – A densidade celular foi obtida por meio da contagem manual de células realizada em câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico Nikon, modelo Eclipse E200 (Japão) com ampliação de 400 vezes. Para a contagem, as amostras foram fixadas com formaldeído 4%. Nascimento et al. (2011) compararam a eficácia desse método de contagem com sistemas automatizados destinados à área hematológica para contagem de células sanguíneas e perceberam equivalência nessas duas metodologias, indicando elevada confiabilidade do método manual de contagem, daí sua utilização.

TAXA DE CRESCIMENTO – As taxas de crescimento populacional foram obtidas por meio de regressão linear do logaritmo natural da densidade celular na fase exponencial de crescimento, cujo coeficiente angular equivale à taxa de crescimento específica da microalga para a condição analisada.

ABSORBÂNCIA 570 nm – A absorvância em 570 nm foi mensurada em espectrofotômetro FEMTO Scan ® modelo 800 XI (Brasil) e nos mostrou a quantidade de partículas totais do meio, incluindo possíveis agentes contaminantes, como fungos e bactérias. Gris et al. (2011) usaram a mesma medida para avaliar a biomassa total ao final de culturas unialgais em fotobiorreatores, mostrando a relação dessa medida com a quantidade total de partículas presentes no meio, sejam elas fotossintetizantes ou não. Assim, em nossos experimentos, as comparações entre as curvas de densidade celular da alga e as de absorvância a 570 nm indicaram a variação na contaminação em cada amostra durante o período experimental.

CONDUTIVIDADE e pH – A condutividade foi quantificada utilizando-se um condutivímetro Hach ® hq 40d Multi (E.U.A.), com o objetivo de avaliar o consumo e a dissolução de íons nas culturas. A concentração de íons hidrogênio foi medida em um pHmetro Logen Scientific ® (Brasil).

CONCENTRAÇÃO DA CLOROFILA a – A concentração de clorofila **a** (*in vivo*) foi determinada utilizando um fluorímetro Trilogy (Turner Designs - E.U.A.). Para a determinação da concentração de clorofila **a** *in vivo*, o fluorímetro foi calibrado obtendo-se uma equação que relaciona a fluorescência à concentração de clorofila **a** (em mg L⁻¹) no meio, como descrito na equação 1.

$$(1) \quad [\text{Clorofila a}] = (\text{Fluorescência} + 2870,2) / 7064,4$$

Dividindo-se os valores obtidos pelas densidades celulares diárias de cada cultura, obtiveram-se os valores de clorofila a por célula (pg célula⁻¹).

EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA e PARÂMETROS RELACIONADOS – A eficiência fotossintética e os parâmetros relacionados foram determinados em um

fluorímetro Phyto PAM (Walz - Alemanha). Como esse método quantifica a emissão de fluorescência e a relaciona com a fotossíntese e, a vinhaça possui compostos fluorescentes tais quais os materiais tanínicos e outros aromáticos, para esta determinação as algas foram removidas do resíduo e colocadas em meio LC Oligo.

Os decaimentos relativos ao metabolismo fotossintético, qP, qN e NPQ indicam sobre o caminho do elétron após excitação da clorofila a. O decaimento fotoquímico (qP) indica a proporção de energia luminosa que é utilizada nos processos fotossintéticos. O decaimento não fotoquímico (qN) está relacionado à fração da energia luminosa não-utilizada na fotossíntese, enquanto o decaimento não fotoquímico NPQ, mostra-se proporcional à energia dissipada na forma de calor (CAMPOSTRINI, 2010; MARTINS et al., 2009). Para calcular esses valores utilizamos as medidas de fluorescências oferecidas pelo equipamento Phyto PAM e emitidas durante a excitação luminosa da clorofila **a** com os centros de reação abertos após aclimação das algas no escuro (F_o, F_m, F_v), e com os centros de reação fechados, após estimulação luminosa (F, F_o', F_m' e F_v'). As representações gráficas de tais medidas encontram-se na **figura 4**.

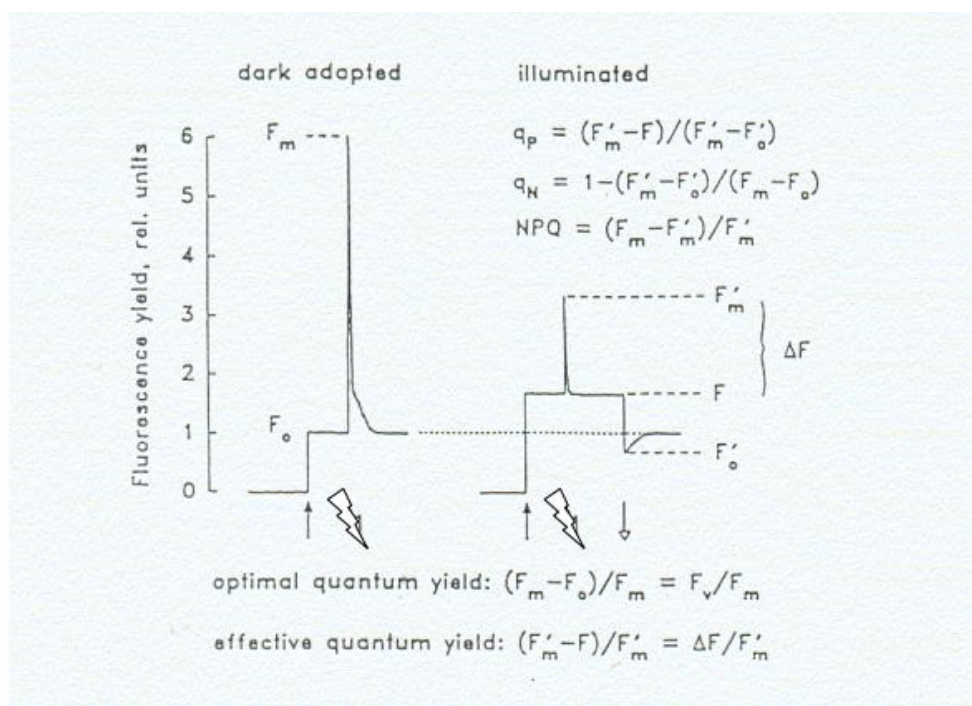


Figura 4. Fluorescências emitidas após estimulação luminosa. Representações gráficas das emissões de fluorescência após pulso luminoso sobre as microalgas adaptadas ao escuro (centros de reação abertos) e ao claro (centros de reação fechados).

Os valores F_o , F_m , F_v , F , F_m' e F_v' são oferecidos pelo equipamento Phyto PAM. Já o valor de F_o' pode ser obtido por meio da **equação 2** (OXBOROUGH; BAKER, 1997), descrita a seguir.

$$(2) \quad F_o' = F_o / ((F_v/F_m) + (F_o/F_m'))$$

Em posse desses valores, calculou-se os parâmetros qP , qN e NPQ por meio das **equações 3** (SCHREIBER et al., 1986), **4** (SCHREIBER et al., 1986) e **5** (BILGER; BJÖRKMAN, 1990), como demonstrado a seguir.

$$(3) \quad qP = 1 - (F_m' - F_o') / (F_m - F_o)$$

$$(4) \quad qN = [1 - (F_m' - F_o')] / (F_m - F_o)$$

$$(5) \quad NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

Outro parâmetro importante que pode ser obtido da análise da fotossíntese é a taxa de transporte de elétrons (ETR) entre o fotossistema II e o fotossistema I. Após feita a curva de saturação de luz, o equipamento fornece o valor da ETR relativa. A **equação 6** representa a fórmula utilizada para o cálculo da ETR.

$$(6) \quad ETR = \phi_{m'} \times PAR$$

Além desses parâmetros, a partir da realização da curva de luz ainda é possível obter do equipamento a irradiância de saturação (I_K), que indica a luminosidade onde se inicia a saturação da fotossíntese.

As curvas de saturação de luz ($P \times I$ – fotossíntese vs luminosidade) foram modeladas de acordo com Platt e Jassby (1976), cuja equação é descrita abaixo.

$$(7) \quad P^B = P_m^B \tanh(\alpha I / P_m^B) - R^B$$

onde

$$P^B = ETR_{\text{relativa}}^1 (\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{ s}^{-1})$$

$$P_m^B = ETR_{\text{relativa}} \text{ máxima (ETR}_m)$$

α = inclinação inicial da curva, onde somente a luminosidade é limitante

I = intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

R^B = perdas por respiração

A partir da curva de saturação de luz obtivemos a intensidade luminosa de saturação da fotossíntese (I_K). As definições dos parâmetros da **equação 8** (abaixo) são as mesmas apresentadas na equação 7 (acima).

$$(8) \quad I_K = (P_m^B + R^B) / \alpha$$

COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA – Proteínas e carboidratos foram determinados na biomassa total dos cultivos, e.g., incluindo-se leveduras, bactérias, microalgas e qualquer outro organismo que estivesse presente nos cultivos. A biomassa foi separada do meio líquido através de centrifugação (10 min; 4400 rpm; 20 °C). Os pellets de biomassa foram mantidos com 1 mL de sobrenadante e esses frascos foram congelados até que as determinações fossem realizadas. As proteínas foram extraídas de acordo com Rausch (1981) e a determinação seguiu o protocolo descrito em Bradford (1976). Para a quantificação de carboidratos utilizou-se o método descrito em Albalasmeh et al. (2013). A partir dessas quantificações, obtivemos as razões proteína/carboidrato.

CONTAGEM DE HETERÓTROFOS – A contagem de heterótrofos foi feita em placas com os meios Plate Count Agar (PCA) e Sabouraud Dextrose Agar. Para confecção dessas placas, foram utilizados os meios prontos em pó Plate Count Agar (Tryptone glucose yeast agar) OXOID (Inglaterra) e Sabouraud Dextrose Agar HiMedia (Índia), respectivamente. Dissolveu-se 28,5 g de pó para preparo de PCA ou 65,0 g de pó para preparo de Sabouraud por litro de água destilada. As soluções foram aquecidas para fusão do ágar, distribuídas em Erlenmeyers e autoclavadas por vinte minutos a 121° C. Em ambiente estéril fornecido por uma cabine de fluxo laminar, foram vertidas 20 mL dos meios em placas de Petri descartáveis de 90 mm de diâmetro. Essas placas

¹Neste estudo utilizamos a ETR relativa por questão de facilidade de obtenção do valor, pois para ETR absoluta, há que se determinar a secção transversal da clorofila a.

foram embaladas em sacos plásticos, fechadas e mantidas em geladeira a 4 °C até serem usadas.

A contagem de microrganismos heterotróficos em placas é considerada segura apenas quando se possui de 30 e 300 colônias de bactérias e entre 20 e 200 colônias de fungos por placa, para que não haja erros estatísticos ou dificuldade de visualização das colônias. Por isso, realizaram-se os plaqueamentos de quatro diluições de cada amostra por dia, a fim de assegurarmos essas quantidades de colônias por placa. Para as diluições, foram utilizados tubos Eppendorf contendo 900 µL de tampão fosfato-salino (solução PBS), aos quais se adicionaram 100 µL do meio de cada amostra para a primeira concentração (10^{-1}). A **tabela 3** apresenta os reagentes necessários para o preparo da solução PBS, que mantém o equilíbrio eletrolítico e osmótico das células extraídas das culturas.

Tabela 3. Tampão fosfato-salino (PBS). Composição da solução PBS para diluição das culturas. Quantias dos reagentes para um litro de água destilada.

Reagente	Componentes	Quantia L ⁻¹ H ₂ O
1	Cloreto de sódio (NaCl)	8,0 g
2	Cloreto de potássio (KCl)	0,2 g
3	Bifosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
4	Bifosfato de sódio (NaH ₂ PO ₄)	1,1 g

Para obtermos as demais diluições das culturas, retirou-se 100 µL do tubo Eppendorf com a solução inicial e adicionou-se em um outro tubo Eppendorf com os 900 µL de PBS. Esse processo foi feito sequencialmente para que, a cada dia, as concentrações adequadas fossem obtidas. Na primeira e segunda análises, o meio foi plaqueado nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} das culturas, nas terceira e quarta análises em concentrações de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} e, na quinta, sexta e sétima análises as concentrações foram de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Assim, foram montadas quatro placas por cultivo para cada tratamento (controle, vinhaça convencional e vinhaça biodigerida tratadas), totalizando em 36 placas de PCA e 36 placas de Sabouraud diárias e 252 placas de cada meio ao longo do experimento.

Os plaqueamentos foram feitos dentro de cabine de fluxo, utilizando-se alça de Drigalski para o espalhamento e esterilizador automático da marca Marconi, modelo MA1202 – CT (Brasil), a 200 °C. As placas foram incubadas em estufa a 32 ± 2 °C. Para contagem das colônias de bactérias, as placas de PCA foram mantidas por 48 h e, para obtenção da quantidade de leveduras e demais fungos, as placas de Sabouraud foram mantidas por 120 h nessas condições, após a qual se realizaram as contagens.

CARBONO E NITROGÊNIO ORGÂNICOS – Ao início, antes de proceder à inoculação da microalga no resíduo e ao final dos experimentos (144 h) foram obtidos 30 mL de meio para a determinação do conteúdo de carbono total orgânico e nitrogênio orgânico total dissolvidos no meio de cultivo em um analisador de carbono (Auto Sampler Shimadzu modelo ASI–L, Japão). Essas determinações foram realizadas no Departamento de Agroecologia Industrial e Sócio Economia Rural, da Universidade Federal de São Carlos, *campus* de Araras. A separação do material biológico presente no meio foi feita por centrifugação (10 min; 4400 rpm; 20 °C).

4.4 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram plotados em gráficos utilizando-se o programa Origin 8.5. Para a obtenção dos valores médios e desvios padrões foram consideradas as três réplicas experimentais avaliadas. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa R, com os testes paramétricos ANOVA e Tukey ($p < 0,05$) para comparação dos valores.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CAPÍTULO 1

Crescimento de *C. vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça

Neste capítulo, expõem-se os resultados referentes à etapa 1. A microalga *C. vulgaris* foi cultivada nas diversas concentrações (10 a 100%) de vinhaça convencional e biodigerida filtradas ou centrifugadas. Avaliaram-se os parâmetros pH, condutividade, absorvância em 570 nm, densidades celulares e taxas de crescimento de cada cultura, permitindo definir a melhor condição para prosseguirmos nos estudos de fisiologia fotossintética da etapa 2.

5.1.1 Resultados

Os resultados de pH (**figura 5a**) mostram padrões semelhantes de variação diária entre as diferentes concentrações das vinhaças tratadas. Foram calculados valores médios diários de pH entre todas as concentrações para cada tratamento a fim de demonstrar seus padrões de variação. A **figura 5b** mostra os resultados de condutividade. Para cada concentração das vinhaças, a condutividade manteve-se praticamente constante ao longo dos seis dias de experimento, por isso, os valores médios são representativos. De maneira geral, as menores condutividades foram obtidas na vinhaça biodigerida filtrada, seguido da vinhaça convencional filtrada.

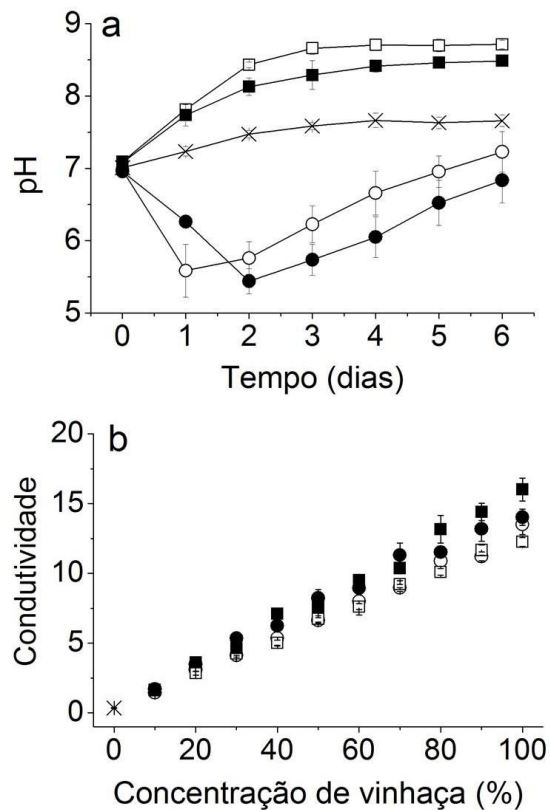


Figura 5. pH e condutividade. Valores médios de (a) pH e (b) condutividade (mS cm^{-1}) para o (×) controle em LC Oligo e os tratamentos (○) vinhaça convencional filtrada, (●) vinhaça convencional centrifugada, (□) vinhaça biodigerida filtrada e (■) vinhaça biodigerida centrifugada.

A **figura 6** mostra o resultado de absorvância em 570 nm, que é uma representação da quantidade de material particulado presente nas culturas (COSTA et al., 2003). Observa-se que quanto maior a concentração de vinhaça nas culturas, tanto maior o valor de absorvância a 570 nm. Os quatro tratamentos realizados diferem em todas as concentrações, exceto para os filtrados em concentração de 10%. Esses resultados mostram ainda que o material particulado foi sempre menor na vinhaça biodigerida filtrada, seguida da vinhaça convencional filtrada, vinhaça biodigerida centrifugada e vinhaça convencional centrifugada.

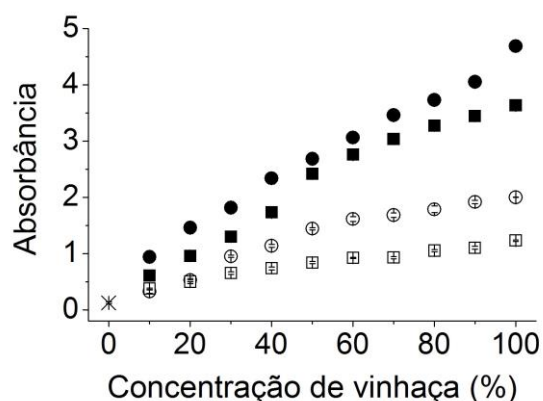


Figura 6. Material particulado. Valores médios ($n = 3 \pm SD$) de absorbância 570 nm (U.A.) no sexto dia de cultura para: (×) controle em LC Oligo e os tratamentos (○) vinhaça convencional filtrada, (●) vinhaça convencional centrifugada, (□) vinhaça biodigerida filtrada e (■) vinhaça biodigerida centrifugada.

A **figura 7** apresenta as curvas de crescimento das algas nas vinhaças. Observa-se que tanto para a vinhaça convencional quanto para a biodigerida, a filtragem permitiu o desenvolvimento algal em concentrações maiores do que a centrifugação, sugerindo melhores condições para as microalgas na primeira.

A **figura 8** mostra o rendimento celular final para os cultivos algais nas vinhaças. Observamos maior rendimento de biomassa final de *C. vulgaris* na vinhaça convencional filtrada 40, 50 e 60% e nas vinhaças biodigeridas centrifugadas de 10 – 50% em comparação ao controle em LC Oligo. Com a vinhaça biodigerida filtrada, todas as concentrações, exceto 10%, tiveram densidades celulares superiores a este controle. Entretanto, quando comparamos esse rendimento com o controle em BG11, observamos que as concentrações de 10 – 30% de vinhaça convencional centrifugada e 80% de vinhaça biodigerida filtrada apresentaram densidades celulares similares ao controle BG11, não superior a ele. O meio BG11 é mais rico em nutrientes e possibilita maior rendimento celular do que o LC Oligo. Tendo em vista os custos da confecção do meio BG11 para cultivos em larga escala, o uso de vinhaça tratada para tal finalidade seria positivo quanto ao aspecto econômico.

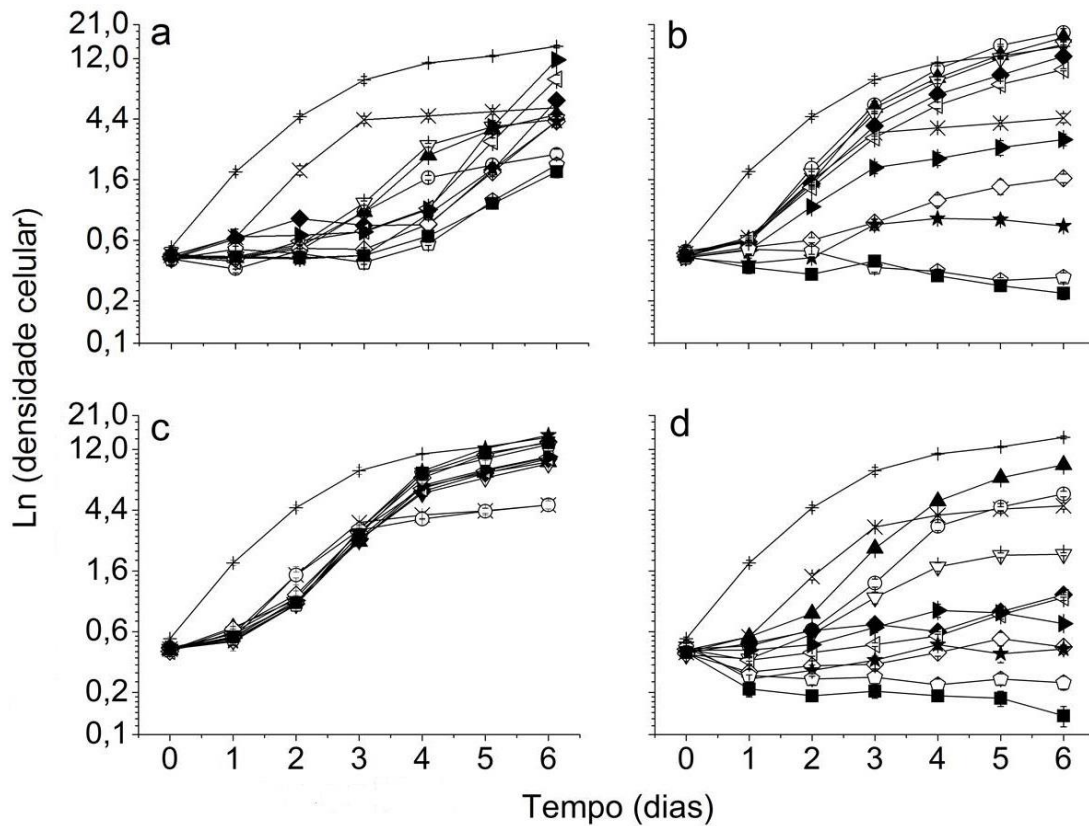


Figura 7. Curvas de crescimento. Ln dos valores médios de densidade celular (células mL⁻¹ x 10⁵) para os controles em (×) LC Oligo e (+) BG11 e para as diferentes concentrações de vinhaças tratadas: (○) 10%, (▲) 20%, (▽) 30%, (◆) 40%, (◁) 50%, (▶) 60%, (◇) 70%, (★) 80%, (◆) 90% e (■) 100%. 7a) vinhaça convencional filtrada, 7b) vinhaça convencional centrifugada, 7c) vinhaça biodigerida filtrada e 7d) vinhaça biodigerida centrifugada.

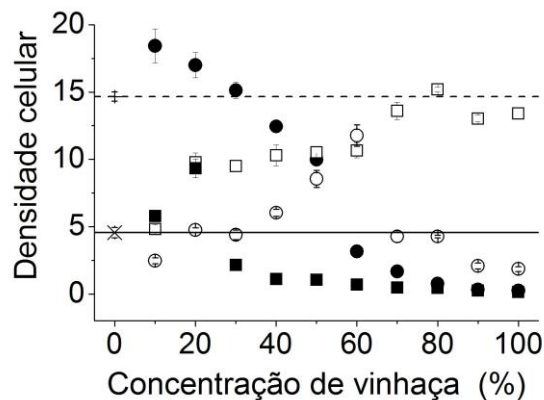


Figura 8. Densidade celular final. Valores médios ($n = 3 \pm SD$) de densidade celular (células mL⁻¹ x 10⁵) para os controles (×) LC Oligo e (+) BG11 e tratamentos (○) vinhaça convencional filtrada, (●) vinhaça convencional centrifugada, (□) vinhaça biodigerida filtrada e (■) vinhaça biodigerida centrifugada no último dia de cultivo.

Os valores médios das taxas de crescimento dos cultivos nas vinhaças são apresentados na **figura 9**.

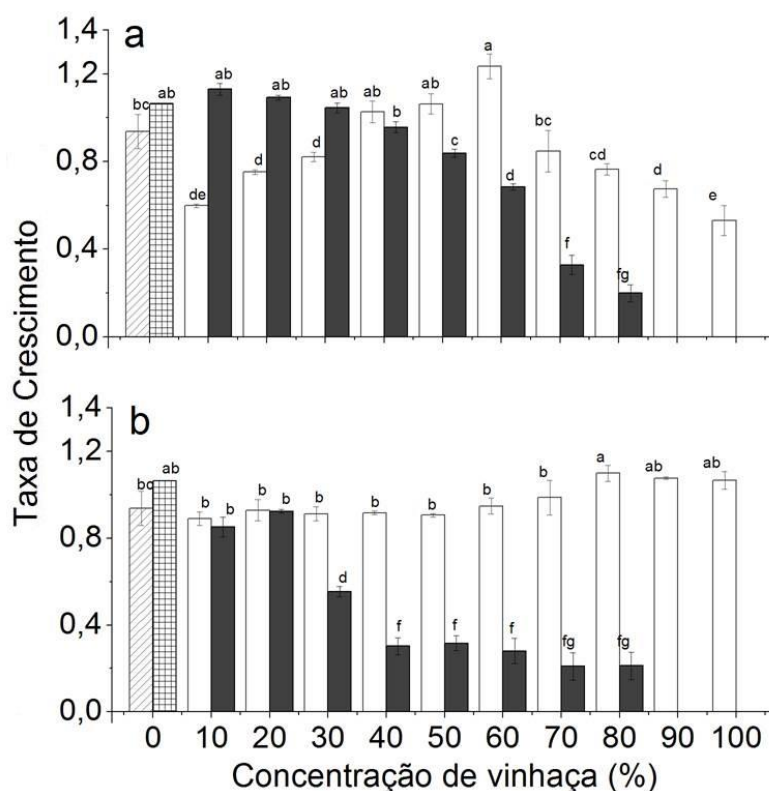


Figura 9. Taxa de crescimento. Valores médios ($n = 3 \pm SD$) de taxa de crescimento (dia^{-1}) para os controles LC Oligo (barra hachurada) e BG11 (barra quadriculada) e as vinhaças (a) convencional e (b) biodigerida. Barra branca: filtrados; preta: centrifugados. Mesma letra representa tratamentos que não diferiram significativamente entre si.

Para ambas as vinhaças, convencional e biodigerida, as filtradas apresentaram maiores taxas de crescimento do que as centrifugadas. Confirmando essa tendência de superioridade do filtrado em comparação ao centrifugado para a finalidade de crescimento da alga *Chlorella vulgaris*, as concentrações de 90 e 100% dos centrifugados causaram decréscimo celular, por isso não há taxas de crescimento nessas condições.

Selecionamos as concentrações de cada tratamento que permitiram os crescimentos mais significativos e resumimos na **tabela 4** os valores de densidades celulares no sexto dia (144 h) e taxas de crescimento desses tratamentos e dos controles.

Tabela 4. Condições ótimas para o cultivo algal. Valores médios ($n = 3 \pm SD$) e desvios padrões de densidade celular no sexto dia (144 h) e de taxa de crescimento (dia^{-1}) dos controles em LC Oligo e em BG11 e nas melhores condições de vinhaça convencional (vc) e biodigerida (vb). Os números entre parênteses representam os desvios padrões da média. Letras minúsculas iguais representam tratamentos que não diferem significativamente.

Tratamentos	Densidade celular	Taxa crescimento
controle LC Oligo	$4,8 \cdot 10^{5d}$ ($5,2 \cdot 10^4$)	$0,92^b$ (0,10)
controle em BG11	$1,5 \cdot 10^{6b}$ ($6,5 \cdot 10^5$)	$1,08^a$ (0,06)
vc filtrada 60%	$9,6 \cdot 10^{5c}$ ($6,3 \cdot 10^5$)	$1,23^a$ (0,12)
vc centrifugada 10%	$1,9 \cdot 10^{6a}$ ($1,8 \cdot 10^5$)	$1,14^a$ (0,09)
vb filtrada 80%	$1,5 \cdot 10^{6b}$ ($1,7 \cdot 10^5$)	$1,11^a$ (0,02)
vb centrifugada 20%	$9,8 \cdot 10^{5c}$ ($7,3 \cdot 10^5$)	$0,92^b$ (0,04)

Analisando a tabela 4 notamos que a vinhaça convencional centrifugada 10% é a que apresenta os melhores parâmetros referentes ao crescimento algal, seguida da vinhaça biodigerida filtrada 80%, que apresentou parâmetros iguais aos do meio BG11, vinhaça convencional filtrada a 60%, vinhaça biodigerida centrifugada a 20% e o controle em meio LC Oligo. Entretanto, tendo em vista as concentrações dos resíduos, podemos afirmar que o tratamento de filtragem e a vinhaça biodigerida foram mais efetivos quanto ao uso do resíduo para o cultivo algal do que a centrifugação e a vinhaça convencional.

5.1.2 Discussão

Os resultados de pH diário nas culturas em vinhaça sugerem haver uma tendência desse parâmetro em retornar aos valores originais das vinhaças (alcalino para a vinhaça biodigerida e ácido para a convencional) nos dois primeiros dias experimentais, quando

C. vulgaris estava em fase de adaptação inicial (lag de crescimento), denotando o efeito tamponante do resíduo. Esse efeito é confirmado pelos resultados de Lopes et al. (2013), que mostraram que o uso de vinhaça no solo não ocasionou variações no pH do mesmo. Já o aumento do pH observado nos experimentos ao longo do desenvolvimento das culturas está em conformidade com a literatura sobre o crescimento de microalgas. Sabe-se que a remoção de CO₂ pelas microalgas devido à fotossíntese promove a alcalinização do meio de cultura, caso o balanço entre os processos fotossintéticos e respiratórios seja positivo para a fotossíntese (RAVEN, 2007).

O aumento de condutividade conforme o aumento das concentrações de vinhaça é concordante com os resultados de Kadioglu e Algur (1992). Os autores relataram que a matéria orgânica e os elementos minerais da vinhaça, são responsáveis pela sua alta condutividade. A toxicidade das concentrações mais altas de vinhaça (90 – 100%), onde não foi possível o cultivo de *C. vulgaris*, pode, de acordo com o proposto por Kadioglu e Algur (1992), ser devida a um efeito osmótico que conduz à degradação das células.

Quanto à absorvância em 570 nm, os tratamentos com vinhaças filtradas tiveram valores menores do que com as centrifugadas, para as mesmas concentrações. Tendo em vista que a absorvância 570 nm está relacionada à quantidade de partículas no meio, incluindo contaminantes como bactérias, fungos, ou mesmo material particulado (COSTA et al., 2003; GRIS et al., 2011), podemos dizer ainda que quanto maior a concentração de vinhaça, maior a contaminação do cultivo. Além disso, os valores de absorvância para os mesmos processamentos de vinhaça biodigerida são geralmente menores do que para a convencional.

Em geral, a vinhaça filtrada permitiu um melhor crescimento da microalga, refletindo em maior produção de biomassa em comparação com o centrifugado. Os tratamentos com vinhaça convencional filtrada 60% e com vinhaça biodigerida filtrada 80% foram os que resultaram nos melhores rendimentos celulares. Nossos resultados estão de acordo com outros da literatura, que mostram que a vinhaça após tratamento suporta melhor o crescimento de microalgas fotossintéticas. Mitra et al. (2012) obtiveram aumento da concentração de lipídeos em biomassa de *C. vulgaris* cultivada em vinhaça de milho. Os autores trataram a vinhaça através de sedimentação e sifonamento, utilizando o sobrenadante em concentração de 100% como meio de cultura algal. Marques (2013) utilizaram vinhaça biodigerida diluída com esgoto doméstico, em concentração percentual não definida, mas obtiveram taxas de crescimento de 0,76 dia⁻¹

para *C. vulgaris*. De forma semelhante aos nossos resultados, os autores observaram melhor resposta algal em vinhaça biodigerida em comparação com a convencional.

A maioria dos estudos da literatura sobre o crescimento de microalgas em vinhaça tratada relata o uso do resíduo altamente diluído, como é o caso do estudo pioneiro de Oliveira (1988). A autora observou crescimento heterotrófico e mixotrófico de *C. vulgaris* em meios de cultura contendo 0,1 a 0,5% de vinhaça suplementado com nitrogênio na forma de ureia. Da mesma forma, Budiyono et al. (2014) observou o crescimento de *Spirulina platensis* em vinhaça biodigerida 0,8%, sendo que concentrações mais elevadas causaram degradação de membranas e pigmentos fotossintéticos, reduzindo a taxa de crescimento para $0,15 \text{ dia}^{-1}$. Barrocal et al. (2010) otimizaram o crescimento de *Spirulina maxima* em meio Schölosser suplementado com 0,5% de vinhaça de beterraba. Essa mistura aumentou a biomassa dessa Cyanobacteria de 3,5 para $4,8 \text{ g L}^{-1}$. Mais recentemente, Coca et al. (2015) obtiveram concentrações elevadas de proteínas em *Spirulina platensis* com o equivalente a 0,01% da vinhaça.

Nesta pesquisa, o padrão de crescimento de *C. vulgaris* nas vinhaças incluiu uma fase de adaptação, conhecida como *fase lag*, que antecede o crescimento exponencial. De acordo com Begon et al. (2007), isto pode ocorrer devido à competição entre microalgas e contaminantes vivos, ou ainda por causa do alto teor de matéria orgânica no resíduo. No entanto, apesar da fase de latência mais alongada, o maior rendimento final de biomassa obtido em vinhaça foi de $1,6 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$, a partir de uma densidade inicial de $5,0 \times 10^4 \text{ células mL}^{-1}$, representando um aumento de 32 vezes na densidade celular. Esse aumento é superior ao obtido em Vieira (2013), que cultivou *Chlorella sp.* em 10% de vinhaça e obteve aumento de densidade de apenas 3,5 vezes em relação ao inicial.

Em geral, nossos resultados mostraram que, se há toxicidade da vinhaça que seja independente de processos inibitórios por falta de luz, o tratamento por filtração em argila esmectita e, em seguida, por carvão ativado, removeu grande parte dos agentes inibidores, possibilitando o crescimento em vinhaça filtrada até a concentração de 80%, caso da vinhaça biodigerida.

5.2 CAPÍTULO 2

Estudo ecofisiológico de *C. vulgaris* em vinhaça tratada

Tendo como base os resultados obtidos na etapa 1 deste trabalho, selecionamos a vinhaça convencional filtrada 60% e a vinhaça biodigerida filtrada 80% como as condições ótimas para o crescimento da microalga *C. vulgaris*. Realizando novos cultivos, foram inferidos parâmetros fotossintéticos e bioquímicos que nos permitiram compreender os processos ecofisiológicos da microalga quando cultivada nas vinhaças tratadas.

5.2.1 Resultados

Antes de realizarmos as análises fotossintéticas e bioquímicas, efetuamos os processos de ativação fisiológica e aclimatação da cepa ao meio LC OLigo. Os resultados de densidade celular, taxa de crescimento, concentração de clorofila a e rendimento fotossintético são mostrados na **tabela 5**. Observa-se que na 5^a repicagem, a cultura apresentou maior taxa de crescimento. Apenas a primeira repicagem apresentou fase lag de crescimento, o que provavelmente se deve ao fato do inóculo oriundo do banco de algas não estar em fase exponencial, mas sim estacionária de crescimento.

Nas repicagens em vinhaças tratadas, notamos aumento das densidades finais da primeira repicagem para a segunda. Porém, a partir da terceira repicagem, houve inibição do crescimento em ambas as vinhaças, a biodigerida filtrada 80% e convencional filtrada 60%. Acompanhando as densidades celulares ao microscópio percebemos que, a cada repicagem houve aumento da contaminação do meio, o que explica essa inibição. Com isso, estipulamos que, após cinco repicagens em meio LC Oligo, deveríamos realizar apenas duas repicagens em vinhaça.

Tabela 5. Ativação fisiológica de *C. vulgaris* em meio LC Oligo. Valores médios (n = 3, desvio padrão entre parênteses abaixo do valor médio) de densidade celular (células mL⁻¹ 10⁶), taxa de crescimento (dia⁻¹), concentrações totais de clorofila a (mg L⁻¹), concentrações de clorofila a por célula (pg célula⁻¹) e rendimentos fotossintéticos máximos (ϕ_m) e operacionais (ϕ_m') no final do experimento (144 h). Mesma letra representa tratamentos que não diferiram significativamente entre si.

Cultura	Densidade	Taxa de	Clorofila a		Rendimento Fotos.	
	celular	crescimento	Total	Célula	ϕ_m	ϕ_m'
1 ^a	1,15 ^{ab}	1,10 ^b	1,62 ^{bc}	1,41 ^{ab}	0,67 ^a	0,59 ^a
	(0,09)	(0,03)	(0,02)	(0,09)	(0,01)	(0,03)
2 ^a	1,15 ^{ab}	1,15 ^{ab}	1,70 ^{bc}	1,47 ^{ab}	0,66 ^a	0,59 ^a
	(0,03)	(0,04)	(0,19)	(0,01)	(0,02)	(0,03)
3 ^a	1,14 ^{ab}	1,16 ^{ab}	1,74 ^b	1,52 ^{ab}	0,66 ^a	0,58 ^a
	(0,05)	(0,03)	(0,16)	(0,09)	(0,02)	(0,02)
4 ^a	1,22 ^{ab}	1,19 ^{ab}	1,85 ^b	1,52 ^{ab}	0,66 ^a	0,59 ^a
	(0,03)	(0,08)	(0,09)	(0,04)	(0,02)	(0,03)
5 ^a	1,39 ^a	1,26 ^a	2,28 ^a	1,64 ^a	0,67 ^a	0,60 ^a
	(0,02)	(0,04)	(0,12)	(0,06)	(0,02)	(0,02)

Os resultados de pH, condutividade e absorvância 570 nm são mostrados nas figuras 10 e 11.

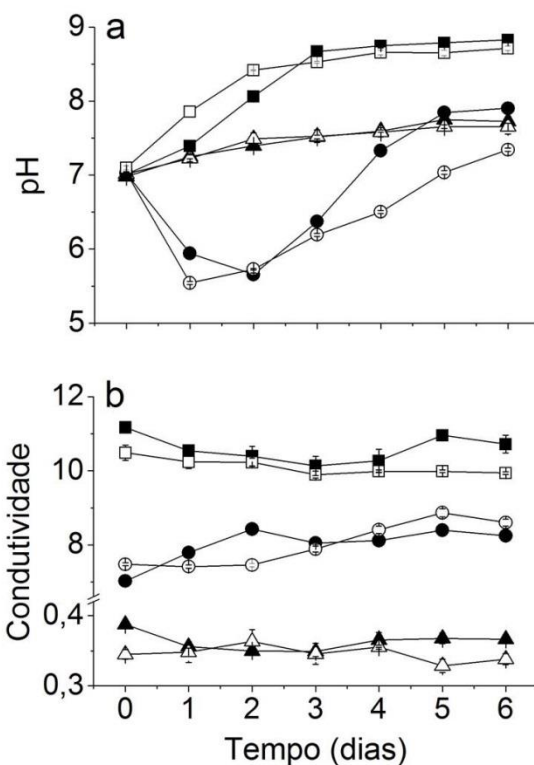


Figura 10. pH e condutividade. Valores médios de (a) pH e (b) condutividade (mS cm^{-1}) para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaças: (●) convencional filtrada 60% e (■) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada e para o controle em LC Oligo (△) e as culturas em vinhaças (○) convencional filtrada 60% e (□) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* não aclimatada.

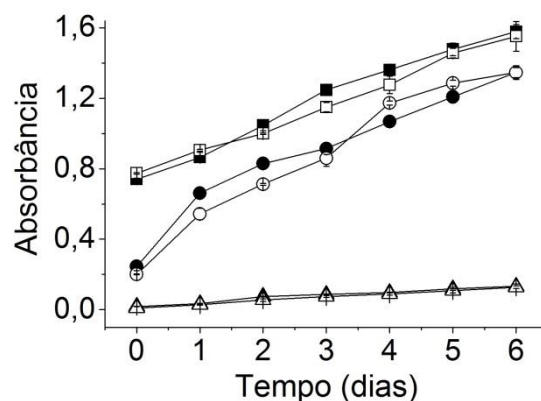


Figura 11. Absorbância em 570 nm. Valores médios ($n = 3$) de absorbância em 570 nm (U.A.) para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaças (●) convencional filtrada 60% e (■) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada e para o controle em LC Oligo (△) e as culturas em vinhaça (○) convencional filtrada 60% e (□) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* não aclimatada.

A **figura 12** mostra as densidades celulares diárias e as taxas de crescimento. Essa figura mostra que o crescimento populacional nas culturas com vinhaça foi maior do que no controle. O processo de aclimação promoveu melhorias nas taxas de crescimento e nas densidades celulares finais dos três tratamentos, o controle e as duas vinhaças.

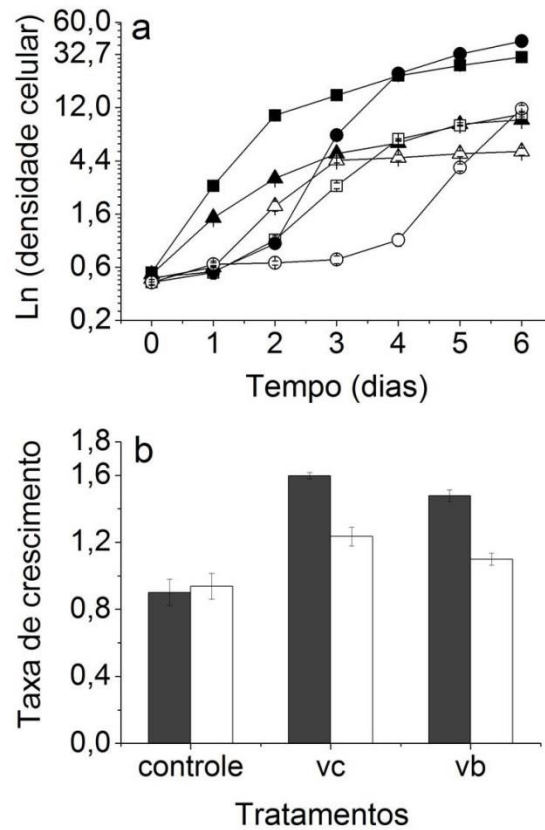


Figura 12. Curvas e taxa de crescimento. Valores médios ($n = 3$) de (a) densidade celular diária (células $\text{mL}^{-1}10^5$) em função do tempo experimental (dias) para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaça (●) convencional filtrada 60% (vc) e (■) biodigerida filtrada 80% (vb) com *C. vulgaris* aclimatada e para o controle em LC Oligo (△) e as culturas em vinhaça (○) convencional filtrada 60% (vc) e (□) biodigerida filtrada 80% (vb) com *C. vulgaris* não aclimatada. (b) Taxa de crescimento média ($n=3$) para os tratamentos com *C. vulgaris* aclimatada (barras pretas) e não aclimatadas (barras brancas).

Os resultados das análises fisiológicas da microalga, iniciando-se pela concentração de clorofila **a**, são mostradas na **figura 13**. As culturas contendo vinhaça apresentam mais clorofila **a** do que o controle, entretanto, ao reportarmos esses valores

por unidade celular, observamos que a quantidade de clorofila **a** por célula ao início e final dos experimentos são iguais para os tratamentos.

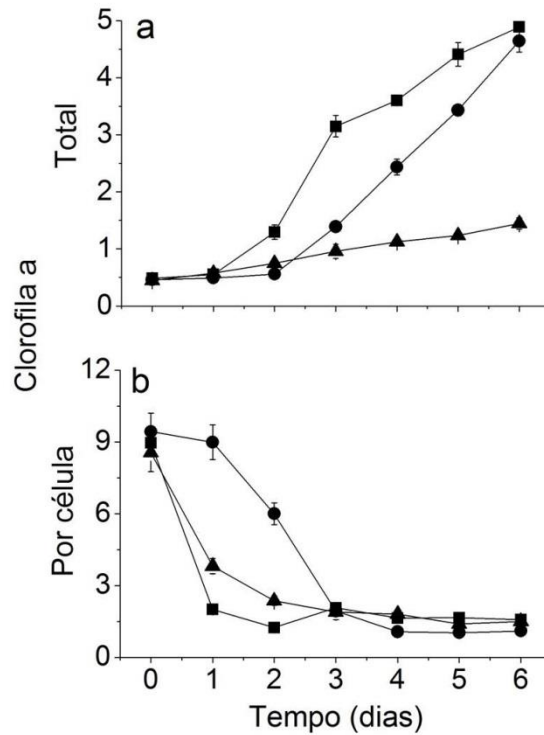


Figura 13. Clorofila a. Valores médios ($n = 3$) da (a) concentração total de clorofila a (mg L^{-1}) e (b) quantidade de clorofila a por célula (pg célula^{-1}) para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaça (●) convencional filtrada 60% e (■) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada.

Os valores dos rendimentos fotossintéticos máximo (ϕ_m) e operacional ($\phi_{m'}$), bem como dos decaimentos de fluorescência fotoquímicos (qP) e não-fotoquímicos (qN e NPQ) para cada tratamento são mostrados na **figura 14**. No controle, os valores de ϕ_m e $\phi_{m'}$ e decaimentos fotoquímicos foram em geral mais elevados do que nas vinhaças. Isso mostra que, apesar das microalgas terem alcançado maior rendimento de biomassa final nas culturas com vinhaça, o processo fotossintético se deu de forma menos intensa.

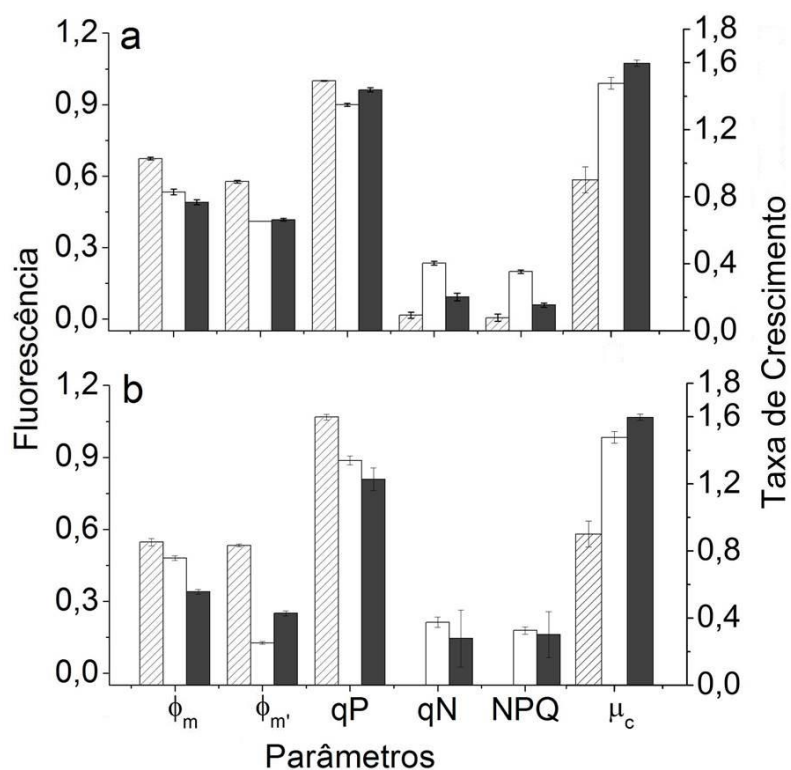


Figura 14. Parâmetros fotossintéticos. Valores médios ($n = 3$) de rendimento fotossintético máximo (ϕ_m), operacional ($\phi_{m'}$), decaimento fotoquímico (qP), decaimentos não-fotoquímicos (qN e NPQ) e taxa de crescimento (μ_c) na (a) fase exponencial e (b) ao final do experimento. Barras hachuradas representam o controle em LC Oligo, barras brancas cultivos em vinhaça convencional filtrada 60% e barras pretas em vinhaça biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada.

As curvas de saturação de luz ($P \times I$) na fase exponencial são mostradas na **figura 15** e os parâmetros oriundos a partir da modelagem desses resultados na **tabela 6**. Observamos que, em geral, todos os valores que se relacionam à fotoquímica da fotossíntese foram melhores no controle em comparação com as vinhaças tratadas.

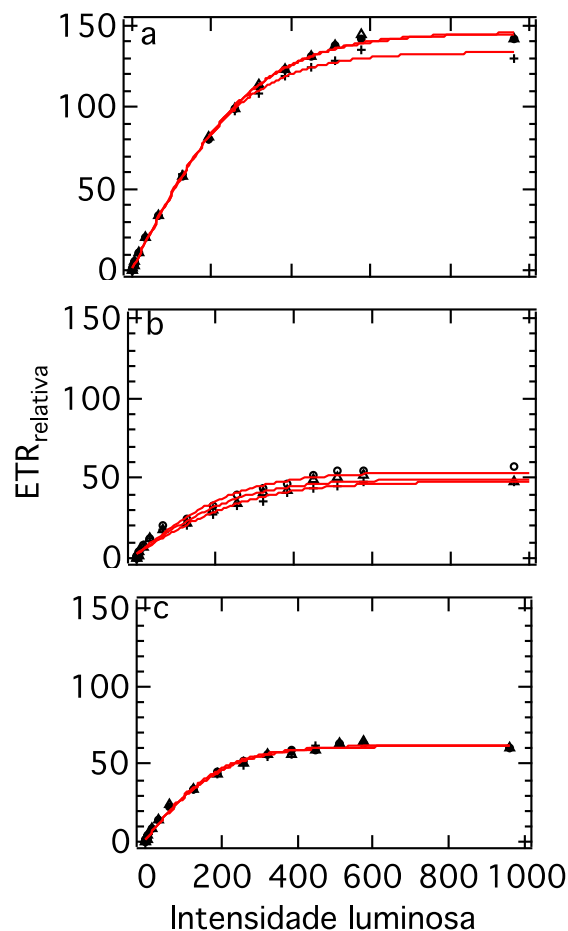


Figura 15. Curvas de luz. Taxa de transporte de elétrons ($ETR_{relativa}$) em função da intensidade luminosa ($\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$) das tr\u00eas r\u00e9plicas. (a) controle em LC Oligo; (b) vinha\u00e7a biodigerida filtrada 60%; (c) vinha\u00e7a convencional filtrada 80%.

Tabela 6. Par\u00e2metros fotossint\u00e9ticos oriundos das curvas de luz. Valores m\u00e9dios ($n = 3$, desvio padr\u00e3o entre par\u00eanteses) de $ETR_{relativa}$ m\u00e1xima (ETR_m), inclina\u00e7\u00e3o da curva ao in\u00edcio (α), intensidade luminosa de satura\u00e7\u00e3o (I_K) e perdas por respira\u00e7\u00e3o (R^B) para o controle em LC Oligo e as vinha\u00e7as convencional (vc) 60% e biodigerida (vb) 80% tratadas.

Tratamentos	ETR_m	α	I_K	R^B
controle	140,27 (7,16)	0,48 (0,01)	302,67 (1,80)	-1,37 (0,06)
vc 60%	60,0 (0,10)	0,29 (0,01)	202,37 (6,07)	-1,74 (0,18)
vb 80%	48,97 (4,63)	0,17 (0,01)	278,97 (8,61)	-2,76 (0,14)

O monitoramento dos organismos heterotróficos é mostrado na **figura 16**. As densidades celulares máximas de bactérias foram de 5×10^8 UFC mL⁻¹, as de leveduras 1×10^7 UFC mL⁻¹ e de outros fungos foram de 5×10^4 UFC mL⁻¹. O decréscimo dos gráficos coincide com o final da fase exponencial e a fase estacionária do crescimento algal, quando a densidade celular de *C. vulgaris* é elevada. O controle não está representado no gráfico de densidades celulares para leveduras e fungos filamentosos devido à ausência desses organismos em um meio de cultura inorgânico.

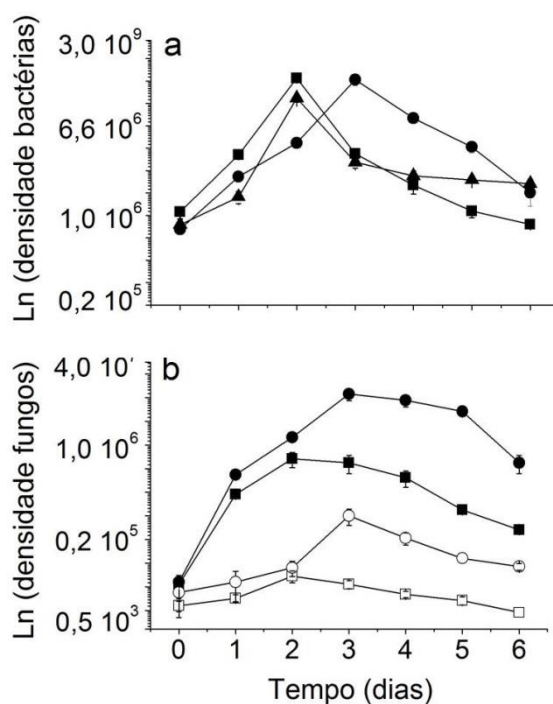


Figura 16. Densidade celular de contaminantes. Valores médios ($n = 3$) de densidade celular (UFC mL⁻¹) de (a) bactérias e (b) leveduras para o controle em LC Oligo (▲) e as culturas em vinhaça: (●) convencional filtrada 60% e (■) biodigerida filtrada 80% e de (b) fungos filamentosos para as culturas em vinhaça: (○) convencional filtrada 60% e (□) biodigerida filtrada 80% com *C. vulgaris* aclimatada.

As análises físico-químicas dos meios contendo as vinhaças convencional filtrada 60% e biodigerida filtrada 80% antes e após o cultivo de *C. vulgaris*, encontram-se na **tabela 7**. Houve decréscimo na concentração da maioria dos nutrientes, provavelmente por conta do consumo pela comunidade presente nos cultivos.

Na **figura 17** apresentam-se os valores de carbono orgânico total e nitrogênio orgânico total dissolvidos. Essa figura demonstra o consumo de carbono e nitrogênio orgânicos, resultado das atividades heterotróficas de bactérias e fungos e, possivelmente, mixotrófica das microalgas.

Os resultados da determinação das biomoléculas, proteínas e carboidratos nos cultivos controle e vinhaças são mostrados na **figura 18**, assim como a razão proteínas / carboidratos na **figura 19** nas culturas em fase exponencial do crescimento da microalga e ao final dos experimentos (144 h) em cada tratamento.

Tabela 7. Caracterização das vinhaças pré e pós-cultivos. Caracterização físico-química da vinhaça convencional 60% e da biodigerida filtradas 80% antes e após o cultivo de *C. vulgaris* aclimatada. Todas as concentrações reportadas são em mg L⁻¹, exceto K₂O (kg K₂O m⁻³).

Parâmetro	V. convencional filtrada a 60%		V. biodigerida filtrada a 80%	
	Pré – cultivo	Pós – cultivo	Pré – cultivo	Pós – cultivo
N - NO₃⁻	< 11,400	< 11,400	< 11,400	< 11,400
N - NO₂⁻	< 0,300	< 0,300	< 0,300	< 0,300
N - NH₄⁺	9,7	61,0	47,6	0,992
N Total Kjeldahl	92,4	127,1	117,6	10,1
Sódio	35,5	44,2	60,1	10,6
Cálcio	692,5	37,6	85,4	404,0
Potássio	3302,0	2316,0	2637,0	1660,0
Magnésio	433,0	286,0	398,8	271,0
Sulfato	1706,1	< 50,0	< 50,0	936,0
Fosfato	20,8	< 2,0	< 2,0	< 2,0
Teor de K₂O	3,9	2,78	3,2	1,99

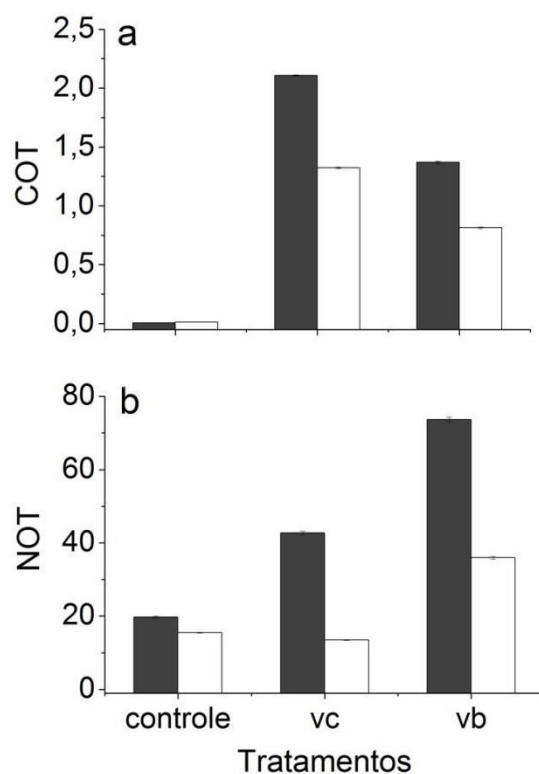


Figura 17. Carbono e nitrogênio orgânicos totais. Valores médios (n = 3) de (a) carbono orgânico total (mg L⁻¹10³) e (b) nitrogênio orgânico total (mg L⁻¹) no controle, vinhaça convencional 60% (vc) e vinhaça biodigerida 80% (vb) antes dos cultivos (barras pretas) e após os cultivos de *C. vulgaris* aclimatada (barras brancas). Barra de erro representa o desvio padrão.

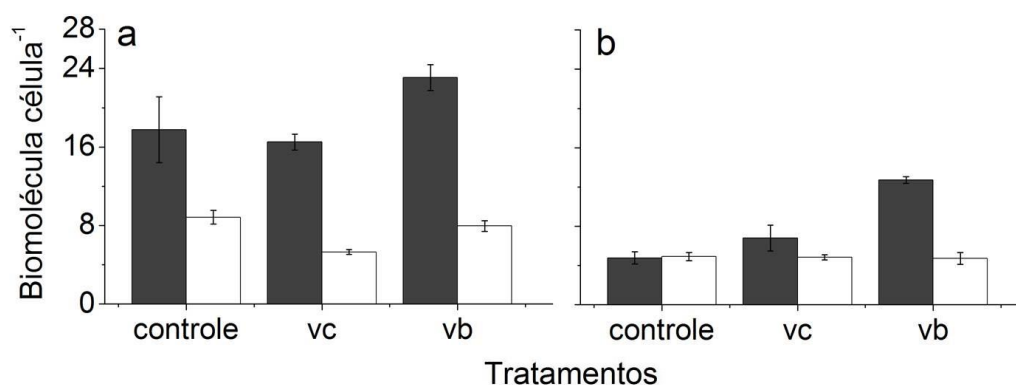


Figura 18. Proteínas e carboidratos. Valores médios (n = 3) de proteínas (barra preta) e carboidratos (barra branca) por célula (pg célula⁻¹) para as culturas no controle, vinhaça convencional 60% (vc) e vinhaça biodigerida 80% (vb) na (a) fase exponencial e (b) ao final do experimento.

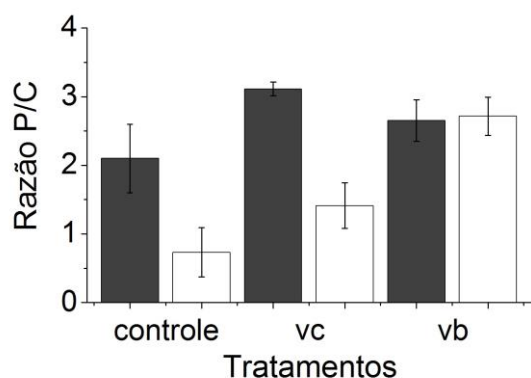


Figura 19. Razão proteína / carboidratos. Valores médios da razão proteínas / carboidratos para as culturas no controle em meio LC Oligo, em vinhaça convencional filtrada 60% e em vinhaça biodigerida filtrada 80% na fase exponencial (barra branca) e ao final do experimento (barra preta).

5.2.2 *Discussão*

A aclimação da microalga nas vinhaças filtradas mostrou melhora do crescimento na segunda repicagem em relação à primeira. Segundo Wood et al. (2005) tal melhora pode ser devida à seleção e adaptação das microalgas no novo meio, a vinhaça, rico em materiais orgânicos. Nossos resultados mostraram ainda que muitas repicagens na vinhaça levaram ao aumento de bactérias e outros contaminantes, provavelmente por se tratar de um resíduo naturalmente contaminado (SILVA et al. 2007), diferente de meios de cultura sintéticos que são previamente esterilizados antes do uso. O elevado grau de contaminação do resíduo nos obrigou a apenas duas repicagens no processo de aclimação.

Apesar de termos usado apenas duas repicagens durante a aclimação, esta se mostrou importante para o crescimento de *C. vulgaris* no resíduo. Culturas aclimatadas cresceram mais rapidamente do que as não aclimatadas. As taxas de crescimento em *C. vulgaris* aclimatada à vinhaça foram de 1,5 – 1,6 d⁻¹, em contraste com 1,2 – 1,1 d⁻¹ obtido em Candido e Lombardi (2015). As taxas de crescimento específicas para *C. vulgaris* que obtivemos são maiores do que as encontradas na literatura para a mesma espécie também cultivada em vinhaça. Marques et al. (2013) utilizou vinhaça

biodigerida acrescida de esgoto doméstico e obteve taxa de crescimento de $0,76 \text{ d}^{-1}$ foi obtida. Esse valor corresponde à menos da metade dos valores aqui apresentados. Budiyo et al. (2014) utilizaram vinhaça 0,8% e obtiveram taxa de crescimento de $0,15 \text{ d}^{-1}$ para *Spirulina platensis*, valor dez vezes menor do que os obtidos neste trabalho. Esses resultados demonstram que as condições oferecidas pelas vinhaças tratadas suportam o crescimento de *C. vulgaris* mesmo na presença de contaminantes do resíduo.

Os resultados de pH, condutividade e absorvância 570 nm nas vinhaças convencional 60% e biodigerida 80% filtradas confirmaram o aumento do pH na fase exponencial, indicando atividade fotossintética nos cultivos (BERTOLDI et al., 2007; RAVEN, 2007). Esses resultados foram confirmados pelas determinações de eficiência fotossintética (figura 13). O aumento nos valores de absorvância 570 nm confirma as análises de contaminantes por plaqueamento, que demonstraram que a vinhaça convencional tratada possui maior concentração de organismos heterotróficos (bactérias e fungos) do que a vinhaça biodigerida filtrada, assim como demonstrado na figura 15.

A similaridade nas concentrações de clorofila **a** para o controle e demais tratamentos em vinhaças confirmam o alto rendimento de biomassa nos resíduos e são maiores do que os resultados da literatura. Enquanto os valores que obtivemos estão próximos de $1,0 \text{ pg célula}^{-1}$, Bertoldi et al. (2008) obteve valores de 0,3 a $0,4 \text{ pg célula}^{-1}$ com cultivos de *C. vulgaris* em meio hidropônico. Segundo os autores, $0,4 \text{ pg célula}^{-1}$ foi obtido quando a concentração de Mn e Zn foram aumentadas no meio hidropônico. Como a vinhaça é um meio rico em nutrientes minerais e em matéria orgânica (SILVA et al., 2007), assumimos que as microalgas não estavam limitadas por nutrientes. Borges et al. (2007) avaliaram o potencial de captura de carbono por dez espécies microalgais e encontraram concentrações de clorofila **a** variando de $34,5$ a $965,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ou de $0,3$ a $9,4 \text{ pg célula}^{-1}$ ao início dos cultivos. De acordo com os autores, a quantidade de clorofila **a** se correlaciona à saúde fisiológica das células e à capacidade fotossintética e de fixação de carbono por esses organismos. Com essas considerações, admitimos que *C. vulgaris* nas vinhaças filtradas encontrava-se em situação fisiologicamente saudável.

A eficiência fotossintética nos cultivos feitos em ambas as vinhaças foi menor do que no controle, entretanto o crescimento da microalga foi maior. Morris et al. (2008) obteve rendimentos fotossintéticos máximos de 0,60 a 0,75 para biofilmes de microfitobêntos cultivados em escala mesocósmica, o que coincide com nossos controles, também superando os tratamentos em vinhaça. Quiang e Richmond (1996)

perceberam que as altas densidades celulares de *Spirulina platensis* em fotobiorreatores inibem a penetração de luz, causando redução nos rendimentos fotossintéticos e assim, nos rendimentos celulares. Na vinhaça a redução da entrada de luz ocorre devido às cargas de contaminantes e presença de sólidos suspensos totais, mesmo nos filtrados, se compararmos ao meio LC Oligo. Entretanto, não houve redução nas densidades celulares algais produzidas, já que as culturas em vinhaças tratadas renderam até quatro vezes mais células do que os controles. Isso evidencia o consumo de outra fonte de carbono, no caso a heterotrófica, comprovando o metabolismo mixotrófico de *C. vulgaris* no meio orgânico.

Considerando a fase exponencial de crescimento de *C. vulgaris* no controle, os valores obtidos para os parâmetros fotossintéticos corresponderam ao esperado segundo a literatura (JUNEAU; HARRISON, 2005; LOMBARDI; MALDONADO, 2011), e.g., $\phi_m \sim 0.68$ e operacional $\sim 0.64 - 0.60$, decaimento fotoquímico (qP) $\sim 1,0$ e baixos decaimentos não fotoquímicos (qN e NPQ). A combinação desses valores sugere que a alga estava em condições ótimas de cultivo, mesmo tendo sua taxa de crescimento $\sim 0.90 - 1,0$, menor do que nas vinhaças. Essa taxa de crescimento é esperada para a espécie (CHIA et al., 2013a, 2013b).

Comparando os parâmetros fotossintéticos dos cultivos, temos que qP foi igual nas vinhaças e controle, mas qN e NPQ foram maiores nas vinhaças do que no controle. Sabe-se que os processos de dissipação de energia não fotoquímicos (qN e NPQ) são mecanismos de proteção das células fotossintéticas contra a instabilidade na transferência de energia luminosa e fluxo de elétrons. Dissipando o excesso de energia, minimizam-se danos foto-oxidativos. Entretanto, sabe-se que qP está relacionado ao estado redox da Q_A (KRAUSE; JAHNS, 2003), o primeiro aceptor de elétrons da cadeia de transporte eletrônica (ETR) acíclica, entre o PSII e o PSI. Assumimos que, se qP nas vinhaças foi igual ao controle e próximo do máximo permitido ($\sim 1,0$), então Q_A estava recebendo os elétrons enviados pelo par de clorofilas a P680 no PSII. Isso significa que tais clorofilas e o sistema antena não foram afetados nas células cultivadas em vinhaça e que a Q_A repassava os elétrons adiante e encontrava-se sempre apta a recebê-los, ou seja, em estado oxidado para o elétron seguinte. O ciclo de Calvin é o processo predominante que finalmente aceita a energia dos elétrons transportados através do PSII e PSI (ETR_{relativa}) e, portanto, qP e Q_A são fortemente influenciados pelo movimento do ciclo de Calvin. Se Q_A estava sempre apta a receber os elétrons (nas vinhaças e no controle), significa que a dissipação de energia (qN e NPQ) pode ter contribuído para a

redução da ETR, que foi ~ 50% menor nas vinhaças do que no controle (figura 14). Sabe-se ainda que qP pode ser um indicador de estresse por intensidades luminosas combinadas com outros fatores ambientais e, mesmo em baixas intensidades luminosas, qP pode declinar até ~ 0,0 (simultaneamente aumentando qN e NPQ). Em nossos experimentos a irradiância foi mantida a mesma ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em todos os cultivos e, se alguma condição ambiental tivesse restringido a fixação do CO_2 no ciclo de Calvin, qP teria sido reduzido. Deste raciocínio, conclui-se que não houve restrição na fixação do CO_2 nas vinhaças e que o mecanismo de proteção da célula à alta intensidade luminosa pode ter entrado em ação, dissipando a energia não usada na forma de qN ou calor (NPQ) numa tentativa de proteger a alga, permanecendo o qP elevado, assim como qN e NPQ.

De acordo com Krause e Jahns (2003), qN e NPQ podem ser afetados por mecanismos que não relacionadas aos PSII e PSI, por exemplo estresses ambientais. As culturas em vinhaças apresentaram condutividade entre $7 - 11 \text{ mS cm}^{-1}$ enquanto que o controle teve condutividade de $0,3 - 0,4 \text{ mS cm}^{-1}$. Em uma situação normal haveria perda de água da célula para o meio (vinhaça) devido à pressão osmótica, entretanto observou-se ao microscópio que as células não sofreram plasmólise e, portanto, utilizaram mecanismos de proteção osmótica, provavelmente usando ATP. Isso fica evidenciado pelos valores mais altos de R^B (respiração) nas vinhaças em comparação ao controle obtidos a partir das curvas de saturação de luz. A toxicidade por estresse salino induzida pela vinhaça é corroborada por outros autores, que também cultivaram microalgas nesse resíduo (ANNAN, 2014; KADIOGLU; ALGUR, 1992).

Diversos autores já estudaram o efeito da toxicidade nos parâmetros fotossintéticos de microalgas. Dewez et al. (2005) apontam que as dissipações não fotoquímicas (qN e NPQ) são parâmetros bastante sensíveis, relacionados à proteção contra a toxicidade por meio do desvio de energia da cadeia transportadora de elétrons. Lombardi e Maldonado (2011), ao exporem *Phaeocystis cordata* a diferentes concentrações de cobre, obtiveram valores de qN entre 0,7 e 0,9 e de NPQ entre 1,0 e 1,5 em culturas em batelada. Juneau et al. (2002) obteve valores de qN de 1,0 a 1,3 com concentrações crescentes de cobre em culturas de *Chlorella vulgaris*. De acordo com esses autores, a toxicidade limita a transferência de energia ao longo da cadeia transportadora de elétrons, aumentando as dissipações não fotoquímicas e reduzindo a formação final de ATP e NADPH. Os autores ainda demonstram que os tempos de exposição aos agentes tóxicos provocam diferentes efeitos nessas dissipações. Daí o

fato de nossas culturas em vinhaça apresentarem uma redução do qP e um aumento de qN e NPQ mais acentuados ao final do experimento (figura 14b) do que nas respectivas fases exponenciais (figura 14a) dos tratamentos, quando permaneceram menos tempo expostas ao estresse osmótico causado pela vinhaça (KADIOGLU; ALGUR, 1992).

Os parâmetros da curva de luz apresentados na tabela 6 (ETR_m , α , I_K e R^B) deixam claro que a microalga em vinhaça estava sob estresse ou dando preferência para a fonte orgânica de carbono. Esse raciocínio é suportado pelos valores de qP e concentração de clorofila **a** que, iguais ao controle, demonstram que o cloroplasto e o PSII estavam preservados. De acordo com Martins et al. (2009) os dados obtidos por meio da curva de luz indicam como o organismo adapta seu aparato fotossintético à mudanças na luminosidade.

Nossos resultados de fluorescência do PSII e informações obtidas a partir dele, juntamente com os resultados de elevado rendimento de biomassa nas vinhaças indicam fortemente que *C. vulgaris* estava em metabolismo mixotrófico. Diversos estudos sobre cultivo de microalgas em resíduos e efluentes sugerem esse tipo de metabolismo (BONINI, 2012; MARCHELLO et al., 2015; VIEIRA, 2013), porém, pela primeira vez, foram realizadas análises da fotossíntese em um meio orgânico e residual, corroborando a hipótese de redução do processo fotossintético e aproveitamento da via orgânica de nutrição nessas condições.

O monitoramento de heterótrofos confirmou os resultados de absorvância em 570 nm, mostrando aumento da contaminação microbiana do início até a fase exponencial de crescimento. Estes resultados concordam com os de Gris (2011) e Costa et al. (2003), que relacionaram absorvância em 570 nm com o material particulado, incluindo contaminantes microbianos, em culturas de microalgas. A redução dos contaminantes posterior coincidiu em todos os casos com o final da fase exponencial de crescimento algal, situação que pode ter sido induzida pela oxigenação pela fotossíntese. Marchello et al. (2015) observou que, após o cultivo ou borbulhamento de ar em efluente doméstico, há declínio de heterótrofos.

A redução no conteúdo orgânico e inorgânico nas vinhaças após o cultivo algal confirma que a comunidade ali presente (algas e heterótrofos) utilizaram tais elementos. Esse resultado é particularmente interessante em relação ao potássio, que teve sua concentração reduzida em 25%, o que viria a minimizar problemas com a fertiirrigação. De acordo com Silva et al. (2007) a fertiirrigação usando vinhaça bruta é de prejuízo ao solo devido à sua salinização, além da contaminação do lençol freático. Já para o sódio

e o cálcio houve aumento após os cultivos, indicando eliminação dessas substâncias pelos organismos da comunidade. Selesu (2015) observou o aumento de alguns nutrientes em suas culturas microalgais em resíduo da suinocultura biodigerido e atribuiu essa variação à morte celular e a secreção de metabólitos secundários pelas microalgas, o que pode ser estendido aos dados aqui apresentados.

A elevada razão proteínas/carboidratos (P/C) obtida na fase exponencial de crescimento da biomassa presente nos cultivos (controle e vinhaças) confirma sua potencialidade como uso em ração animal. Sabe-se que esses alimentos devem conter quantidade adequada de proteínas e a complementação com microalgas é considerada promissora, pois, além das proteínas, elas carregam consigo carotenoides e ácidos graxos (BOROWITZKA, 2014; LUM et al., 2013).

Os resultados aqui apresentados permitem inferir sobre alguns comportamentos de adaptação fisiológica de *C. vulgaris* em meios contendo vinhaças filtradas em comparação com o meio sintético LC Oligo e sugerem fortemente que as microalgas recorreram ao metabolismo mixotrófico nas vinhaças, resultando em melhor rendimento do que no controle.

6.0 CONCLUSÃO

Esta pesquisa mostrou que os tratamentos em vinhaça causaram mudanças químicas dos meios, melhorando as condições para o crescimento da microalga Chlorophyceae *C. vulgaris*. Os melhores crescimentos algais se deram, respectivamente, em vinhaça convencional centrifugada 10%, vinhaça biodigerida filtrada 80%, vinhaça convencional filtrada 60% e vinhaça biodigerida centrifugada 20%. Os filtrados permitiram melhores crescimentos em maiores concentrações do resíduo do que nos centrifugados.

A aclimação das algas possibilitou aumento nas taxas de crescimento de 1,2 para 1,6 dia⁻¹ em vinhaça convencional filtrada 60% e de 1,1 para 1,5 dia⁻¹ em vinhaça biodigerida filtrada 80%, as quais superaram o controle em LC Oligo, com 0,9 dia⁻¹, e em BG11, com 1,1 dia⁻¹. As densidades celulares finais de 4,2 x 10⁶ e 3,9 x 10⁶ células mL⁻¹ nas vinhaças convencional e biodigerida respectivamente, caracterizaram aumentos de 84 e 78 vezes em relação à densidade inoculada.

A avaliação dos parâmetros fotossintéticos (rendimentos fotossintéticos, dissipação de energia e curvas de luz) na microalga *C. vulgaris* mostrou metabolismo fotoautotrófico padrão nos controles e mixotrófico nas vinhaças, apesar das quantidades de clorofila **a** por célula permanecerem iguais no controle e nas vinhaças.

O aproveitamento das vinhaças de cana-de-açúcar para o cultivo da microalga, em consórcio com organismos heterotróficos levou à diminuição de compostos orgânicos e elementos minerais no resíduo, chamando a atenção para a redução do potássio em até 25% em relação aos meios antes dos cultivos. Assim, o cultivo propiciou redução da carga poluente da vinhaça. Além disso, foi gerada uma biomassa rica em proteínas, com potencial de uso para suplemento em ração animal.

Através do tratamento prévio da vinhaça para posterior uso como meio de cultura algal contribuímos para a elaboração de nova tecnologia que pode reduzir custos de produção de microalgas, assim como valorar o resíduo da produção de etanol.

7.0 BIBLIOGRAFIA

- ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MAGÁN, J. J.; MOLINA, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. **Biotechnology advances**, 30(6), 1344-1353.
- AFNOR – Association Française of Normalization (1980). **Essais des eaux**. Determination of inhibition of *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme Experimentale T90-304.
- AIDAR, E.; EHRLICH, R.; ASANO, C. S.; SIGAUD, T. C. S. (1991). Variação da composição química do meio de cultura e da bioquímica celular de *Phaeodactylum tricomutum* (Bohlin), em cultivos estanques. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, 39 (2), 131 – 139.
- ALBALASMEH, A.A.; BERHE, A.A.; GHEZZEHEI, T.A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate polymers**, 97 (2), 253 – 61.
- ALVES, L.S. (2012). **Aplicação de microalgas na remoção de nutrientes de efluente sanitário**. Trabalho de Conclusão do Curso. Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande / PB, 42 p.
- ANNAN, J. N. (2014). Growth and photosynthesis response of the green alga, *Picochlorum oklahomensis* to iron limitation and salinity stress. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, 6(1), 7-18.
- BARRANGUET, C.; KROMKAMP, J. (2000). Estimating primary production rates from photosynthetic electron transport in estuarine microphytobentos. **Marine Ecology Progress Series**, 204 (1), 39 – 52.
- BARROCAL, V. M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M. (2010). Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New biotechnology**, 27 (6), 851 – 6.
- BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. (2007). **Ecologia – de indivíduos à ecossistemas**. Editora Artmed, 4ª ed.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B.; REBELO, A. M. (2007). Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, 7 (2), 85-92.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. (2008). Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência rural**, 38 (1), 54 - 8.
- BEYERINCK, M.W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, 47: 725 - 785.

- BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis research**, 25 (3), 173 - 85.
- BRADFORD, M. M. (1976). **Anal. Biochemistry**, 72, 248p.
- BRASIL (2007). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balanco da Cana-de-Açúcar e Agroenergia Nacional**. MAPA/SPA, Brasília, 140 p.
- BOHNENBERGER, J. E. (2012). **Como a manipulação da temperatura e dos nutrientes pode influenciar no teor de lipídios produzidos em culturas de microalgas de água doce?** Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia (Diversidade e Manejo da Vida Silvestre). Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS. São Leopoldo / RS.
- BONINI, M. A. (2012) **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscópica* Nägeli e *Chorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça**. Dissertação de mestrado do Programa de Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Araras / SP, 96 p.
- BORGES, L. V. FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. O. V. (2007). Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de Desenvolvimento limpo”. **Revista Atlântica**, Rio Grande, 29 (1), 35 – 46.
- BOROWITZKA, M.A. (2014). Tyge Christensen Prize 2012. **Phycologia**, 53 (6), 657 – 58.
- BUDIYONO, I. S.; SUMARDIONO, S.; SASONGKO, S. B. (2014). Production of *Spirulina platensis* Biomass Using Digested Vinasse as Cultivation Medium. **Trends in Applied Sciences Research**, 9 (2), 93 – 102.
- BURLEW, J. S. (1976). **Algal culture. From Laboratory to Pilot Plant**, Carnegie Institution Washington Publication, 5th ed., 358 p.
- CAMPOSTRINI, E. (2010). **Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas**. Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro / RJ. Disponível em:
http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf. Acessado em: 28.ago.2015.
- CANDIDO, C. (2014). **Uso de vinhaça tratada para o cultivo de microalgas de água doce**. Monografia do Curso de Ciências Biológicas. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS). Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos /SP, 39p.
- CANDIDO, C.; LOMBARDI, A.T. (2015). Growth of *Chlorella vulgaris* in treated conventional and biodigested vinasses. Artigo submetido à revista **Biomass and Bioenergy** em 28.01.2015.
- CHEIRSILP, B.; SUWANNARAT, W.; NIYOMDECHA, R. (2011). Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production

- from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. **New Biotechnology**, 28(4), 362-368.
- CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELAO, M. D. G. G.; PARRISH, C. C. (2013a). Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology**, 128 (1), 171 – 182.
- CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELÃO, M. D. G. G.; PARRISH, C. C. (2013b). Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, 48(1), 1-11.
- COCA, M.; BARROCAL, V. M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. (2014). Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, 94, 306-312.
- COSTA, P. H. A.; SILVA, J. V.; BEZERRA, M. A.; ENÉAS FILHO, J.; PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. (2003). Growth and organic and inorganic solute contents in NaCl-stressed cultivars of *Vigna unguiculata*. **Revista Brasileira de Botânica**, 26 (3), 289 – 97.
- EMBRAPA. Árvore do Conhecimento – Cana de Açúcar. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Brasília, 2011. Disponível em:
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>. Acesso em: 05. jul. 2015.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. (2000). **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 203p.
- GIACHINI, C. F.; FERRAZ, M. V. (2009). Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, 7 (15).
- GRANATO, E. F.; SILVA, C. L. (2002). Geração de energia elétrica a partir do resíduo vinhaça. **4º Encontro de Energia no Meio Rural**, Campinas / SP.
- GRIS, L. R. S. (2011). **Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreator airlift**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Porto Alegre / RS.
- GONZALEZ, L.E.; BASHAN, Y. (2000). Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and co-cultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied Environmental Microbiology**, 66 (1), 1527-1531.
- IPCC, Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (2013). Quinto Relatório de Avaliação. **Organização das Nações Unidas (ONU)**, Estocolmo / Suécia.
- JUNEAU, P.; HARRISON, P. J. (2005). Comparison by PAM Fluorometry of photosynthetic activity of nine marine phytoplankton grown under identical conditions. **Photochemistry and Photobiology**, 81 (1), 649 – 653.

- JUNQUEIRA, C. A. R.; MOLINA JUNIOR, V. E.; LOSSARDO, L. F.; FELICIO, B.C.; MOREIRA JUNIOR, O.; MENDES, R. M.; LORANDI, R. (2009). Identificação do potencial de contaminação de aquíferos livres por vinhaça na bacia do Ribeirão do Pântano, Descalvado (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Geociências**, 39 (3), 507 – 18.
- KADIOGLU, A.; ALGUR O. F. (1992). Tests of Media with Vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for Possible Reduction in Vinasse Pollution. **Bioresource Technology**, 42 (1), 1-5.
- KRAUSE, G. H.; JAHNS, P. (2003). Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. In **Light-harvesting antennas in photosynthesis**, 373 - 399. Springer Netherlands.
- LAMONICA, H. M. (2006). Potencial de geração de excedentes de energia elétrica com o biogás produzido a partir da biodigestão da vinhaça na indústria sucro-alcooleira brasileira. **Encontro de energia no meio rural**, 6ª edição. Campinas / SP.
- LÓIO, D. A. (2013). **Tratamento físico-químico de vinhaça por coagulação, floculação e sedimentação e seu aproveitamento no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* visando a produção de biocombustível**. Dissertação de doutorado. Universidade de São Paulo (USP). São Carlos / SP, 103 p.
- LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. (2011). The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis research**, 108 (1), 77-87.
- LOPES, O.; COSTA, L.; LOPES-ASSAD, M. L. (2013). Solubilização de pó de basalto por meio de vinhaça: variação de pH e nutrientes disponíveis. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, 10 (2).
- LUM, K. K.; KIM, J.; LEI, X. G. (2013). Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 4 (1), 53 – 59.
- LUZ, T. P. A.; BONAN, L. F. B.; PASSOLONGO, R.; RAMOS, R. A. V. (2010). Avaliação termodinâmica e termoeconômica do aproveitamento energético da vinhaça num sistema de cogeração de energia de uma usina sucroalcooleira. In **Proceedings of the 9th Brazilian Conference on Dynamics, Control and their Applications**, Serra Negra, SP.
- MARCHELLO, A.E.; LOMBARDI, A.T.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; SOUZA, C.W.O. (2015). Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46 (1), 75-84.
- MARQUES, S. S. I. (2013). **Microalgas como matéria-prima para geração de biocombustíveis: uso da vinhaça como alternativa de redução de custos e contribuição à sustentabilidade**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Salvador / BA.
- MARTINS, J.I.; BATISTOTE, M. (2012) Caracterização Morfológica de Leveduras selvagens isoladas de ambientes de usina, um potencial para produção de Etanol

- combustível. **Encontro de iniciação científica da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul – ENIC**. Paranaíba / MS, 1 (4).
- MARTINS, A.; PEREIRA, D.; ALMEIDA, J.; CARNEIRO, M. (2009). Medidas de fotossíntese - teoria e prática na fisiologia de macroalgas. **II Workshop em Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade**, Ilhabela / SP. Disponível em:
www2.iq.usp.br/workshopalgas/WS.minicurso_PAM_apostila.doc. Acessado em: 31.ago.2015.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; BOSCOLO, W. R. (2008). Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 22 (1), 479 – 484.
- MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J. H.; LAMSAL, B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, 1 (1), 40 – 8.
- MORRIS, E.P.; FORSTER, R.M.; PEENE, J.; KROMKAMP, J.C. (2008). Coupling between Photosystem II electron transport and carbon fixation in microphytobentos. **Aquatic Microbial Ecology**, 50 (1), 301 – 311.
- MORONEY, J.V.; SOMANCHI, A. (1999). How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? **Plant Physiology**, 119 (1), 9 – 16.
- NAPOLÉON, C.; CLAQUIN, P. (2012). Multi-Parametric relationships between PAM measurements and carbon incorporation, an *In Situ* approach. **Plos One**, 7 (1).
- NASCIMENTO, J. F. D.; BÓ, S. D.; FARIAS, M. G.; SANTOS, K. S. D. D.; ROSSO, R. (2011). Utilização da Automação em Hematologia Sysmex 2100 Roche para a Contagem de Células do Líquido Cefalorraquidiano. **Ciência em Movimento-Biociências e Saúde**, 12 (24), 17 – 25.
- OXBOROUGH, K.; BAKER, N. (1997). Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv/Fm without measuring Fo. *Photosynthesis research*, 55 (1), 135 – 142.
- OLIVEIRA, H. T. (1988). **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP – 211 / 11b)**. Dissertação do Programa em Ecologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos / SP.
- PLATT, T.; JASSBY, A.D. (1976). The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, 12(4), 421-430.
- QIANG, H.; RICHMOND, A. (1996). Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, 8 (2), 139 - 45.

- RAMIREZ, N.N.V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J.O. (2014). Growth of microalgae *Scenedesmus sp.* in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57 (5), 630 – 5.
- RAUSCH, T. (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. **Hydrobiologia**, 78 (3), 237 – 251.
- RAVEN, P. H. (2007). **Biologia Vegetal**. Guanabara Koogan: 7ª Edição.
- REYNOLDS, C. S. (2007). Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia*, 578 (1), 37-45.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.; HERDMAN, M.; STANIER, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. General Microbiology**, 111 (1), 1-61.
- ROBLES-GONZÁLEZ, V.; GALÍNDEZ-MAYER, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H. M. (2012). Treatment of mezcal vinasses: A review. **Journal of biotechnology**, 157 (4), 524-546.
- ROSSETTO, A. J. (1987). **Utilização agrônômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira**. In: Paranhos, S.B. (ed.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. In: Paranhos, S.B. (ed.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 2 (1), 435 – 504.
- SCHREIBER U; SCHLIWA U; BILGER W. (1986). Continuous recording of photochemical an non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, 10, 51-61.
- SELESU, N. F. H. (2015). **Desenvolvimento do processo de produção de microalgas em fotobiorreator industrial usando efluente suíno biodigerido**. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba / PR, 96 p.
- SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. (2007). Uso de Vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Eng. Agrícola Ambiental**, 11 (1), 108 – 14.
- SILVA, M.; SZYMANSKI, E.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, W. N. (2010). Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, 31 (4), 901 – 912.
- SZYMANSKY, M.S.E.; BALBINOTI, R.; SCHIRMER, W.N. (2010). Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do Biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 31 (4), 901 – 12.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2002). **Plant Physiology**. Handcover: 3ª ed, 690 p.
- UNICA. União da indústria de cana-de-açúcar. **Etanol, açúcar e energia**. São Paulo: 2015. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 10. set. 2015.

- VIEIRA, T.Q. (2013). **Uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella* sp. Com potencial para produção de biocombustíveis.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 61 p.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. E. (2004). Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, 27 (1), 139 – 45.
- WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. (2005). Measuring growth rates in microalgal cultures. **Algal culturing techniques**, Elsevier: 2005, 269 - 285.
- ZANG, J.W.; FONSECA – ZANG, W.A. Desenho Técnico. **Química. IFG**: Goiás, 2012.