

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

CAROLINA FERREIRA ANDRADE PENTEADO

**Cultivo de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* e biodigerida
visando a produção de biomassa e de outros produtos**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos (SP)

2022

CAROLINA FERREIRA ANDRADE PENTEADO

**Cultivo de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* e biodigerida
visando a produção de biomassa e de outros produtos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof.^a Tit. Maria do Carmo Calijuri

Coorientador: Prof. Tit. Marcelo Zaiat

São Carlos (SP)

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Fp419c C	<p>Ferreira Andrade Penteado, Carolina Cultivo de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar in natura e biodigerida visando a produção de biomassa e de outros produtos / Carolina Ferreira Andrade Penteado; orientadora Maria do Carmo Calijuri; coorientador Marcelo Zaiat. São Carlos, 2022.</p>
	<p>Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2022.</p>
	<p>1. Fitorremediação. 2. Vinhaça. 3. Chlorella spp.. 4. Produção de biomassa. 5. Mixotrofia. 6. Microalgas. I. Título.</p>

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **CAROLINA FERREIRA ANDRADE PENTEADO**.

Título da tese: "Cultivo de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar in natura e biodigerida visando a produção de biomassa e de outros produtos".

Data da defesa: 11/02/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Profa. Titular **Maria do Carmo Calijuri**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada

Prof. Dr. **Arivaldo José da Silva**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

Prof. Dr. **Reinaldo Gaspar Bastos**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Profa. Dra. **Ana Teresa Lombardi**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Dr. **José Juan Barrera Alba**
(Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Dedico esse trabalho a meus pais, Elza e Edson. Ao meu esposo Eduardo Penteado e às nossas filhas que estão a caminho e se tornaram fonte de incentivo e de amor para o encerramento desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, Dra. Maria do Carmo Calijuri e ao meu coorientador Dr. Marcelo Zaiat, pela confiança, amizade, paciência, apoio, carinho e respeito durante esses anos de orientação.

Aos meus pais Elza e Edson (in memoriam), pelo exemplo de dedicação e amor incondicional. Aos meus familiares e amigos por todo apoio e carinho. Aos meus sogros Rosângela e Dirceu e meu cunhado Lucas Penteado, meu carinhoso agradecimento por todo o suporte e apoio. À Teresa Dellosso por todo o apoio e amizade.

Ao meu companheiro Eduardo Dellosso Penteado, pelo amor, apoio e companheirismo nas horas fáceis e difíceis dessa trajetória, te amo. Às nossas filhas, Mariana e Eliza, nossos amores que ainda estão a caminho, que possamos transmitir nossos mais preciosos valores, ensinamentos e muito amor.

Aos amigos do LPB Lucas Fuess, Adriana Maluf, Carol Granatto e demais alunos do LPB pelo apoio e parceria nas coletas e caracterização da vinhaça.

Agradeço ao professor Dr. Daniel Araki Ribeiro (Unifesp Baixada Santista) pela amizade, incentivo e por toda a troca de conhecimento e disponibilização de recursos materiais para a conclusão deste trabalho.

Um agradecimento especial à Dra. Sarah Vargas e a Dra. Raquel de Rossi, pelas contribuições no exame de qualificação e ao decorrer do trabalho. E a Dra. Ana Paula (LATAR/SHS-USP) pelo auxílio na obtenção das amostras das microalgas.

Meu agradecimento ao técnico do Laboratório de Saneamento Júlio Trofino e equipe, por toda a presteza e atenção na realização das análises laboratoriais. E à Dra. Adriana Cristina Poli Miwa, técnica do laboratório BIOTACE, obrigada pela amizade e por todo o auxílio na realização dos experimentos e dia a dia do lab.

Aos amigos do laboratório BIOTACE Wesley Saltarelli, Carolina Barbosa, Fellipe Moutinho, Janaína Malta, Karen Zambrano, Lucas Maroubo, Munique Moraes, Murilo Ferreira, Nicolás Finkler, Raphaella Rodrigues, Vinícius Diniz, nossos cafezinhos e conversas, vocês tornaram todo o caminho mais leve. Agradeço o apoio, carinho e amizade dos amigos do Sanca Badalada, em especial Inae, Ju Pessim, Ju Argente, Alejandra e Raíssa, além das minhas queridas amigas Marina Batalin e Clarissa Câmara.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS): Maria Auxiliadora C. Altieri Pin (Sá), Priscila Carla Toselli de Almeida (Pri), Rosemeire A. de Jesus, Fernanda Struzziatto e André Canale Garcia.

Por fim, agradeço a EESC-USP pela infraestrutura cedida, às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado, fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho

*“Façamos da interrupção um caminho novo.
Da queda um passo de dança,
do medo uma escada, do
sonho uma ponte,
da procura um encontro!”
(Fernando Sabino)*

RESUMO

PENTEADO, C.F.A. **Cultivo de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* e biodigerida visando a produção de biomassa e de outros produtos.** 2022. 145 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

A vinhaça é um resíduo altamente poluente e gerado em grandes volumes. Este resíduo pode ser uma fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas, organismos fotossintetizantes que demandam nutrientes minerais para seu crescimento e aparece como opção para diversas aplicações biotecnológicas. Pesquisas com microalgas em vinhaça vêm se tornando frequentes, mas ainda poucas espécies foram exploradas e poucos estudos discutem sobre a interferência de outros microrganismos no cultivo e a viabilidade celular das células microalgais ao final dos processos. Além disso, o uso de diferentes pré-tratamentos dificulta a comparação entre os resultados e são considerados desafios importantes a serem superados. Diante desses fatores, considerou-se nesse trabalho investigar o uso da vinhaça *in natura* (Vnat) e biodigerida (Vbio) como meio de cultivo, por via mixotrófica, das microalgas clorofíceas *Chlorella sorokiniana* (Csk), *Chlorella vulgaris* (Cvg) e *Desmodesmus* sp. (Dsp) para aplicações biotecnológicas futuras. Primeiramente, foram testados dois meios de cultura sintéticos (BG-11 e WC), para o aumento da produção de biomassa microalgal das três cepas. Neste experimento, foi possível observar uma maior taxa de crescimento específico, menores tempo de geração e rendimento de biomassa microalga no meio de cultivo WC, sendo escolhido esse meio para a manutenção das microalgas. Em outro experimento, avaliou-se a produção de biomassa das microalgas e a capacidade de remoção de nutrientes, no meio sintético controle WC (resultado Experimento I) e em diluições de vinhaça *in natura* e biodigerida, que variaram de 1 a 80%. A partir da avaliação do desempenho dos parâmetros cinéticos e rendimentos de biomassa, atestou-se as melhores condições de cultivo para as três cepas em vinhaça *in natura* diluída a 40% para Csk e Cvg (40Vnat) e a 5% para Dsp (5Vnat) e em vinhaça biodigerida diluída a 20% para a cepa Dsp (20Vbio), e a 60% e 80% para as cepas Csk e Cvg, pois mantiveram ou aumentaram seu crescimento e rendimento de biomassa e apresentaram elevadas concentrações de clorofila a. Foram observadas remoções elevadas de nutrientes no tratamento biológico realizado neste experimento tanto na vinhaça *in natura* quanto na vinhaça biodigerida, com eficiências de remoção de até 89,6% para nitrato (NO₃⁻), 91,6% para o fosfato solúvel reativo (PO₄³⁻) e 68,1% para o COT. Quando foi feito o aumento de volume para 2 L das cepas Csk e Cvg nas condições 40Vnat e 60Vbio (Experimento III) foi possível observar que as microalgas mantiveram a viabilidade celular, preservando suas condições morfológicas mesmo em condições não axênicas. Portanto, o uso de vinhaça *in natura* e biodigerida foi considerada uma estratégia tecnicamente viável para a produção da biomassa e obtenção de bioprodutos de interesse apenas para as microalgas clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*.

Palavras-chave: vinhaça, produção de biomassa, remoção de nutrientes, viabilidade celular.

PENTEADO, C.F.A. **Microalgae cultivation in biodigested and *in natura* sugarcane vinasse for the production of biomass and other products.** 2022. 145 f. Thesis (PhD) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2022.

Vinasse is a highly polluting waste generated in large volumes. This residue can be a source of nutrients for the cultivation of microalgae, photosynthetic organisms that require mineral nutrients for their growth and appears as an option for several biotechnological applications. Research with microalgae in vinasse is becoming frequent, but few species have been explored and few studies discuss the interference of other microorganisms in cultivation and the physiological viability of microalgal cells at the end of the process. Furthermore, the use of different pre-treatments makes it difficult to compare results and are considered important challenges to be overcome. Given these factors, this study considered the investigation of the use of *in natura* (Vnat) and biodigested (Vbio) vinasse as a mixotrophic culture medium for the microalgae *Chlorella sorokiniana* (Csk), *Chlorella vulgaris* (Cvg) and *Desmodesmus* sp. (Dsp) for future biotech applications. First, two synthetic culture media (BG-11 and WC) were tested to increase the production of microalgal biomass of the three strains. In this experiment, it was possible to observe a higher specific growth rate, shorter generation time and microalgae biomass yield in the WC culture medium, this medium being chosen for the maintenance of microalgae. In another experiment, the microalgae biomass production and nutrient removal capacity were evaluated in WC control synthetic medium (Experiment I) and *in natura* and biodigested vinasse dilutions, which ranged from 1 to 80%. From the evaluation of the performance of the kinetic parameters and biomass yields, the best growing conditions were confirmed for the three strains *in natura* vinasse diluted to 40% for Csk and Cvg (40Vnat) and to 5% for Dsp (5Vnat) and in biodigested vinasse diluted at 20% for the Dsp strain (20Vbio), and at 60% and 80% for the Csk and Cvg strains, as they maintained or increased their growth and biomass yield and presented high concentrations of chlorophyll *a*. Elevated nutrient removals were observed in the biological treatment carried out in this experiment both in fresh vinasse and in biodigested vinasse, with removal efficiencies of up to 89.6% for nitrate (NO₃⁻), 91.6% for reactive soluble phosphate (PO₄³⁻) and 68.1% for TOC. When the volume was increased to 2 L of the Csk and Cvg strains under 40Vnat and 60Vbio conditions (Experiment III), it was possible to observe that the microalgae maintained their physiological viability, preserving their morphological conditions even under non-axenic conditions. Therefore, the use of *in natura* and biodigested vinasse was considered a technically viable strategy for the production of biomass and obtaining bioproducts of interest only for the *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* microalgae.

Keywords: vinasse, biomass production, nutrient removal, physiological viability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Processamento da cana-de-açúcar com geração de resíduos sólidos, líquidos e gasosos que têm destinos distintos na indústria sucroalcooleira	5
Figura 2.1 – Capítulo II: Fluxograma experimental	18
Figura 2.2 –Imagens do cultivo em meio sintético BG-11 para as cepas Csk, Cvg e Dsp nos dias inicial (D ₀) e final (D ₉) do experimento	27
Figura 2.3 - Imagens do cultivo em meio sintético WC para as cepas Csk, Cvg e Dsp nos dias inicial (D ₀) e final (D ₉) do experimento	27
Figura 2.4- Curvas de crescimento A: absorbância ($\lambda_1= 683$ nm) por tempo (dias) para as cepas Csk, Cvg e Dsp nos meios sintéticos BG-11 e WC e B: absorbância ($\lambda_2= 750$ nm) por tempo (dias) para as cepas Csk, Cvg e Dsp nos meios sintéticos BG-11 e WC.	28
Figura 3.1 – Capítulo III: Fluxograma Experimental	40
Figura 3.2 – Pré- inóculos (R ₀) das microalgas Csk, Cvg e Dsp, cultivadas em meios sintético WC mantidos até o momento do experimento no Banco de Cultura de Algas do Laboratório BIOTACE	44
Figura 3.3 - Representação das dezessete condições experimentais antes do início do experimento: (A) condição controle em meio sintético WC (sem diluição), (B) oito diluições de vinhaça <i>in natura</i> , e (C) oito diluições da vinhaça biodigerida	46
Figura 3.4 – Arranjo experimental dos repiques sequenciais para o aumento do volume de biomassa em culturas com vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida	52
Figura 3.5 – Incubadora (Nova Ética B.O.D 411D), adaptada com iluminação à LED (Light Emitting Diode), com as 4 amostras do Experimento III, realizado em triplicata por um período de 10 dias para as microalgas <i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> nas condições de 40Vnat e 60Vbio	53
Figura 3.6 – Imagem ilustrativa da análise de biomassa seca	54
Figura 3.7 – Etapas do teste de presença de clorofila <i>a</i> em amostras de microalgas: A- Lâminas com amostras do final do cultivo; B- imagem microscópica C- imagem microscópica com fluorescência	55
Figura 3.8 –Imagens ilustrativas a) das lâminas das fases A(controle) e B (sulfato de alumínio); b): lâminas das fases A e B coradas com Azul de Tripano e c) Imagem ilustrativa dos tubos Eppendorf com amostras coradas com Azul de Tripano a 1% para avaliação da viabilidade celular	57
Figura 3.9- Crescimento algal de <i>Chlorella sorokiniana</i> (Csk) para o dia inicial (D ₀) e dia final (décimo dia - D ₁₀) para os cultivos em meio sintético WC e em diferentes diluições em vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida	63

Figura 3.10- Crescimento algal de <i>Chlorella vulgaris</i> (Cvg) para o dia inicial (D ₀) e dia final (décimo dia - D ₁₀) para os cultivos em meio sintético WC e em diferentes diluições em vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida	64
Figura 3.11- Crescimento algal de <i>Desmodesmus sp.</i> (Dsp) para o dia inicial (D ₀) e dia final (décimo dia - D ₁₀) para os cultivos em meio sintético WC e em diferentes diluições em vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida	65
Figura 3.12- Curvas de crescimento linearizadas da absorbância ($\lambda=683\text{nm}$) nas condições controle com meio sintético (WC) e nas diluições de 1 a 80 por cento de diluição de A: vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) e B: biodigerida (Vbio) para a cepa de microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> (Csk)	66
Figura 3.13- Curvas de crescimento linearizadas da absorbância (A.U. $\lambda=683\text{nm}$) nas condições controle com meio sintético (WC) e nas diluições de 1 a 80 por cento de diluição de A: vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) e B: biodigerida (Vbio) para a cepa de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> (Cvg)	67
Figura 3.14 - Curvas de crescimento linearizadas da absorbância (A.U. $\lambda=683\text{nm}$) nas condições controle com meio sintético (WC) e nas diluições de 1 a 80 por cento de diluição de A: vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) e B: vinhaça biodigerida (Vbio) para a cepa de microalga <i>Desmodesmus sp.</i> (Dsp)	68
Figura 3.15- Imagens microscópicas das microalgas (A) Cvg, (B) Csk e (C) Dsp., após os dez dias experimentais, com aumento de 200x em meio sintético WC	75
Figura 3.16 - Imagens microscópicas da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> (Cvg) em vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) nas condições (A) 30Vnat, (B) 40Vnat, (C)-60Vnat e (D) 80Vnat, após dez dias experimentais, com aumento de 200x	76
Figura 3.17- Imagens microscópicas da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> (Cvg) em vinhaça <i>biodigerida</i> nas condições: (A) 40Vbio; (B) 60Vbio e (C) 80Vbio, após dez dias experimentais, com aumento de 200x	78
Figura 3.18 - imagens microscópicas da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> (Csk) em vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) nas condições: (A) 30Vnat, (B) 40Vnat, (C) 60Vnat e (D) 80Vnat, após dez dias experimentais, com aumento de 200x	79
Figura 3.19- imagens microscópicas da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> (Csk) em vinhaça <i>biodigerida</i> (Vbio) nas condições: (A) 30Vbio, (B) 40Vbio, (C) 60Vbio e (D) 80Vbio, após dez dias experimentais, com aumento de 200x	80
Figura 3.20 - Imagens microscópicas da microalga <i>Desmodesmus sp.</i> (Dsp) em (A) vinhaça <i>in natura</i> (40Vnat) e em (B) vinhaça <i>biodigerida</i> (5Vbio), após dez dias experimentais, com aumento de 200x	81
Figura 3.21- Eficiência de remoção de COT para as cepas <i>Chlorella Sorokiniana</i> (Csk, ■), <i>Chlorella vulgaris</i> (Cvg, ■) e <i>Desmodesmus sp</i> (Dsp, ■) nas condições de vinhaça <i>in natura</i> (A) e biodigerida (B) diluídas entre 1% e 80%	88
Figura 3.22- Eficiência de remoção de NT para as cepas <i>Chlorella sorokiniana</i> (Csk, ■), <i>Chlorella vulgaris</i> (Cvg, ■) e <i>Desmodesmus sp</i> (Dsp,	91

-) nas condições de vinhaça *in natura* (A) e biodigerida (B) diluídas entre 1% e 80%
- Figura 3.23-** Esquema simplificado da assimilação de nitrogênio inorgânico pelas microalgas. 93
- Figura 3.24-** Eficiência de remoção de nitrato para as cepas *Chlorella Sorokiniana* (Csk, ■), *Chlorella vulgaris* (Cvg, ■) e *Desmodesmus sp* (Dsp, ■) nas condições de vinhaça *in natura* (A) e biodigerida (B) diluídas entre 1% e 80%. 94
- Figura 3.25-** Eficiência de remoção de NT para as cepas *Chlorella Sorokiniana* (Csk, ■), *Chlorella vulgaris* (Cvg, ■) e *Desmodesmus sp* (Dsp, ■) nas condições de vinhaça *in natura* (A) e biodigerida (B) diluídas entre 1% e 80%. 96
- Figura 3.26** – Fotobiorreatores de 5L com 2L de culturas com as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio) ao final do experimento 98
- Figura 3.27** – Gráficos com resultados do monitoramento do pH em (A) vinhaça *in natura* na diluição de 40% (40Vnat) e em (B) vinhaça biodigerida na diluição de 60% (60Vbio) para as cepas *Chlorella sorokiniana* (●) e *Chlorella vulgaris* (●) 100
- Figura 3.28** – Eficiência de remoção de COT, NT NO₃ em (A) vinhaça *in natura* na diluição de 40% (40Vnat) e em (B) vinhaça biodigerida na diluição de 60% (60Vbio) para as cepas *Chlorella sorokiniana* (●) e *Chlorella vulgaris* (●). 101
- Figura 3.29** – Imagens do teste de fluorescência de clorofila *a* realizado para as condições: 1- *Chlorella sorokiniana* – 40Vnat; 2- *Chlorella vulgaris* – 40Vnat; 3- *Chlorella sorokiniana* – 60Vbio e 4- *Chlorella vulgaris* – 60Vbio 103
- Figura 3.30** – Imagens do teste de viabilidade celular realizado para a condição 1- cultivo da *Chlorella sorokiniana* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (Csk-40Vnat), onde a) imagem do cultivo (aumento 40x); b) a e) imagens da microalga submetidas a 4 concentrações de sulfato de alumínio (aumento de 200x); e f) a i) imagens das microalgas nas 4 concentrações de sulfato de alumínio com corante azul de tripano e aumento de 200x. 104
- Figura 3.31** – Imagens do teste de viabilidade celular realizado para a condição 2 – cultivo da *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (Cvg-40Vnat), onde a) imagem do cultivo (aumento 40x); b) a e) imagens da microalga submetidas a 4 concentrações de sulfato de alumínio (aumento de 200x); e f) a i) imagens das microalgas nas 4 concentrações de sulfato de alumínio com corante azul de tripano e aumento de 200x). 105
- Figura 3.32** – Imagens do teste de viabilidade celular realizado para a condição 3- *Chlorella sorokiniana* em vinhaça biodigerida diluída a 60% (Csk-60Vbio), onde a) imagem do cultivo (aumento 40x); b) a e) imagens da microalga submetidas a 4 concentrações de sulfato de alumínio 106

(aumento de 200x); e f) a i) imagens das microalgas nas 4 concentrações de sulfato de alumínio com corante azul de tripano e aumento de 200x.

Figura 3.33 – Imagens do teste de viabilidade celular *realizado para a condição 4- Chlorella vulgaris* – 60Vbio, onde a) imagem inóculo (aumento 40x); b) a e) imagens da fase A (microalga nas 4 concentrações de sulfato de alumínio e aumento de 200x); e f) a i) imagens da fase C (microalgas nas 4 concentrações de sulfato de alumínio com corante azul de tripano e aumento de 200x

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição química da vinhaça de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	7
Tabela 1.2 - Principais impactos ambientais decorrentes da aplicação da fertirrigação com vinhaça	8
Tabela 1.3 - Rotas metabólicas das microalgas em relação à fonte de energia e carbono	11
Tabela 1.4 – Cultivo de microalgas e taxas de crescimento específicas em vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida encontradas na literatura	14
Tabela 2.1 – Composição e concentração final do meio de cultura sintético BG-11 (Rippka, 1979)	19
Tabela 2.2 - Composição e concentração final do meio de cultura sintético WC (Guillard e Lorenzen, 1972)	20
Tabela 2.3 - Condições de manutenção e aspectos físico-químicos aplicados no cultivo das cepas <i>Chlorella vulgaris</i> (Cvg), <i>Chlorella sorokiniana</i> (Csk) e <i>Desmodesmus sp.</i> (Dsp)	21
Tabela 2.4 – Condições de cultivo e aspectos físico-químicos	25
Tabela 2.5 – Valores médios de rendimento de biomassa por absorvância ($\lambda_1= 683$ nm e $\lambda_2= 750$ nm) e indicação da metade da fase exponencial (dias) para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) cultivadas nos meios sintéticos BG-11 e WC	29
Tabela 2.6 – Parâmetros cinéticos de crescimento: taxa de crescimento (μ , d^{-1}), tempo de geração (T_g , dia), velocidade de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, dia^{-1}), amplitude (A) e Modelagem de Gompertz (R^2), para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) cultivadas nos meios sintéticos BG-11 e WC	32
Tabela 3.1 – Variáveis físico-químicas e seus respectivos métodos de análise e referências utilizados na caracterização inicial da vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida	42
Tabela 3.2 - Condições de cultivo e aspectos físico-químicos	47
Tabela 3.3 - Métodos e referências para avaliação da clorofila <i>a</i> e da biomassa algal	48
Tabela 3.4 - Métodos e referências para avaliação dos efluentes após os cultivos com microalgas	49
Tabela 3.5 – Condições aplicadas ao crescimento das microalgas Csk e Cvg em fotobiorreatores de 5L	53
Tabela 3.6 – Concentrações de sulfato de alumínio testadas no experimento	58
Tabela 3.7 - Propriedades físico-químicas da vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida	60
Tabela 3.8 - Taxas específicas médias de crescimento (μ , dia^{-1}) na condição controle em meio sintético WC e nas condições percentuais de	70

diluição (1 a 80%) em vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) e vinhaça biodigerida (Vbio) para Csk, Cvg e Dsp	
Tabela 3.9- Comparação das taxas de crescimento específicas (μ , dia ⁻¹) obtidas na literatura e neste trabalho usando vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) e vinhaça biodigerida (Vbio) para o cultivo das microalgas Csk, Cvg e Dsp	72
Tabela 3.10- Rendimento de biomassa pela absorbância a 683nm das três cepas (Csk, Cvg e Dsp) nas condições controle com meio sintético (WC) e nas diluições de 1 a 80% de vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) e biodigerida (Vbio)	73
Tabela 3.11- Concentrações finais de clorofila <i>a</i> e sólidos suspensos voláteis (SSV) ao final do experimento para todas as condições testadas.	82
Tabela 3.12- Comparação concentrações de clorofila <i>a</i> obtidas na literatura e neste trabalho usando vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) e vinhaça biodigerida (Vbio) para o cultivo das microalgas Csk, Cvg e Dsp	84
Tabela 3.13- Valores de pH no início e ao final do experimento para todas as condições testadas	85
Tabela 3.14- Concentrações iniciais e finais de carbono orgânico total para todas as condições testadas	87
Tabela 3.15 - Concentrações iniciais e finais de nitrogênio para todas as condições testadas.	89
Tabela 3.16- Concentrações iniciais e finais de nitrato para todas as condições testadas	92
Tabela 3.17- Concentrações iniciais e finais do fósforo solúvel reativos (PO ₄ ³⁻) para todas as condições testadas	95
Tabela 3.18 – Resultados encontrados para biomassa seca (mg.L ⁻¹) e clorofila <i>a</i> (mg.L ⁻¹) no Experimento III	99
Tabela 3.19- Caracterização química de (A) vinhaça <i>in natura</i> na diluição de 40% (40Vnat) e em (B) vinhaça biodigerida na diluição de 60% (60Vbio) antes e após o cultivo das microalgas <i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 – Microalgas e as quatro condições testadas no Experimento III realizado com <i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> em vinhaça <i>in natura</i> (40Vnat) e em vinhaça biodigerida (60Vbio)	50
Quadro 3.2 – Parâmetros e métodos de referência	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A: amplitude

ANOVA: análise de variância

BIOTACE: Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CO₂: dióxido de carbono

COT: carbono orgânico total

Csk: *Chlorella vulgaris*

Cvg: *Chlorella sorokiniana*

D.O.: densidade óptica

DA: Digestão Anaeróbia

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO: Demanda Química de Oxigênio

Dsp: *Desmodesmus* sp.

GEE: gases de efeito estufa

LED: Light Emitting Diode

NO₃⁻: nitrato

NT: nitrogênio total (NT)

pH: potencial hidrogeniônico

PO₄³⁻: ortofosfato /fósforo solúvel reativo

R_x: repique

SST: sólidos suspensos totais

SSV: sólidos suspensos voláteis

Tg: tempo de geração (Tg)

USP: Universidade de São Paulo

Vbio: vinhaça biodigerida

Vnat: vinhaça in natura

WC: meio Water Culture

λ : Comprimento de onda

μ máx: velocidade específicas de crescimento

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II	16
2.1 Introdução	16
2.2 Objetivos	17
2.3 Materiais e métodos	18
2.3.1 Obtenção das cepas	18
2.3.2 Meios de cultura sintéticos	19
2.3.3 Condições de manutenção das microalgas.....	20
2.3.4 Caracterização do crescimento microalgal: curvas e parâmetros cinéticos de crescimento.....	21
2.3.5 Análise estatística	24
2.3.6 Experimento I: Definição do meio sintético para o crescimento da biomassa de microalgas clorofíceas.....	24
2.4 Resultados e Discussão	26
2.4.1 Análise das culturas	26
2.4.2 Curvas de crescimento e rendimento de biomassa.....	28
2.4.3 Taxa de crescimento, tempo de geração, velocidade de crescimento e amplitude.....	31
2.5 Considerações finais	34
CAPÍTULO III	36
3.1 Introdução	36
3.2 Hipóteses	38
3.3. Objetivos	39
3.4 Materiais e métodos	40
3.4.1 Coleta e caracterização inicial da vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida	41

3.4.2 Experimento II: Avaliação do crescimento da biomassa de microalgas e remoção de nutrientes em meio sintético WC (condição controle) e em diferentes diluições de vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida.....	43
3.4.3 Experimento III: Aumento da escala de cultivo, análise do efluente final e testes de fluorescência de clorofila <i>a</i> e viabilidade celular	50
3.5 Resultados e Discussão.....	59
3.5.1 Caracterização inicial da vinhaça <i>in natura</i> e biodigerida.....	59
3.5.2 Resultados do Experimento II	61
3.5.3 Resultados do Experimento III	97
3.6 Considerações finais.....	108
CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS.....	113

INTRODUÇÃO

Sistemas que se baseiam em microalgas para tratamento de águas residuárias têm recebido muito interesse nos últimos anos devido às suas diversas vantagens. O conceito de biorrefinaria de microalgas para a geração de biocombustíveis e bioprodutos se destaca entre as mais importantes aplicações (Daneshvar et al., 2019).

As microalgas são microrganismos capazes de converter água e dióxido de carbono em açúcar por meio da fotossíntese e gerarem oxigênio como subproduto. Nos modos de cultivo autotrófico e mixotrófico, as microalgas precisam de água, nutrientes, luz e CO₂. A partir dessas necessidades, o cultivo de microalgas em águas residuárias é visto como adequado e sustentável pela diminuição da concentração de poluentes, pela elevada absorção de CO₂ e pelo aumento da concentração de oxigênio (Ling et al., 2014). Esta aplicação além de cobrir questões ambientais importantes como a redução da liberação de gases de efeito estufa (GEE) também pode impactar positivamente na questão econômica devido à redução ou até mesmo substituição da utilização de produtos químicos para seu tratamento (Razzak et al., 2017).

Além do tratamento da água residuária, a biomassa de microalgas é produzida simultaneamente, sem adição de nutrientes e não demanda recursos extras para seu crescimento (Daneshvar et al., 2019). Esses microrganismos com alta eficiência fotossintética se adaptam e crescem rapidamente em diferentes tipos de águas residuárias. Eles têm alta habilidade e capacidade de absorver nutrientes, especialmente fósforo e compostos de nitrogênio, comumente encontrados em diferentes tipos de águas residuárias (Cheng et al., 2018). Dependendo das espécies de microalgas e das características do despejo, como as concentrações iniciais de nutrientes (nitrogênio e fósforo), o tempo e as condições de cultivo, o crescimento da microalga e sua eficiência de remoção de poluentes podem ser diferentes (Daneshvar et al., 2019).

As microalgas são conhecidas como fonte de biocombustíveis de terceira geração, depois das culturas alimentares (primeira geração) e não alimentares

(segunda geração). A biomassa de microalgas produzida e colhida a partir de águas residuárias pode ser usada como matéria-prima energética. Cultivo, colheita, secagem de biomassa, extração e transesterificação de lipídios são diferentes etapas da produção de biodiesel a partir de microalgas (Pokoo-Aikins et al., 2010).

Para o setor sucroenergético brasileiro, alvo desse estudo, os resíduos mais críticos em quantidade e impacto no meio ambiente são a vinhaça e o CO₂ (Sydney et al., 2021). A vinhaça é um resíduo com elevado potencial poluente, com coloração marrom escuro, elevada turbidez, concentração de matéria orgânica, nutrientes minerais, demanda química de oxigênio (DQO), demanda biológica de oxigênio (DBO) e baixo pH (Silva et al., 2007; Candido, 2019). Embora a fertirrigação de culturas da cana-de-açúcar seja a principal estratégia ainda empregada no Brasil para a destinação dos volumes de vinhaça gerados anualmente (3,8 10¹¹ L) (UNICA, 2017), as consequências para o solo e as águas subterrâneas são reconhecidamente prejudiciais (Cristóbal et al., 2016; Liska e Cassman, 2008).

Portanto, com a aplicação do conceito de biorrefinaria, a vinhaça da cana-de-açúcar pode se transformar de um resíduo desafiador a um recurso valioso para diferentes aplicações biotecnológicas, tendo como destaque os avanços na digestão anaeróbia (DA) e o tratamento biológico isolado ou em consórcio realizado por fungos, bactérias e microalgas (Reis e Hu, 2017; Candido e Lombardi, 2018).

Na digestão anaeróbia ocorre a degradação biológica de compostos orgânicos complexos, em vários estágios bioquímicos consecutivos (reações em cadeia), cada qual realizado por diferentes grupos de microrganismos específicos. Ao final do processo de digestão anaeróbia (DA) são também gerados volumes de vinhaça, conhecidos por biodigestatos ou vinhaça biodigerida que, quando comparada a vinhaça *in natura* são observadas reduções na turbidez, quantidade de matéria orgânica, além da elevação do pH, entre outros benefícios, apresentando redução significativa do seu potencial poluente.

Os mesmos nutrientes disponíveis na vinhaça que são normalmente destinados à aplicação em campo, via fertirrigação das culturas de cana-de-açúcar, podem também ser utilizados como meio de cultura para as microalgas (Candido, 2019). Para o seu crescimento autotrófico, realizado por intermédio da fotossíntese, estes organismos demandam nutrientes e minerais. Além disso, em via mixotrófica, diversas espécies microalgais são capazes de consumir os nutrientes orgânicos do meio,

potencializando o seu crescimento e como consequência aumentando a produção de biomassa (Marchello et al., 2015; Candido e Lombardi, 2018).

A geração de biomassa algal é vista como uma oportunidade comercial interessante devido aos mais diferenciados subprodutos que podem ser obtidos a partir de microalgas, como clorofila *a*, carotenoides, proteínas, vitaminas, ficobilinas, ácidos graxos poli-insaturados, entre outros compostos bioativos (Borowitzika, 2013).

Apesar dos trabalhos sobre cultivos de microalgas em vinhaça se iniciarem na década de 1980 (Oliveira, 1988), ainda existem muitos desafios. Em muitas das investigações existentes que se propõem ao cultivo de microalgas em vinhaça se limitam à escala laboratorial devido aos diferentes pré-tratamentos aplicados que inviabilizam sua aplicação em escala real e a comparação de seus resultados. Há uma carência de investigações com vistas a tratamentos mais viáveis para o resíduo e cepas microalgais tolerantes e mais produtivas, que melhorem as condições de cultivo, que investiguem a fisiologia celular dos organismos no resíduo e que discutam sobre a presença de contaminantes biológicos presentes na biomassa produzida (Candido, 2019).

Neste sentido, esta pesquisa de doutorado buscou aproveitar a abundância de nutrientes presentes na vinhaça da cana-de-açúcar, aliada a uma proposta de cultivo simplificado de microalgas, com menores exigências relacionadas ao pré-tratamento da vinhaça. Ademais, foram aplicados cultivos não-axênicos, i.e., com a reconhecida presença de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras na vinhaça.

Para isso, a estrutura dessa tese foi organizada em três capítulos.

No Capítulo I foi apresentada revisão da literatura. O Capítulo II apresenta o Experimento I, dedicado a avaliar o crescimento e produção de biomassa das três cepas utilizadas no estudo, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* e *Desmodesmus* sp., com cultivo em dois meios de cultura sintéticos distintos. Com a avaliação do crescimento e produção de biomassa foi possível definir qual meio sintético seria o mais adequado ao cultivo das microalgas para aplicação como condição de referência (controle) no Capítulo III.

O Capítulo III apresenta o Experimento II dedicado à avaliação do crescimento de microalgas e remoção de nutrientes em diferentes diluições de vinhaça *in natura* e biodigerida e na condição de referência (controle). No mesmo capítulo encontra-se o Experimento III, no qual investigou-se o aumento do volume de cultivo, análise do efluente final e testes de fluorescência de clorofila *a* e a viabilidade celular das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* ao final dos cultivos realizados com vinhaça *in natura* e biodigerida, nas melhores condições encontradas no Experimento II.

Por fim, este trabalho teve por visão a promoção de técnicas menos complexas e ao mesmo tempo eficazes para a produção de biomassa microalgal aliada ao tratamento da vinhaça, com vistas a melhorar a sustentabilidade econômico-ambiental e conseqüentemente reduzir os impactos ambientais causados por esse importante resíduo da agroindústria brasileira.

CAPÍTULO I

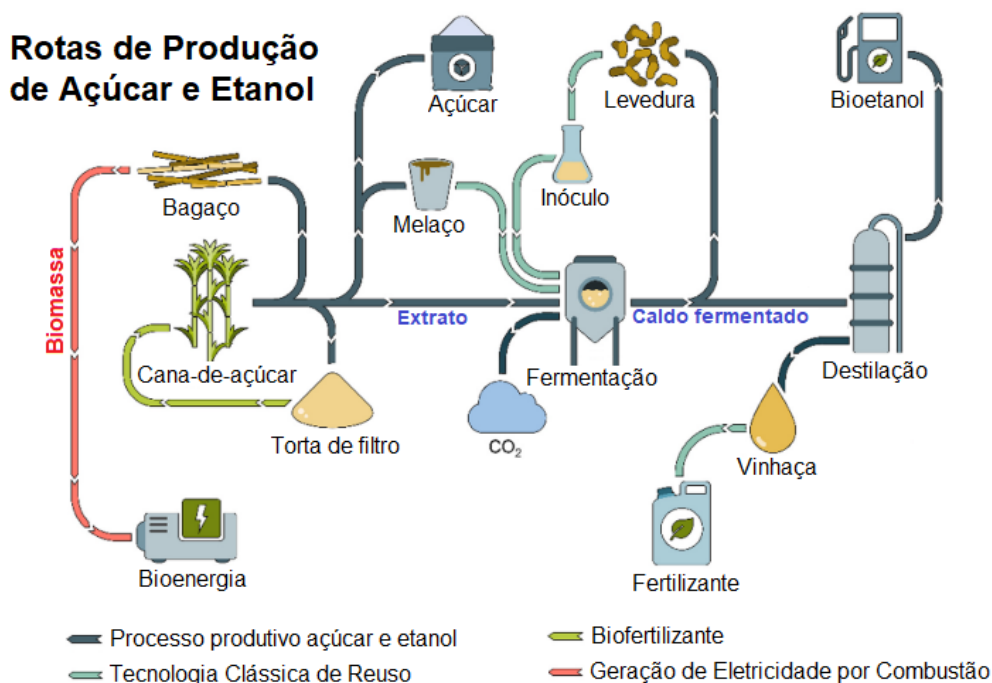
REVISÃO DE LITERATURA

Enquanto para muitas fontes de resíduos uma ampla literatura pode estar disponível (por exemplo, águas residuárias municipais), para outras, as referências são mais escassas e muitas oportunidades ainda estão subutilizadas – como é o caso da vinhaça de cana-de-açúcar (Reis e Hu, 2018).

A vinhaça de cana-de-açúcar é um resíduo gerado ao final do processo de destilação do mosto fermentado para a produção de etanol, sendo considerado o principal resíduo, por gerar de 12 a 15 litros de vinhaça a cada litro de etanol produzido (Sydney et al., 2021).

A indústria sucroalcooleira vêm sendo reconhecida como o principal exemplo de biorrefinaria no mundo visto que a maioria dos resíduos sólidos, líquidos e gasosos gerados são reutilizados no próprio ciclo (Figura 1.1) (Sydney et al., 2021).

Figura 1.1 - Processamento da cana-de-açúcar com geração de resíduos sólidos, líquidos e gasosos que têm destinos distintos na indústria sucroalcooleira



Fonte: Adaptada de Sydney et al. (2021) com permissão.

A colheita gera a maior parte dos resíduos sólidos e aproximadamente 60% da planta da cana-de-açúcar (palha, folhas e copas verdes) é deixada no solo como protetor natural e fertilizante (Magalhães et al., 2019; Menandro et al., 2017). A cana colhida é moída para a extração do caldo, etapa de geração do bagaço. Cada tonelada de cana gera 140 kg de bagaço (Pippo et al., 2011), que é queimado em caldeiras para geração de vapor e eletricidade para uso interno da usina. A energia excedente é vendida para distribuidoras de energia elétrica.

Antes de chegar aos tanques de fermentação, ou aos evaporadores e cristalizadores para produção de açúcar, o caldo da cana é filtrado; os sólidos retidos - chamados de torta de filtro - são usados como fertilizante (Prado et al., 2013). O melaço, o subproduto líquido da cristalização do açúcar, é então misturado ao caldo da cana-de-açúcar antes da fermentação (Sydney et al., 2021).

Na etapa de fermentação, dois resíduos principais são gerados: (i) CO₂, que é liberado para a atmosfera; e (ii) a levedura, que é parcialmente recirculada como inóculo e que, posteriormente, é vendida para a indústria de rações ou destinada às colunas de destilação. Na última etapa, o caldo fermentado é destilado para recuperação do etanol e após este processo, a vinhaça é removida na parte inferior das colunas de destilação à uma temperatura aproximada de 90°C (Sydney et al., 2021).

A vinhaça de cana-de-açúcar apresenta composição química variável, dependente dos métodos de fermentação e destilação empregados nas usinas para o processamento da matéria-prima (Tabela 1.1). Possui alto potencial poluidor, sendo corrosiva e ácida, com elevados valores de DQO. Com coloração marrom escura, apresenta elevada turbidez, justificada pela presença de compostos fenólicos, como taninos e ácidos húmicos advindos da degradação incompleta de material lignocelulósico, melanoidinas oriundas da reação de Maillard, podendo até mesmo apresentar concentrações de antibióticos, utilizados no controle da contaminação bacteriana na etapa de fermentação alcoólica (España-Gamboa et al., 2011;; Christofletti et al., 2013; Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

Tabela 1.1 – Composição química da vinhaça de cana-de-açúcar *in natura*

Parâmetro	Valor
pH	3,9
Demanda química de oxigênio (DQO)	13380
Demanda biológica de oxigênio (DBO)	5046
Potássio	2056
Sódio	50,2
Sulfato	710
Cálcio	719
Magnésio	237
Fósforo total (PT)	190

Todos os valores, exceto pH foram expressos em mg.L⁻¹.

Fonte: Adaptado de Christofolletti et al. (2013).

A preocupação em relação às águas residuárias agroindustriais, neste caso, a vinhaça, relaciona-se à tendência de aumento da produção de etanol e a destinação dos grandes volumes gerados anualmente. No passado, grandes volumes de vinhaça eram lançados em corpos d'água, o que gerava impactos diretos aos ecossistemas aquáticos. No Brasil esta prática foi proibida a partir de 1978, pelas portarias nº 323, de 29 de novembro de 1978, e nº 158, de 03 de novembro de 1980, do extinto Ministério do Interior.

Após a proibição do despejo em corpos d'água, outra “solução” dada ao descarte da vinhaça foi seu lançamento no solo, sendo assim intensificada a fertirrigação de lavouras de cana-de-açúcar no país, sendo este o principal destino da vinhaça gerada na produção de álcool e que perdura até os dias atuais.

Do ponto de vista do setor agrícola, existem diversos benefícios agrônômicos advindos desta prática que se iniciam por uma das características mais atraentes da vinhaça, a presença de potássio, visto que a disponibilidade natural deste nutriente é relativamente baixa nos solos (Fuess, Rodrigues e Garcia, 2017). Além disso, por sua composição rica em nutrientes, a fertirrigação eleva o rendimento da cultura de cana-de-açúcar e do teor de matéria orgânica presente no solo. Em relação às vantagens econômicas desta prática estão a redução significativa de custos essenciais como a adubação mineral e água (Bordonal et al., 2018).

No entanto, as principais desvantagens encontradas na prática da fertirrigação estão associadas aos custos com o transporte da vinhaça devido a

extensão das propriedades, desde a usina até a lavoura, por isso são calculados o raio máximo de fornecimento de potássio na propriedade rural que seja economicamente viável quando comparado ao fornecimento pelo adubo mineral (Fuess, Rodrigues e Garcia, 2017). Outra limitação se relaciona ao aspecto poluidor da vinhaça, quando armazenada ou aplicada no solo de forma incorreta, ou pela ocorrência de vazamentos, o que pode acarretar sérios problemas ambientais. Os principais impactos ambientais decorrentes da aplicação da fertirrigação com vinhaça estão descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Principais impactos ambientais decorrentes da aplicação da fertirrigação com vinhaça

Impactos ambientais	Referências
<ul style="list-style-type: none"> • Contaminação de corpos d'água superficiais e subterrâneos • Processos erosivos • Liberação de maus odores devido à redução de sulfatos em sulfetos por grupos microbianos específicos no solo • Proliferação de insetos (vetores) • Anaerobiose radicular pela biodegradação descontrolada da matéria orgânica da vinhaça no ambiente 	Fuess, Rodrigues e Garcia (2017)
<ul style="list-style-type: none"> • Alteração na dinâmica do carbono e do nitrogênio no solo, com geração de gases de efeito estufa como CO₂ e N₂O 	Galvez et al. (2012), Carmo et al., (2013)
<ul style="list-style-type: none"> • Salinização do solo 	Silva et al. (2007)
<ul style="list-style-type: none"> • Alterações na relação entre cátions e ânions no solo, facilitando a sobrevivência de microrganismos com reprodução mais lenta 	Silva et al. (2007); Bebé et al. (2009) e Chen et al. (2012).
<ul style="list-style-type: none"> • Contaminação dos lençóis freáticos devido à percolação da vinhaça e, conseqüentemente, das águas superficiais por escoamento, principalmente pela elevada concentração de DQO característica da vinhaça. 	Silva et al. (2007) e Cruz et al. (2008)

Fonte: autoria própria.

De acordo com Moraes et al. (2014), os impactos ambientais da fertirrigação não se limitam apenas ao solo. A ausência de manejo adequado pode acarretar em danos ao ar e às águas superficiais e subterrâneas. Em relação ao ar, a fertirrigação

com vinhaça altera a dinâmica do carbono e do nitrogênio no solo, contribuindo para a geração de gases de efeito estufa como o CO₂ e o N₂O (Galvez et al., 2012; Carmo et al., 2013; Candido, 2019). O uso excessivo da vinhaça pode levar à salinização do solo, alterações na relação entre cátions e ânions no solo, contribuindo para a sobrevivência de microrganismos com reprodução mais lenta (Silva et al., 2007; Bebé et al., 2009; Chen et al., 2012). Outros importantes impactos ambientais se relacionam à contaminação dos lençóis freáticos, devido à percolação da vinhaça e, conseqüentemente, das águas superficiais por escoamento, principalmente pela elevada concentração de matéria orgânica característica da vinhaça (Silva et al., 2007; Cruz et al., 2008).

A regulamentação brasileira referente ao uso da vinhaça para a fertirrigação das lavouras de cana-de-açúcar ainda é escassa. No estado de São Paulo, estado que concentra aproximadamente 50% das usinas sucroalcooleiras brasileiras, foi criada a normativa técnica P4.231, que determina os critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça nos campos de cana-de-açúcar (CETESB, 2006). Esta normativa limita o quantitativo de vinhaça que pode ser aplicado no solo a partir da concentração de potássio presente na vinhaça. Outras exigências como elaboração do plano anual de aplicação de vinhaça no solo e monitoramento dos lençóis freáticos foram incluídas nesta normativa, que prevê suspensão da atividade de fertirrigação após comprovação de contaminação de águas subterrâneas (CETESB, 2006).

Mesmo a fertirrigação sendo a prática mais tradicional vigente no país, esta costuma ser uma atividade que dá uma falsa impressão de resolver o problema do descarte da vinhaça. Existem inúmeras ressalvas quanto à manutenção dessa prática, obrigando as indústrias sucroalcooleiras a buscarem aplicações alternativas para o resíduo ou mesmo maneiras de tratá-lo. Assim, o manejo da vinhaça continua a ser um desafio para as usinas de etanol no Brasil (Reis e Hu, 2018; Candido, 2019).

No Brasil, desde 2010, a digestão anaeróbia (DA) é uma tecnologia que ganhou destaque, sendo considerada essencial para reduzir o potencial poluente da vinhaça e a principal aplicação para preceder o uso da vinhaça na fertirrigação (Sydney et al., 2021). Apesar de sua recalcitrância, a viabilidade técnica da produção

de biogás a partir da vinhaça é comprovada em vários trabalhos na literatura (Moraes et al., 2014; Longati et al., 2019).

Na digestão anaeróbia ocorre a biodegradação anaeróbia da matéria orgânica, realizada por diferentes microrganismos (grupos de bactérias: acidogênicas, acetogênicas, sulfato-redutoras e arqueias metanogênicas) que utilizam dos recursos disponíveis na vinhaça e geram como principais produtos gasosos o metano e hidrogênio (Sydney et al., 2021).

A vinhaça biodigerida apresenta características físico-químicas diferentes quando comparada à vinhaça *in natura*, devido à ação dos diferentes microrganismos que realizaram o processo de digestão anaeróbia. Observam-se reduções na turbidez, na concentração de matéria orgânica e elevação do pH como as principais diferenças entre a vinhaça *in natura* e a biodigerida.

A vinhaça apresenta uma disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos que permite o seu amplo uso na fertirrigação. Por estas características, uma nova tendência é o uso dessa água residuária, tanto *in natura* quanto biodigerida, como um meio de cultura viável para microalgas (Christofolletti et al., 2013; Reis e Hu, 2017; Candido, 2019).

Atualmente as microalgas vêm sendo amplamente investigadas em diferentes áreas de pesquisa, tornando-se um recurso biológico atrativo por apresentarem taxas de crescimento superiores às plantas terrestres e não competirem com culturas alimentares e terras agrícolas para o desenvolvimento de biocombustíveis e de bioprodutos (Dickinson et al., 2017).

As microalgas são microrganismos fotossintéticos eficientes na transformação de energia solar, dióxido de carbono (CO₂) e elementos inorgânicos em biomassa rica em nutrientes. Estas formam um grupo polifilético que demanda nutrientes minerais para seu crescimento e possuem capacidade de realizar fotossíntese. A diversidade bioquímica das microalgas, aliada aos diferentes modos de cultivo, são a base para explicar seu potencial biotecnológico e diferentes aplicações industriais (Metting Jr., 1996). A biomassa microalgal pode acumular bioprodutos de alto valor agregado como ácidos orgânicos, carotenoides, ficobilinas, vitaminas, esteroides, ácidos graxos poli-insaturados e outras substâncias bioativas com atividade antioxidante para o ser humano (Borowitzika, 2013; Silva et al., 2021).

As algas são encontradas em diferentes habitats como em águas doces, salobras, salinas e mesmo em águas residuárias. Muitos destes microrganismos crescem fotoautotroficamente na presença de luz solar, gás carbônico (CO₂) e nutrientes, principalmente carbono, nitrogênio e fósforo, que são facilmente encontrados nas águas residuárias. Se destacam pela capacidade de serem cultivadas sob diferentes rotas metabólicas que se diferenciam pelo uso de fontes de carbono orgânico e pela presença ou ausência de luz (Tabela 1.3).

Tabela 1.3- Rotas metabólicas das microalgas em relação à fonte de energia e carbono

Metabolismo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fotoautotrófico	Luz	Inorgânica
Heterotrófico	Compostos orgânicos	Orgânica
Mixotrófico	Luz e compostos orgânicos	Inorgânica e orgânica
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânica

Fonte: (Andrade e Colozzi Filho, 2014).

Diversos fatores interferem na produção de biomassa de microalgas, como, tipo de cultivo, tipo de substrato, qualidade e quantidade de nutrientes fornecidos no substrato, pH, intensidade luminosa, salinidade, temperatura, concentração de CO₂, concentração de oxigênio dissolvido e tipo do reator de cultivo, entre tantos outros fatores. Dentro deste contexto, os parâmetros operacionais para o cultivo de microalgas são importantes aspectos a serem pesquisados e estudados, visto que estes influenciam diretamente na produção de bioprodutos e na eficiência do tratamento da água residuária (Andrade e Colozzi Filho, 2014).

O cultivo de microalgas em vinhaça apresenta vantagens principalmente por diminuir os custos com insumos e água, não necessitando do uso de qualquer produto químico que seja prejudicial ao meio ambiente ou de alto custo. Além disso, a assimilação de nutrientes como ortofosfatos e nitrogênio inorgânico representam uma excelente opção para o processamento da vinhaça. Por estes fatos, o uso de microalgas para a eliminação de poluentes e sua transformação em biomassa é

considerada uma das tecnologias mais promissoras para recuperação de diferentes águas residuárias, inclusive a vinhaça (Ayala e Bravo, 1984; Costa, Medri e Perdomo, 2000; Olguín, 2003; Jimenez-Perez et al., 2004; Salgueiro et al., 2016; Quintero-Dallos et al., 2019).

Pesquisas relacionadas tanto ao pré-tratamento dado à vinhaça quanto aos diferentes tipos de vinhaça (*in natura* e biodigerida) são importantes para a evolução do conhecimento na área. O pré-tratamento visa aplicar métodos físico-químicos que auxiliem na eliminação da carga orgânica, clarificação e redução de poluentes químicos. Dentre os principais métodos encontrados na literatura estão esterilização por autoclavagem ou filtração, adsorção, métodos de coagulação eletroquímica, separação por membrana, extração por solvente, entre outros (Santos, 2013; Santana et al., 2017; Saavedra, 2019).

No entanto, essas tecnologias apresentam desvantagens inerentes, devido ao seu alto custo e à tendência de gerar poluentes secundários (Singh e Patel, 2012). Outros fatores que impactam o desenvolvimento de pesquisas nessa área se relacionam a dificuldade de comparar resultados devido às diferentes metodologias aplicadas em cada pesquisa, além dos diferentes grupos de microalgas e as distintas condições físico-químicas aplicadas.

Candido (2019) aplicou diferentes pré-tratamentos como adsorção, filtração e centrifugação e inovou ao comparar diferentes tipos de vinhaça (*in natura* e biodigerida) no cultivo da microalga clorofícea *Chlorella vulgaris*. Os resultados indicaram a centrifugação como o melhor método de pré-tratamento, com obtenção de altas taxas de crescimento na vinhaça filtrada *in natura* (60% v/v) e na vinhaça biodigerida (80% v/v). Pré-tratamentos alternativos têm sido investigados, como o proposto por Leite e Daniel (2020), que testaram diferentes valores de pH em condições básicas, com melhores resultados obtidos em altos valores de pH (pH = 13) devido à formação de grânulos a partir da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada na vinhaça. Tanto Candido (2019) e Leite e Daniel (2020) apresentaram processos físico-químicos econômicos e simplificados.

As primeiras culturas de microalgas em vinhaça datam da década de 1980 (Oliveira, 1988) e até o momento existem muitas lacunas para seu uso, incluindo pesquisas que buscam tratamentos mais viáveis para o resíduo e cepas de microalgas mais tolerantes e produtivas, que melhoram as condições de sua extração (Candido,

2019). Outros aspectos apontados por Candido (2019) estão relacionados à necessidade de mais estudos que investiguem a fisiologia dos organismos nos resíduos e que discutam a contaminação biológica presente nos cultivos e na biomassa produzida.

A produção de microalgas ainda é considerada cara e exige altos volumes de água e energia (Pires et al. 2013; Candido e Lombardi, 2017). Segundo Yang et al. (2011) e Xin et al. (2016), a utilização de águas residuárias para o crescimento de microalgas pode reduzir a demanda de água doce em 90%, além de reduzir o custo com nutrientes. Visando esta economia, o processo conhecido por ficorremediação vêm sendo empregado, em diferentes percentuais de diluição. Este processo fornece quantidades suficientes de nutrientes e constituintes orgânicos e inorgânicos que estimulam o crescimento de biomassa de microalgas e a produção de bioprodutos úteis e sustentáveis (Ansari et al., 2017).

Os aspectos ambientais vantajosos incluem a redução de impactos adversos ao meio ambiente como eutrofização, esgotamento de oxigênio e minimização de danos aos corpos d'água receptores. Além, disso, pela capacidade de microalgas em gerar quantidades consideráveis de oxigênio, este pode ser utilizado por outros microrganismos para a decomposição aeróbia de material orgânico (Delgadillo-Mirquez et al., 2016). Existem diversos trabalhos utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar tanto *in natura* quanto biodigerida para o cultivo de microalgas (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 – Cultivo de microalgas e taxas de crescimento específicas em vinhaça *in natura* e biodigerida encontradas na literatura

Microalga	Características do tratamento com vinhaça	Taxas de crescimento (μ , dia ⁻¹)	Referências
<i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Desmodesmus spinosus</i> e <i>Monoraphidium</i> sp.	Vinhaça centrifugada não autoclavada	0,8 d ⁻¹	Candido (2019)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vinhaça <i>in natura</i> tratada a 80% com pH=3	1,2 dia ⁻¹	Bonini (2016)
	Vinhaça orgânica a 50% com pH=3	1,0 dia ⁻¹	
	em vinhaça adsorvida por argila esmectita e carvão ativado / 60% de diluição ou vinhaça centrifugada a 20%	1,2 dia ⁻¹	Candido e Lombardi (2017)
	20% de vinhaça centrifugada	1,5 dia ⁻¹	Candido e Lombardi (2020)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	15% de vinhaça centrifugada	2,0 dia ⁻¹	Candido e Lombardi (2020)
<i>Desmodesmus spinosus</i>	20% de vinhaça centrifugada	1,0 dia ⁻¹	Candido e Lombardi (2020)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Vinhaça autoclavada sob condições heterotróficas	1,08 dia ⁻¹	Silva et al. (2017)

No entanto, devido às características como alta salinidade, toxicidade e baixo pH da vinhaça, estes estudos incluem poucas espécies e diferentes manipulações do resíduo. Os diferentes tipos de pré-tratamento do resíduo dificultam a comparação entre os resultados e impactam na escolha de condições mais produtivas do ponto de vista biotecnológico (Candido, 2019).

De modo geral, os resultados encontrados na literatura referentes aos efeitos tóxicos ou benéficos da vinhaça no crescimento microalgal são geralmente expressos por meio da biomassa, densidade celular ou teor de clorofila *a* (Algur e Kadioglu, 1992; Oliveira, 1988; Mitra et al., 2012; Candido e Lombardi, 2017; Gollo et al., 2016; Ramirez et al., 2014). Observa-se que poucos trabalhos fazem referência a viabilidade celular ao final dos tratamentos, importante parâmetro a ser avaliado (Candido, 2019).

De acordo com Elisabeth, Rayen e Behnam (2021), culturas de microalgas continua sendo um processo biotecnológico de alto potencial, cuja aplicação ainda é retardada por uma série de desafios técnicos, dentre elas está a falta de tecnologias que permitam o controle de qualidade adequado. Segundo os mesmos autores, culturas de microalgas com 100% de viabilidade são improváveis de existir devido ao efeito de diferentes tensões e fatores durante o crescimento. De fato, muitas culturas

são submetidas a condições de estresse para a produção de moléculas específicas, o que pode acarretar estresse celular, com alterações em sua morfologia.

Para a obtenção de sucesso no cultivo em larga escala deve-se prever o uso de técnicas que permitam avaliar a sua qualidade, de preferência que estas sejam realizadas de forma rápida, precisa e econômica. Dois fatores importantes são a viabilidade celular e vitalidade celular e existem diferentes metodologias para a avaliação destes parâmetros (Elisabeth, Rayen e Behnam, 2021)

Um dos critérios aceitos na análise de viabilidade celular é a preservação da integridade da membrana celular. Alterações na membrana podem ser detectadas por testes de permeabilidade de membranas que incluem métodos de exclusão com uso de corantes, como, por exemplo, o corante azul de tripano (Trypan Blue) (Razack et al., 2015; Elisabeth, Rayen e Behnam, 2021).

Considerando que o tratamento biológico da vinhaça utilizando microalgas pode ser uma solução potencial, este trabalho buscou expandir o conhecimento tecnológico das condições que aperfeiçoem o processo de produção de biomassa algal em vinhaça *in natura* e biodigerida, avaliando a biomassa gerada (bioprodutos), a capacidade de remoção de nutrientes e a viabilidade celular das células microalgais ao final do tratamento biológico realizado pelas microalgas clorofíceas *Chlorella vulgaris* (Cvg), *Chlorella sorokiniana* (Csk) e *Desmodesmus* sp.(Dsp.).

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* E *Desmodesmus sp.*, CULTIVADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SINTÉTICOS

2.1 Introdução

Os meios de cultura sintéticos para o cultivo de microalgas são insumos normalmente preparados em laboratórios que visam fornecer nutrientes adequados ao crescimento e desenvolvimento destes microrganismos fora do seu habitat natural.

Ao longo das décadas foi desenvolvida uma variedade destes meios de cultura, manipulados de acordo com o propósito da aplicação biotecnológica, além das especificidades nutricionais de cada alga e das condições físico-químicas de cultivo.

Um dos principais desafios dos cultivos de microalgas em larga escala está associado aos custos de produção dos meios de cultura sintéticos, sendo estimado que aproximadamente 35% dos custos estão relacionados a elaboração desses meios (Baumgartner et al., 2013). O alto custo dos reagentes químicos, indispensáveis a elaboração do meio de cultura, é considerado um dos maiores problemas do cultivo de microalgas, podendo até mesmo inviabilizar a produção de biomassa microalgal (Sipaúba-Tavares 1995). Outro fator que impacta a produção de microalgas em meios sintéticos é a necessidade de grandes volumes de água, ocupando de 10 a 20% do custo global de produção de biomassa microalgal (Subhadra, 2011; Sander e Murthy, 2010).

Para isso, alternativas como a substituição por macronutrientes de menor custo, seja pelo uso de fertilizantes ou pelo uso de águas residuárias domésticas, agrícolas e industriais, vêm se tornando uma realidade. É reconhecida a utilização de águas residuárias para a produção de microalgas, pois gera benefícios econômicos, por se tratar de um substrato de baixo valor e ao mesmo tempo proporciona benefícios ambientais por reduzir a carga orgânica presente na água residuária (NAABB, 2014).

No entanto, deve-se reavaliar os custos do processo de produção da biomassa algal pelo uso de águas residuárias quando estas necessitem passar por

processos de diluição ou pela necessidade de enriquecimento do efluente com nutrientes (Gupta, Pawar e Pandey, 2019). Desse modo, o meio de cultivo é desenvolvido para se adaptar às necessidades nutricionais das algas a serem cultivadas e às condições econômicas do momento (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001).

Mesmo com o surgimento de novas alternativas, o uso do meio sintético ainda se faz necessário e seu uso é consolidado nas práticas laboratoriais, sendo indispensável à manutenção das microalgas em bancos de culturas, principalmente quando se faz necessária a preservação axênica das amostras. A depender do grau de pureza exigido para as amostras de biomassa em determinadas aplicações biotecnológicas, o uso de meios de cultura sintéticos quimicamente definidos também se torna indispensável.

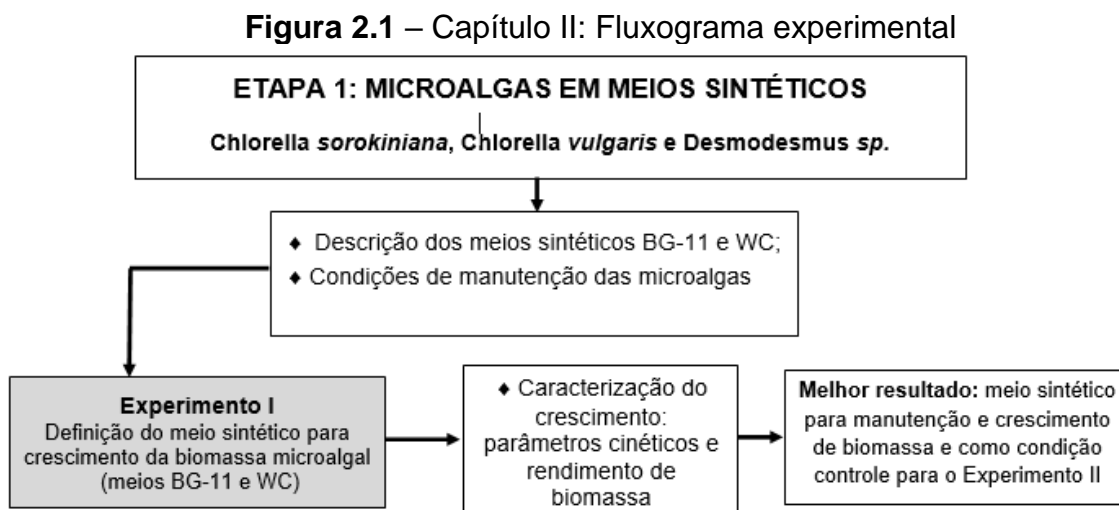
Esse capítulo se dedicou a avaliar a produção de biomassa algal de três algas clorofíceas, sendo elas *Chlorella sorokiniana* (Csk), *Chlorella vulgaris* (Cvg) e *Desmodesmus sp.* (Dsp), cultivadas sob condições axênicas, em dois meios sintéticos, BG-11 (Rippka, 1979) e Water Culture (WC) (Guillard e Lorenzen, 1972). Além disso, estabeleceu-se qual dos dois meios sintéticos testados seria mais benéfico ao aumento da biomassa para ser aplicado na manutenção axênica no banco de cultura de algas do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE-USP) e como cultivo referência (controle) aplicado nos experimentos do Capítulo III.

2.2 Objetivos

O objetivo principal do presente capítulo foi definir qual dos dois meios de cultura sintéticos (BG-11 e WC) proporcionaria melhores condições para o crescimento microalgal e produção de biomassa para as cepas *Chlorella vulgaris* (Cvg), *Chlorella sorokiniana* (Csk) e *Desmodesmus sp.* (Dsp), sob condições axênicas de cultivo.

2.3 Materiais e métodos

As etapas relacionadas a este capítulo foram resumidas no fluxograma exibido na Figura 2.1.



Fonte: Autoria própria.

Foi realizada uma etapa de preparação prévia ao Experimento I que consistiu na descrição da obtenção das cepas em estudo (seção 2.3.1), descrição dos meios sintéticos (seção 2.3.2) e condições de manutenção das microalgas aplicado por todo o período experimental (seção 2.3.3). O Experimento I (seção 2.3.4) consistiu na avaliação do crescimento e produção de biomassa de microalgas clorofíceas em dois diferentes meios sintéticos em escala laboratorial. As três cepas de microalgas clorofíceas utilizadas no estudo foram: *Chlorella sorokiniana* (Csk), *Chlorella vulgaris* (Cvg) e *Desmodesmus sp.* (Dsp). O resultado obtido ao final deste capítulo foi aplicado como condição referência nos experimentos do Capítulo III.

2.3.1 Obtenção das cepas

As cepas utilizadas são clorofíceas ***Chlorella vulgaris* (Cvg)**, ***Chlorella sorokiniana* (Csk)** e ***Desmodesmus sp.* (Dsp)**, doadas pela Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce, Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). As cepas do gênero *Chlorella* foram escolhidas após análise da literatura, por sua robustez e adaptabilidade a diversas águas residuárias (Hossain e Mahila, 2019). A outra cepa escolhida, do gênero *Desmodesmus*, foi incluída por sua

relevância na produção de lipídios e por sua capacidade de atuação em ambientes eutrofizados (Rossi, 2013).

2.3.2 Meios de cultura sintéticos

Quando doadas, as cepas axênicas estavam aclimatadas em meio Blue Green Medium (BG-11) (Rippka, 1979). Desde o momento do recebimento das três cepas até o encerramento desta pesquisa optou-se pela aclimação tanto em BG-11 quanto em meio sintético Water Culture - WC (Guillard e Lorenzen, 1972), tradicionalmente utilizado para microalgas clorofíceas no Laboratório BIOTACE.

Os meios BG-11 e WC foram preparados, conforme metodologia para BG-11 (Rippka, 1979) e para WC (Guillard e Lorenzen, 1972) e seguindo as composições descritas nas Tabelas 2.1 e 2.2, em alíquotas de 18 mL para cada tubo de cultura com tampa rosqueável de 50 mL. Na sequência estes meios foram autoclavados (121°C) e posteriormente foram mantidos em geladeira. Para preservar as condições axênicas utilizou-se a capela de fluxo laminar para a transferência de biomassa algal para os tubos de cultura, tanto para a manutenção das culturas quanto para as demais etapas experimentais deste trabalho.

Tabela 2.1 – Composição e concentração final do meio de cultura sintético BG-11 (Rippka, 1979)

Componente	Concentração Final (μM)
NaNO ₃	17600
K ₂ HPO ₄	230
MgSO ₄ ·7H ₂ O	30
CaCl ₂ ·2H ₂ O	240
Ácido Cítrico·H ₂ O	31
Citrato Amônio Férrico	21
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	2,7
Na ₂ CO ₃	190
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	46
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,77
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,36
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,17

Tabela 2.2 - Composição e concentração final do meio de cultura sintético WC (Guillard e Lorenzen, 1972)

Componente	Concentração Final (μM)
NaNO ₃	1000
CaCl ₂ .2H ₂ O	250
MgSO ₄ .7H ₂ O	150
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	100
NaHCO ₃	150
K ₂ HPO ₄	50
<i>Micronutrientes</i>	
FeCl ₃ .6H ₂ O	11,7
H ₃ BO ₃	16,2
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,91
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,07
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,04
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,02

2.3.3 Condições de manutenção das microalgas

As culturas foram mantidas em tubos de cultura de vidro de 50 mL com tampa rosqueável, com volume total de 20 mL, sendo 18 mL de meio de cultura sintético, previamente autoclavado à 121°C e na proporção de 10% de inóculo de microalga (2 mL). Os inóculos foram repicados em intervalos de dois meses, preservando-se as culturas em condições de assepsia e acondicionadas em sala de cultivo climatizada (BIOTACE-USP), sendo aplicados os aspectos físico-químicos de acordo com a metodologia proposta por Vargas (2016), exibida na Tabela 2.3. Esta manutenção foi realizada durante todo o período da pesquisa para prevenir perdas das cepas, sendo armazenadas no Banco de Microalgas, Cianobactérias e Macrófitas do Laboratório BIOTACE (EESC-USP).

Tabela 2.3 - Condições de manutenção e aspectos físico-químicos aplicados no cultivo das cepas *Chlorella vulgaris* (Cvg), *Chlorella sorokiniana* (Csk) e *Desmodesmus sp.* (Dsp)

Condições	Parâmetros	Concentrações (un.)	Referências	
Meio cultura	de	BG-11	Rippka (1979); Guillard e Lorenzen (1972)	
		WC		
		pH em meio BG-11		7,4
		pH em meio WC		7,6
Aspectos físico-químicos		Temperatura	24°C ± 1°C	Vargas (2016)
		Fotoperíodo	12:12 horas	
		Intensidade luminosa (lâmpadas fluorescentes (OSRAM))	60 µmol.fótons.m ⁻² .s ⁻¹	
			20W	

2.3.4 Caracterização do crescimento microalgal: curvas e parâmetros cinéticos de crescimento

Para o Experimento I deste capítulo foram realizados cultivos em batelada (culturas batch), nos quais tanto os inóculos (10% proporção) quanto os recursos nutricionais foram fornecidos no início de cada experimento, sendo acompanhado o crescimento e produção de biomassa das algas de interesse ao longo do tempo.

O crescimento da biomassa algal foi avaliado a partir de curvas de crescimento e parâmetros cinéticos de crescimento: taxa de crescimento, velocidade específica de crescimento, tempo de geração e amplitude. A produção de biomassa foi avaliada a partir do rendimento de biomassa por absorvância em dois comprimentos de onda ($\lambda_1=683$ nm e $\lambda_2=750$ nm), análises de sólidos suspensos totais (APHA, 2005) e clorofila *a* (NUSH, 1980 modificado por NEDERLANDSE NORM, 1981).

2.3.4.1 Curvas de crescimento

A avaliação do crescimento microalgal foi necessária ao entendimento das fases de crescimento (lag, exponencial, estacionária e senescência), e o principal objetivo foi a obtenção da metade da fase exponencial para cada cepa de microalga testada, pois esta indicou o momento fisiológico ideal à realização dos repiques dos inóculos de microalga.

Para a realização das curvas de crescimento foram preparados tubos de cultura de 50 mL com tampa rosqueável contendo 18 mL do meio de cultura (meio sintético ou água residuária) e 2 mL de inóculo (microalga). Os tubos de cultura, em triplicata, receberam os inóculos no primeiro dia (Dia 0) e diariamente foram realizadas leituras da absorbância ($\lambda = 683$ nm) em espectrofotômetro DR4000 (HACH) com adaptador para realização da leitura da densidade óptica diretamente no tubo de cultura. Este acompanhamento era encerrado quando a condição testada alcançava a fase estacionária de crescimento.

A partir destes dados foi possível elaborar os gráficos de absorbância ($\lambda = 683$ nm) pelo tempo de duração do experimento. Utilizou-se a absorbância no comprimento de onda 683 nm por ser o comprimento de onda relacionado ao pico de absorção da clorofila *a* para clorofíceas (Santos, 2013). Além disso, também foi utilizado o comprimento de onda 750 nm aplicado para acompanhar o crescimento da biomassa microalgal evitando a influência da concentração de pigmentos fotossintetizantes (Griffiths et al., 2011).

2.3.4.2 Parâmetros de crescimento

2.3.4.2.1 Taxa de crescimento

A taxa de crescimento (μ) é um parâmetro universal, considerado um dos mais importantes para o monitoramento da fisiologia das algas. O sistema em batelada (descontínuo) possui uma fase exponencial curta de crescimento, sendo possível calcular a taxa de crescimento a partir do gráfico logarítmico natural obtidos nas leituras de absorbância ($\lambda_1 = 683$ nm) pelo tempo. Realizando a regressão linear da

fase exponencial do gráfico obtém-se a equação da reta ($y=ax+b$), cujo o coeficiente angular é considerado equivalente à taxa de crescimento (μ), em (dia^{-1}), mesma unidade de tempo do eixo longitudinal (eixo x) da curva de crescimento linearizada.

Portanto, a taxa de crescimento microalgal correspondeu à avaliação dos dados logarítmicos (LN) obtidos nas leituras de absorvância ($\lambda_1=683 \text{ nm}$) em espectrofotômetro DR4000 (HACH), sendo possível verificar o intervalo correspondente à fase exponencial de crescimento, com geração da equação da reta ($y=ax+b$), na qual o coeficiente a, correspondeu à taxa de crescimento por dia ($\mu; \text{d}^{-1}$).

2.3.4.2.2 Velocidades específicas de crescimento, tempo de geração e amplitude

Os parâmetros velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (T_g) e amplitude (A), foram calculados a partir das curvas de crescimento (seção 2.3.4.1) e analisados de acordo com a modelagem de Gompertz (Zwietering et al., 1990), no software Origin Pro 8.

Para esta modelagem, os dados relativos ao crescimento das culturas, em absorvância ($\lambda= 683\text{nm}$), foram normalizados para a escala logarítmica, utilizando a equação $y = \ln (X/X_0)$, sendo X o resultado da absorvância ($\lambda= 683\text{nm}$) determinado no dia de interesse e X_0 o resultado da absorvância ($\lambda= 683\text{nm}$) determinado no dia zero do ensaio. Realizada a normalização dos dados, foram confeccionados gráficos, plotados em função do tempo, e ajustados ao modelo de Gompertz (Zwietering et al., 1990), conforme Equação 1, a seguir:

$$Y = a e^{-e^{-K(x-x_c)}} \quad (1)$$

Para os cálculos da velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (T_g) e amplitude (A), foram utilizados os parâmetros (a, x_c e K), obtidos na modelagem de Gompertz e foram apresentados nas equações (2), (3) e (4), respectivamente.

$$\text{Velocidades específicas máxima de crescimento } (\mu_{\text{máx}}): \mu_{\text{máx}} = a.K/e. \quad (2)$$

$$\text{Tempo de geração: } T_g = \ln 2 / \mu_{\text{máx.}} \quad (3)$$

Amplitude: utilizado na comparação das curvas, refere-se ao maior valor de crescimento final, obtido pela equação $y = \ln (X/X_0)$ (4)

2.3.4.2.3 Rendimento de biomassa por absorvância

Para avaliação da maior produção de biomassa, foi calculado o rendimento de biomassa (R_{abs}) a partir dos dados de absorvância, em dois comprimentos de onda separadamente ($\lambda_1 = 683\text{nm}$ e $\lambda_2 = 750\text{nm}$), pela diferença entre o valor final (R_{final}) e o valor inicial (R_{inicial}) (Equação 5). Desta forma, o maior rendimento observado foi relacionado à maior produção de biomassa.

$$\text{Rendimento de biomassa } (R_{\text{abs}}) = R_{\text{final}} - R_{\text{inicial}} \quad (5)$$

2.3.5 Análise estatística

O tratamento estatístico foi aplicado em todos os parâmetros de crescimento e produção de biomassa obtidos nas diferentes etapas desta pesquisa. O software BioEstat 5.3 foi utilizado em todas as aplicações estatísticas realizadas. Para verificação da normalidade dos dados, aplicou-se o teste Kolmogorov-Smirnov. E, na ausência de normalidade, os dados foram avaliados pelo teste não paramétrico Kruskal-Walis seguido do método de Dunn.

Após a avaliação da existência de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, os resultados foram comparados aplicando-se ANOVA seguida do teste t (LSD), sendo para todos os testes estatísticos considerado $p < 0,05$ que indicou a existência de diferenças significativas entre os parâmetros analisados.

2.3.6 Experimento I: Definição do meio sintético para o crescimento da biomassa de microalgas clorofíceas

Neste experimento as três algas utilizadas foram *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus sp.* e os meios sintéticos BG-11 e WC, e perfazem

um total de seis condições, realizadas em triplicatas biológicas. Na Tabela 2.4 foram descritas as condições e aspectos físico-químicos referentes ao Experimento I.

Tabela 2.4 – Condições de cultivo e aspectos físico-químicos

Condições	Microalgas	<i>Chlorella sorokiniana</i> (Csk) <i>Chlorella vulgaris</i> (Cvg) <i>Desmodesmus sp.</i> (Dsp)
	Meio de cultura	BG-11 (Rippka, 1979) WC (Guillard e Lorenzen, 1972)
Metabolismo	fotoautotrófico	
Fotoperíodo	12 horas	
Aspectos físico-químicos	Temperatura	24 ± 1 °C
	Intensidade luminosa	130 μmol.fótons.m ⁻² .s ⁻¹
	pH	7,4 (BG-11) 7,6 (WC)

Em um primeiro repique (R₁) foram preparados, para as 6 condições avaliadas, em triplicata biológica, tubos de 50 mL com tampa rosqueável, com volume total individual de 18 mL de meio sintético autoclavado. No momento deste repique foram transferidos 2mL de microalgas, das culturas que se encontravam mantidas em sala de cultivo climatizada (BIOTACE-USP) para estes tubos, na proporção de 10% de inóculo, completando o volume final de 20 mL (meio sintético e microalga). Estes tubos foram mantidos em incubadora (Nova Ética B.O.D 411D), adaptada com iluminação à LED (Light Emitting Diode), por um período de 36 horas.

Após este período realizou-se um segundo repique (R₂) com a transferência de 10mL dos tubos para frascos Duran de 250 mL de capacidade, em triplicata, com volume final de 100 mL. Os frascos Duran foram mantidos em incubadora, pelo mesmo intervalo de tempo (36 h), para o aumento do volume das culturas de microalgas nos meios BG-11 e WC.

Com a finalidade de homogeneizar as condições iniciais do inóculo para o dia inicial (D_0), definiu-se como padrão inicial para todas as cepas o valor de densidade óptica inicial $D.O._{750nm} = 0,1$ (Andrade, 2014), com uso de espectrofotômetro DR4000 (HACH) equipado com luz ultravioleta (UV). Essa intervenção substituiu a realização da contagem inicial das amostras. Desse modo, ao final das 36 horas, os inóculos estavam prontos para serem transferidos ao dia inicial do experimento, sendo este período considerado fisiologicamente ideal, por se tratar da metade da fase exponencial média para as três cepas, informação obtida em ensaios prévios.

No dia inicial (D_0) do experimento, 2 mL de microalgas dos frascos Duran (R_2) foram transferidos para novos tubos de cultura de vidro (50 mL), com 18 mL de meio sintético autoclavado, em triplicata biológica. Estes tubos foram mantidos em incubadora, nas condições apresentadas na Tabela 2.4. Os mesmos tubos do dia inicial (D_0) foram diariamente monitorados por absorvância em dois comprimentos de onda ($\lambda_1 = 683$ nm e $\lambda_2 = 750$ nm) e foi encerrado quando as culturas se encontravam nas fases estacionárias para cada condição, acompanhada individualmente.

A leitura diária nos dois comprimentos de onda citados foram os primeiros parâmetros utilizados neste experimento e os resultados obtidos serviram para a confecção das curvas de crescimento (seção 2.3.4.1) e determinação dos parâmetros de crescimento e rendimento de biomassa (seção 2.3.4.2). A partir da obtenção das curvas de crescimento de cada condição testada neste experimento foi possível determinar a metade da fase exponencial de crescimento, sendo esta informação útil para as fases subsequentes.

A análise estatística do Experimento I foi realizada conforme metodologia (seção 2.3.5) e aplicou-se análise comparativa ANOVA seguida de teste t (LSD), com $p < 0,05$. Por meio destas ferramentas metodológicas foi possível definir o meio sintético mais adequado às microalgas testadas, além de poder ser utilizado um único meio sintético como condição controle para os próximos capítulos deste trabalho.

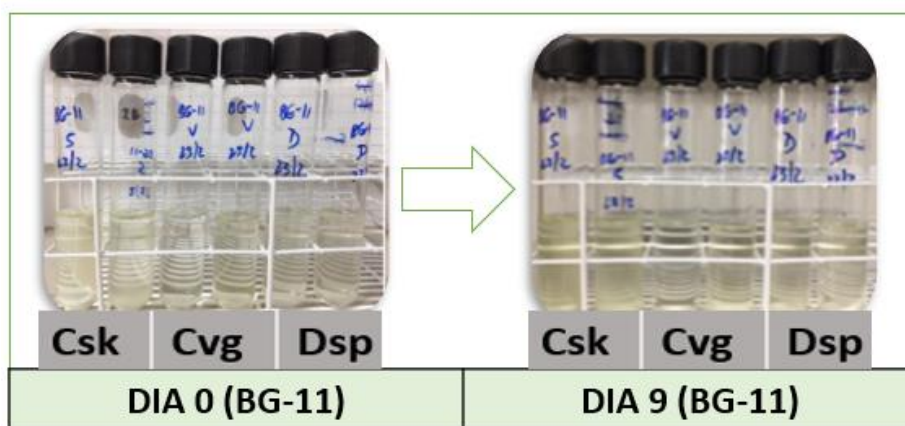
2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Análise das culturas

Nas Figuras 2.2 e 2.3 foram apresentadas imagens do Experimento I, com todas as condições testadas no dia zero (D_0) e no nono dia (D_9), em meio sintético

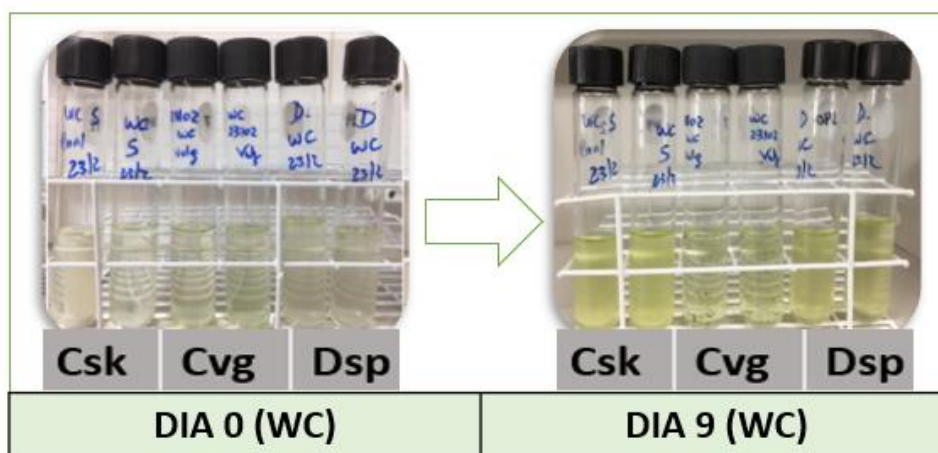
BG-11 e WC, respectivamente. Da análise visual destas imagens foi possível observar para as três cepas, na condição de cultivo em meio sintético WC que estas apresentaram uma maior coloração verde, comparado aos cultivos em meio BG-11. Este fato foi o primeiro sinalizador, ainda que inconclusivo, de que o cultivo em meio sintético WC poderia ter sido o meio sintético mais propício e que resultaria em uma maior concentração de biomassa para as microalgas testadas.

Figura 2.2 – Imagens do cultivo em meio sintético BG-11 para as cepas Csk, Cvg e Dsp nos dias inicial (D₀) e final (D₉) do experimento



Fonte: autoria própria.

Figura 2.3 - Imagens do cultivo em meio sintético WC para as cepas Csk, Cvg e Dsp nos dias inicial (D₀) e final (D₉) do experimento

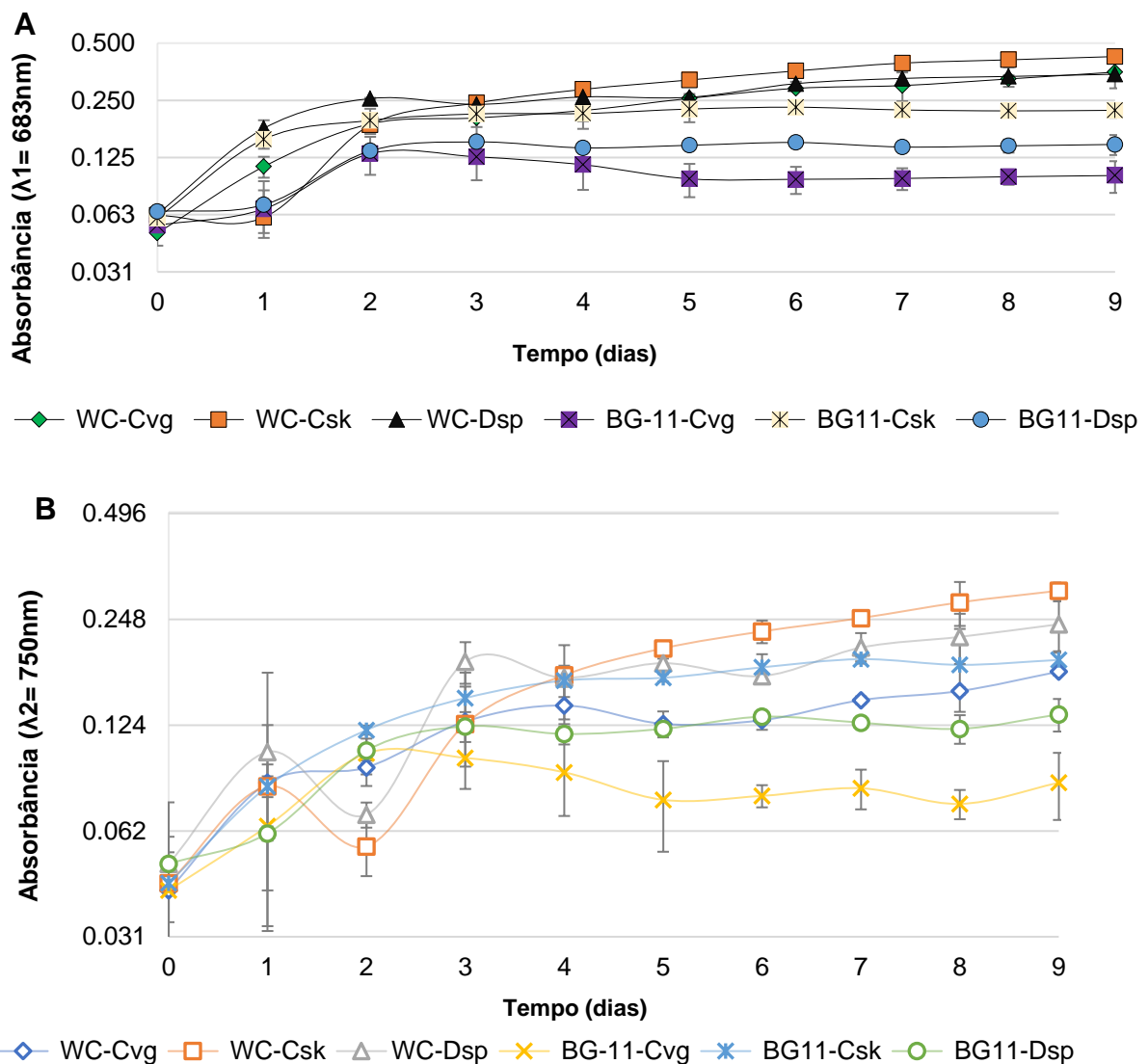


Fonte: autoria própria.

2.4.2 Curvas de crescimento e rendimento de biomassa

Para melhor entendimento das condições de crescimento testadas, foram confeccionadas curvas de crescimento por absorbância ($\lambda_1= 683 \text{ nm}$ e $\lambda_2= 750 \text{ nm}$), para os 9 dias experimentais, apresentados na Figura 2.4 - A e B.

Figura 2.4- Curvas de crescimento **A:** absorbância ($\lambda_1= 683 \text{ nm}$) por tempo (dias) para as cepas Csk, Cvg e Dsp nos meios sintéticos BG-11 e WC e **B:** absorbância ($\lambda_2= 750 \text{ nm}$) por tempo (dias) para as cepas Csk, Cvg e Dsp nos meios sintéticos BG-11 e WC



Legenda: WC-Csk: *Chlorella sorokiniana* em meio sintético WC; WC-Cvg: *Chlorella vulgaris* em meio sintético WC; WC-Dsp: *Desmodesmus sp.* em meio sintético WC.

BG-11-Csk: *Chlorella sorokiniana* em meio sintético BG-11; BG-11-Cvg: *Chlorella vulgaris* em meio sintético BG-11; BG-11-Dsp: *Desmodesmus sp.* em meio sintético BG-11. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Na análise da Figura 2.4-A pode-se verificar melhores desempenhos na seguinte ordem: Csk, Cvg e Dsp, cultivadas em meio sintético WC no comprimento de onda $\lambda_1 = 683$ nm. As três cepas obtiveram melhor desempenho em WC quando comparado ao meio BG-11, na análise das curvas de crescimento com absorvância a 683 nm. Apenas a cepa Csk, quando cultivada em BG-11, apresentou resultados de absorvância próximos aos resultados obtidos em WC.

Ao analisar as curvas de crescimento no comprimento de onda 750 nm, Figura 2.4-B, os melhores resultados encontrados foram Csk e Dsp, em meio sintético WC, além de Csk em meio BG-11.

A cepa Csk em meio sintético WC se destacou como o melhor resultado obtido para os dois comprimentos de onda testados ($\lambda_1 = 683$ nm e $\lambda_2 = 750$ nm).

Além da análise das curvas de crescimento também foram avaliados os rendimentos de biomassa por absorvância, relacionado à cada curva de crescimento nos dois comprimentos de onda $\lambda_1 = 683$ nm e $\lambda_2 = 750$ nm, apresentados na Tabela 2.5. Os valores obtidos para a metade da fase exponencial de crescimento (dia) também foram definidos pela curva de crescimento ($\lambda_1 = 683$ nm) e descritos na Tabela 2.5, sendo esta informação utilizada nas etapas subsequentes deste trabalho.

Tabela 2.5 – Valores de rendimento de biomassa por absorvância ($\lambda_1 = 683$ nm e $\lambda_2 = 750$ nm) e indicação da metade da fase exponencial (dia) para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) cultivadas nos meios sintéticos BG-11 e WC

Condição	Rendimento de biomassa ($\lambda_1 = 683$ nm)	Rendimento de biomassa ($\lambda_2 = 750$ nm)	Metade da fase exponencial de crescimento (dia)
WC-Csk	0,363 ± 0,041 ^{a,c}	0,275 ± 0,017 ^{f,h,i}	1,5
WC-Cvg	0,302 ± 0,006 ^{a,d}	0,092 ± 0,021 ^{f,g,j}	1
WC-Dsp	0,280 ± 0,079 ^{a,e}	0,136 ± 0,064 ^{g,h,k}	1
BG-11-Csk	0,101 ± 0,01 ^{b,c}	0,107 ± 0,019 ^{i,l}	0,5
BG11-Cvg	0,058 ± 0,039 ^{b,d}	0,044 ± 0,018 ^{i,l,m}	1,5
BG-11-Dsp	0,075 ± 0,016 ^e	0,083 ± 0,016 ^{k,m}	1,5

WC-Csk: *Chlorella sorokiniana* em meio sintético WC; WC-Cvg: *Chlorella vulgaris* em meio sintético WC; WC-Dsp: *Desmodesmus sp.* em meio sintético WC; BG-11-Csk: *Chlorella sorokiniana* em meio sintético BG-11; BG-11-Cvg: *Chlorella vulgaris* em meio sintético BG-11; BG-11-Dsp: *Desmodesmus sp.* em meio sintético BG-11.

Para rendimento de biomassa ($\lambda_1 = 683$ nm):

Letras iguais indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Para rendimento de biomassa ($\lambda = 750$ nm):

Letras iguais indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Foi possível observar que independente do comprimento de onda utilizado, a condição WC-Csk foi a que apresentou o maior rendimento entre todas as condições testadas, com valores de $0,363 \pm 0,041$ e $0,275 \pm 0,017$, para os comprimentos de onda $\lambda_1 = 683$ nm e $\lambda_2 = 750$ nm, respectivamente. Enquanto que para o meio BG-11 a microalga Csk obteve resultado cerca de um terço do rendimento de biomassa observado no meio WC, em ambas as condições testadas de absorvância ($0,101 \pm 0,01$ em $\lambda_1 = 683$ nm e $0,107 \pm 0,019$ em $\lambda_2 = 750$ nm).

Os resultados de rendimento de biomassa foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), seguido de análise da variância (ANOVA e teste t (LSD) ($p < 0,05$)). Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram detectadas entre as 3 cepas cultivadas em WC, sendo possível concluir que a cepa Csk obteve o melhor desempenho entre as microalgas, nas condições testadas. No meio sintético BG-11 a 683 nm, constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas entre as cepas CSk e Cvg e entre estas duas cepas, Csk obteve o melhor resultado final de rendimento de biomassa. No meio sintético BG-11 a 750 nm, foram encontradas diferenças significativas apenas entre Csk e Cvg, e entre Cvg e Dsp, o que indicou Csk em meio BG-11 como o melhor resultado encontrado.

A densidade óptica é usada como uma medida indireta conveniente da concentração de biomassa em suspensões de células microbianas (Griffthis et al., 2011). Neste estudo, os dois comprimentos de onda (λ_1 e λ_2) foram válidos para atestar o meio sintético WC como o melhor desempenho em relação a análise de rendimento da biomassa das microalgas. De acordo com Santos (2013), o comprimento de onda ($\lambda_1 = 683$ nm) está diretamente relacionado à concentração de clorofila a presente nas amostras. Portanto o monitoramento pela concentração de clorofila a pode ser um instrumento útil para a comparação de crescimento de biomassa entre diferentes gêneros de microalgas (Huy et al., 2018). No entanto, a concentração de clorofila a e outros pigmentos fotossintetizantes pode-se alterar ao longo do experimento devido às condições de crescimento submetido às microalgas e imprecisões podem ser introduzidas quando o conteúdo desses pigmentos se altera (Griffthis et al., 2011). A partir deste conhecimento, optou-se pelo acompanhamento das curvas de crescimento também no comprimento de onda $\lambda_2 = 750$ nm, por estimar a biomassa associada a condições de baixo pigmento e evitar a influência da concentração dos

pigmentos fotossintéticos. Essa estratégia foi aplicada por Griffiths et al. (2011), que comparou os erros relativos médios na estimativa de biomassa por absorvância em dois comprimentos de onda (680 nm e 750nm) em relação ao peso seco da biomassa ao longo do ciclo de crescimento, e os erros relativos encontrados foram menores a 750 nm (25%) quando comparado a 680 nm (52%).

Nas análises das curvas de crescimento e rendimento de biomassa nos dois comprimentos de onda resultaram o meio sintético WC como o meio mais adequado ao cultivo das microalgas testadas neste estudo. Na comparação entre as concentrações de nutrientes em WC e BG-11 pode-se atestar que a concentração final de magnésio presente no meio sintético WC foi 5 vezes superior que a presente em BG-11 (Tabelas 2.1 e 2.2), e isso pode ter favorecido o crescimento em WC (Figura 2.4 A e B e Tabela 2.5). O magnésio ocupa posição estratégica como elemento central da molécula de clorofila *a* e todas as espécies de microalgas possuem necessidade deste elemento (Farhat et al., 2016; Ermis et al., 2020). Embora outros trabalhos na literatura observam maiores rendimentos celulares de microalgas em meio BG-11, justificado por sua elevada concentração de nitrato (NO_3^-) isto não foi o observado nas condições aplicadas a este trabalho (Saadi, 2018; Purkayastha et al., 2017; Colusse et al., 2019).

Outra justificativa que corrobora ao uso do meio sintético WC se relaciona aos custos de produção comparativamente menores do meio sintético WC em relação ao meio BG-11., sendo assim uma vantagem econômica para o uso do meio WC no crescimento de biomassa microalgal. De acordo com Colusse et al. (2019), o custo de produção de 1000 mL de meio WC, de U\$ 2,61 (dólares), é quase dez vezes menor que o meio sintético BG-11, U\$ 18,36 (dólares).

2.4.3 Taxa de crescimento, tempo de geração, velocidade de crescimento e amplitude

Além da análise das Figuras 2.2, 2.3 e 2.4(A e B) e dos rendimentos de biomassa (Tabela 2.5), também foram avaliados os parâmetros cinéticos de crescimento: taxas de crescimento (μ , dia^{-1}), tempo de geração (T_g , dia), velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, dia^{-1}) e amplitude (A), apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6– Parâmetros cinéticos de crescimento: taxa de crescimento (μ , d^{-1}), tempo de geração (T_g , dia), velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, dia^{-1}), amplitude (A) e Modelagem de Gompertz (R^2), para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) cultivadas nos meios sintéticos BG-11 e WC

Condição	μ (dia^{-1})	T_g (dia)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (dia^{-1})	A	(R^2)
WC-Csk	$0,693 \pm 0,134$	0,98	0,71	$2,020 \pm 0,336$	0,995
WC-Cvg	$0,662 \pm 0,011$	0,58	1,20	$1,627 \pm 0,033$	0,992
WC-Dsp	$0,419 \pm 0,110$	3,14	0,22	$1,243 \pm 0,134$	0,996
BG-11-Csk	$0,209 \pm 0,009^a$	1,87	0,37	$0,529 \pm 0,058$	0,987
BG11-Cvg	$0,761 \pm 0,095^a$	0,82	0,85	$0,374 \pm 0,399$	0,988
BG-11-Dsp	$0,251 \pm 0,192$	0,20	3,48	$0,444 \pm 0,246$	0,979

WC-Csk: *Chlorella sorokiniana* em meio sintético WC; WC-Cvg: *Chlorella vulgaris* em meio sintético WC; WC-Dsp: *Desmodesmus sp.* em meio sintético WC; BG-11-Csk: *Chlorella sorokiniana* em meio sintético BG-11; BG-11-Cvg: *Chlorella vulgaris* em meio sintético BG-11; BG-11-Dsp: *Desmodesmus sp.* em meio sintético BG-11.

Letras iguais indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

a: diferença estatística significativa entre as condições BG-11-Csk e BG11-Cvg ($p < 0,05$).

Como pode ser observado na Tabela 2.6, dentre todas as condições testadas a cepa Cvg cultivada em meio BG-11 obteve o maior resultado numérico em relação à taxa de crescimento, com resultado de $0,761 \pm 0,095 \text{ dia}^{-1}$. Em meio sintético WC, o resultado obtido para esta mesma cepa foi um pouco inferior, atingindo o valor de $0,662 \pm 0,011 \text{ dia}^{-1}$. Porém, quando foi feita a análise estatística dos dados, observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os resultados, não sendo possível definir qual meio sintético foi de fato mais viável especificamente para esta cepa.

Para as cepas Csk e Dsp, os resultados de taxas de crescimento foram superiores em meio sintético WC ($0,693 \pm 0,134 \text{ dia}^{-1}$ e $0,419 \pm 0,110 \text{ dia}^{-1}$, para Csk e Dsp, respectivamente), quando comparadas aos resultados obtidos em meio sintético BG-11 ($0,209 \pm 0,009 \text{ dia}^{-1}$ e $0,251 \pm 0,192 \text{ dia}^{-1}$, para Csk e Dsp, respectivamente).

Apesar dessa diferença numérica nas taxas de crescimento para as três algas no meio WC (Tabela 2.6), os testes estatísticos indicaram que não houve diferença estatística significativa entre as três cepas testadas. Com este fato, foi possível afirmar que as três cepas obtiveram desempenhos semelhantes. Já para o meio BG-11, observou-se diferença estatística somente entre as cepas Csk e Cvg.

Candido (2019), em seu cultivo controle com BG-11, com temperaturas e intensidade luminosa bem próximas às condições experimentais a esta, obteve taxas

de crescimento superiores, $1,5 \text{ dia}^{-1}$ para Csk e Dsp e $1,2 \text{ dia}^{-1}$ para Cvg. Tal fato pode ser justificado pelas diferenças na densidade celular inicial que foram reconhecidamente superiores às utilizadas nesta etapa, o que impossibilitou uma comparação mais concreta dos resultados. Aravantinou, Theodorakopoulos e Manariotis (2013) observaram uma redução da taxa de crescimento devido a maior concentração inicial de microalgas; quando a concentração inicial das células microalgais era de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$, a taxa de crescimento foi da ordem de $0,1 \text{ dia}^{-1}$, enquanto que quando a concentração inicial das células microalgais era de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, a taxa de crescimento foi da ordem de $0,02 \text{ dia}^{-1}$.

Em relação ao tempo de geração as cepas que apresentaram os menores tempo de geração foram Cvg ($T_g = 0,58 \text{ dia}$) em meio sintético WC e Dsp ($T_g = 0,20 \text{ dia}$), em meio sintético BG-11 (Tabela 2.6). Esse menor tempo de geração proporcionou que as mesmas cepas se destacassem em relação à velocidade de crescimento, apresentando as maiores velocidades de crescimento encontradas, sendo para Cvg ($\mu_{\text{máx}}=1,20 \text{ dia}^{-1}$) cultivada em WC, e para Dsp ($\mu_{\text{máx}}=3,48 \text{ dia}^{-1}$), cultivada em BG-11 (Tabela 2.6).

Quando se comparou o T_g e velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para as cepas Csk e Cvg, com os cultivos em WC e BG-11, pode-se concluir que houve menor tempo de geração e maior velocidade de crescimento para ambas cepas quando cultivadas em meio WC, podendo assim concluir que para Csk e Cvg o meio sintético WC foi mais favorável ao crescimento destas microalgas. Todavia, para a cepa Dsp o mesmo não foi verificado pois apresentou menor tempo de geração (T_g) e maior velocidade específica ($\mu_{\text{máx}}$) quando cultivada em meio sintético BG-11.

Andrade (2014), avaliou a produção de microalgas e composição proteica e lipídica via espectrometria de massas para *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp.*, *Desmodesmus sp.*, *Monoraphidium sp.* e *Oocystis sp.*, com cultivos agitados, em meio WC (Andersen, 2005), temperatura 23°C , luminosidade de $23\text{-}24 \mu\text{mols.fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h e obteve velocidade de crescimento média de $0,320 \text{ dia}^{-1}$ e tempo de geração de 2 dias. Resultados de velocidade de crescimento semelhante foram encontrados por Marin, Espinosa e Stephenson (2010), para Cvg ($0,377 \text{ dia}^{-1}$), para

Csk ($0,297 \text{ dia}^{-1}$) e para Dsp ($0,289 \text{ dia}^{-1}$), com mesmo tempo de geração de aproximadamente 2 dias para as três cepas, cultivadas em meio WC.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a velocidade específica da cepa Dsp. ($0,22 \text{ dia}^{-1}$) se assemelhou aos resultados obtidos por Andrade (2014) e Marin, Espinosa e Stephenson (2010). No entanto, as velocidades específicas de crescimento encontradas neste estudo em meio WC, para Cvg ($1,20 \text{ dia}^{-1}$) e Csk ($0,76 \text{ dia}^{-1}$), foram superiores às encontradas nas pesquisas realizadas por Andrade (2014) e Marin, Espinosa e Stephenson (2010). Diferenças nos arranjos experimentais, tais como a presença de agitação, intensidade luminosa quase 4 vezes menor e diferenças entre os meios de cultivos foram fatores que podem ter influenciado nos resultados obtidos.

Outro fator avaliado foi a amplitude (A) que tem como significado o maior valor de crescimento final, obtido pela equação ($y=\ln X/\ln Y$) (Santos, 2013). Para este parâmetro observou-se que a microalga Csk demonstrou o melhor desempenho em meio sintético WC, com valor de $2,020 \pm 0,336$ (Tabela 2.6). Além disso, as demais cepas cultivadas em WC apresentaram resultados significativos de amplitude, quais sejam: $1,627 \pm 0,033$ e $1,243 \pm 0,134$, para Cvg e Dsp, respectivamente (Tabela 2.6).

2.5 Considerações finais

Neste estudo foram fixadas condições físicas como temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa, o que permitiu estudar a influência dos meios testados (BG-11 e WC) no desempenho do crescimento e rendimento de biomassa produzida pelas microalgas Csk, Cvg e Dsp..

Assim, pode-se concluir que o meio de cultivo WC atendeu de forma mais satisfatória as necessidades nutricionais das três microalgas, nas condições estudadas, o que proporcionou maior rendimento de biomassa em um tempo menor, devido a sua maior concentração de magnésio.

A partir da análise conjunta entre interpretação gráfica das curvas de crescimento das microalgas das Figuras 2.4 (A e B), rendimentos de biomassa (Tabela 2.5) e parâmetros cinéticos de crescimento (Tabela 2.6), foi possível concluir que os resultados obtidos convergiram para a confirmação do meio WC como o meio sintético mais viável ao cultivo das microalgas relacionadas a este estudo.

A obtenção dos resultados deste capítulo se mostrou relevante para esta pesquisa por três motivos principais. Primeiramente pelo conhecimento de um meio de cultivo sintético e condições físico-químicas adequadas [temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 1$), pH (7,8), irradiância ($130 \mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), que viabilizaram a produção contínua de um volume de biomassa algal suficiente à aplicação nas etapas subsequentes.

O segundo motivo se relacionou à determinação do meio sintético WC como o meio sintéticos de referência (CONTROLE) para cada cepa, importante para as próximas fases experimentais. O terceiro e último motivo esteve atrelado ao conhecimento do comportamento da fase exponencial para cada cepa, principalmente a determinação da metade desta fase (Tabela 2.5), sendo considerado o período ideal para transferência da suspensão de microalgas por se encontrarem em sua melhor condição fisiológica. Portanto, diante do exposto, prosseguiu-se o estudo com as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) e adotou-se o meio sintético WC para as próximas etapas desta pesquisa.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA BIOMASSA DE MICROALGAS E REMOÇÃO DE NUTRIENTES EM MEIO SINTÉTICO WC E EM DIFERENTES DILUIÇÕES DE VINHAÇA *IN NATURA* E BIODIGERIDA

3.1 Introdução

O processo industrial de produção de etanol ocorre pela destilação do caldo fermentado da cana-de-açúcar. Ao final deste processo são retirados da parte inferior das colunas de destilação um resíduo líquido denominado vinhaça, a uma taxa de 12-15 litros de vinhaça para cada litro de etanol (Sydney et al., 2021). O Brasil lidera a produção mundial de etanol de cana-de-açúcar, com produção aproximada de 33,1 bilhões de litros, em 2019 e 2020, o que resulta em um volume de vinhaça estimado de 446 bilhões de litros (Sydney et al., 2021).

Os principais desafios na gestão dos volumes gerados anualmente de vinhaça se relacionam ao armazenamento e a destinação deste resíduo, sendo crucial a adoção de práticas e tecnologias que evitem impactos ao meio ambiente. Nesse sentido, diferentes formas de reaproveitamento desses resíduos vêm sendo estudadas, com destaque para a aplicação da digestão anaeróbia (AD) na produção de biogás, reciclagem de vinhaça para fluxos de fermentação (Fadel et al., 2014; Yang et al., 2016), fertirrigação (Christofolletti et al., 2013; Filoso et al., 2015), produção de energia (Walter et al., 2011), produção de ração animal (Cortez et al., 1992) e tratamento biológico (fungos, bactérias e microalgas) (Reis e Hu, 2018; Candido e Lombardi, 2019).

A vinhaça pode fornecer um meio de cultura rico para o cultivo biológico por apresentar, em sua composição, sólidos e minerais orgânicos e inorgânicos, como potássio, cálcio e magnésio (Christofolletti et al., 2013; Reis e Hu, 2017). A mesma disponibilidade de nutrientes que permite o uso da vinhaça na fertirrigação também permite sua utilização em meios de cultura para microalgas (Candido, 2019).

Os primeiros estudos relacionados ao cultivo de microalgas em vinhaça se iniciaram na década de 1980 e apresentam como principais vantagens a eliminação de poluentes, capacidade de assimilação de nutrientes, principalmente nitrogênio e

fósforo, além da diminuição dos custos com insumos e água, não necessitando do uso de qualquer produto químico que seja prejudicial ao meio ambiente ou de alto custo. A produção de biomassa de microalgas em vinhaça representa uma das tecnologias mais promissoras para a biorremediação e aproveitamento deste resíduo (Ayala e Bravo, 1984; Oliveira, 1988; Costa, Medri e Perdomo, 2000; Olguín, 2003; Jimenez-Perez et al., 2004; Salgueiro et al., 2016; Quintero-Dallos et al., 2019).

No entanto, até o presente momento, existem lacunas para seu uso, com destaque para pesquisas que busquem tratamentos mais viáveis para o resíduo e cepas de microalgas mais tolerantes e produtivas. Outros aspectos mandatórios se relacionam a investigações sobre a fisiologia dos organismos nos resíduos e que discutam a contaminação biológica presente nos cultivos e na biomassa produzida (Candido, 2019). Além desses fatores, o cultivo de microalgas ainda é considerado limitado sob o viés econômico, pois a etapa de colheita é um dos principais desafios na obtenção da biomassa algal visando aplicações biotecnológicas em função do tamanho das células (Khoo et al., 2020; Yin et al., 2020).

Em vista do exposto, o presente capítulo foi delineado com base em duas questões de pesquisa: 1) Cultivos em fotobiorreatores não axênicos, realizados em elevadas concentrações de vinhaça *in natura* e biodigerida se caracterizam como uma estratégia tecnicamente viável para a produção da biomassa das microalgas clorofíceas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* e *Desmodesmus sp.*? 2) Considerando que as microalgas clorofíceas assimilam parte dos nutrientes presentes na vinhaça *in natura* e biodigerida para o seu desenvolvimento, estas seriam capazes de reduzir o teor de nutrientes presentes na vinhaça *in natura* e biodigerida, fator de impacto negativo ao ser descartado no ambiente e ainda produzir com menores custos biomassa de microalgas viável para aplicações biotecnológicas?

A busca por tais respostas nos direcionou ao desenvolvimento de testes em diferentes diluições de vinhaça visando contribuir para um melhor aproveitamento dos recursos presentes na vinhaça. Almejou-se neste capítulo conceber tecnologias mais simples e eficazes para a produção de biomassa microalgal aliada ao tratamento da vinhaça, com vistas a melhorar a sustentabilidade econômico-ambiental e

consequentemente reduzir os impactos ambientais causados por esse importante resíduo da agroindústria brasileira.

3.2 Hipóteses

Um dos grandes desafios da atualidade é encontrar modos eficazes de tratamento e ambientalmente amigáveis para os grandes volumes de águas residuárias gerados diariamente pelo homem. No âmbito científico e tecnológico, o reaproveitamento de águas residuárias, como a vinhaça, em substituição aos meios de cultivos sintéticos para microalgas pode ser uma alternativa para a redução do custo de produção de biomassa microalgal, possibilitando a geração de produtos de interesse comercial. Desta forma, esforços devem ser empenhados para buscar uma melhor combinação entre produção de biomassa e aproveitamento dos nutrientes presentes na vinhaça.

As principais hipóteses relacionadas a este capítulo são:

- i) Cultivos em fotobiorreatores não axênicos, realizados em elevadas concentrações de vinhaça *in natura* e biodigerida se caracterizam como uma estratégia tecnicamente viável para a produção da biomassa das microalgas clorofíceas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* e *Desmodesmus sp.*
- ii) As microalgas seriam capazes de assimilar parte dos nutrientes presentes na vinhaça *in natura* e biodigerida para o seu desenvolvimento e manterem a viabilidade celular ao final dos cultivos;
- iii) Ao final dos cultivos microalgais em vinhaça *in natura* e biodigerida as concentrações de potássio possibilitariam o uso deste efluente final como fertilizante.

3.3. Objetivos

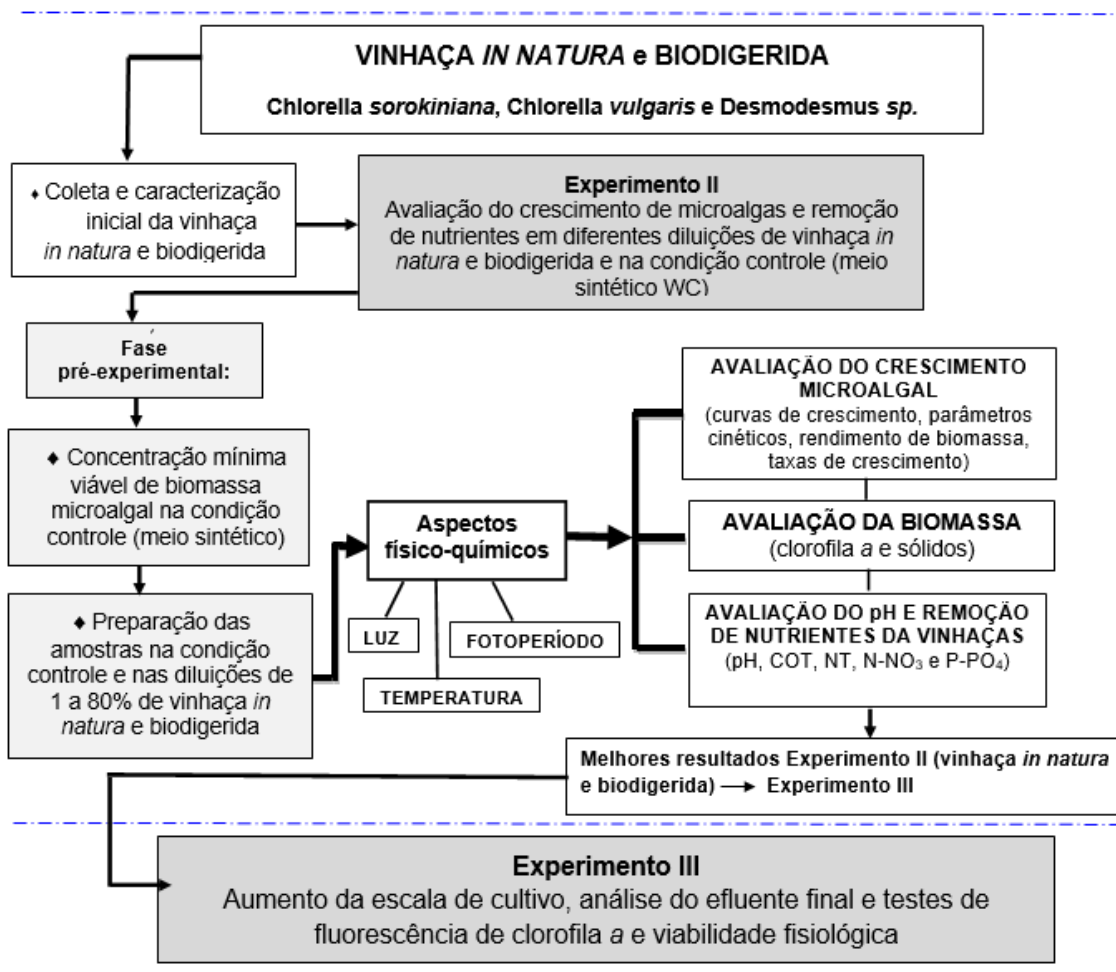
Os objetivos deste capítulo foram: avaliar o desempenho do crescimento algal, produção de biomassa, remoção de nutrientes e testar a viabilidade celular das células microalgais ao final do tratamento biológico realizado pelas microalgas *Chlorella sorokiniana* (Csk), *Chlorella vulgaris* (Cvg) e *Desmodesmus sp.* (Dsp) nos cultivos referência em meio sintético WC e em diferentes diluições de dois tipos de vinhaça: *in natura* (Vnat) e biodigerida (Vbio).

3.4 Materiais e métodos

Neste capítulo foram realizados os Experimentos II e III. No Experimento II foram investigados o potencial de crescimento, produção de biomassa das microalgas clorofíceas *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus sp.*, e avaliou-se a remoção de nutrientes ao final dos cultivos em vinhaça *in natura* e biodigerida, sendo testados diferentes percentuais de diluição (1 a 80% - vinhaça:água deionizada). Com os resultados obtidos no Experimento II, foi realizado o Experimento III no qual se testou a viabilidade celular das células microalgais.

O fluxograma apresentado na Figura 3.1 exibe o delineamento do presente capítulo que possui como ponto central o Experimento II.

Figura 3.1 – Capítulo III: Fluxograma Experimental



3.4.1 Coleta e caracterização inicial da vinhaça *in natura* e biodigerida

A Usina São Martinho, localizada na cidade de Pradópolis, no Estado de São Paulo forneceu dois tipos de vinhaça: *in natura* (convencional) e biodigerida (tratada), proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB). A usina visitada é considerada a maior unidade processadora de cana-de-açúcar do mundo, sendo os principais produtos da unidade o açúcar e o etanol (anidro, hidratado e industrial) (Fuess, 2018).

Optou-se por realizar uma coleta única, de 100 litros de cada tipo de vinhaça, realizadas em junho de 2019 (vinhaça *in natura*) e setembro de 2019 (vinhaça biodigerida). Com o intuito de preservar suas características físico-químicas durante todo o experimento as amostras de vinhaça foram armazenadas em reservatórios plásticos de 20 litros e congeladas a -20°C de temperatura.

A caracterização inicial quanto aos parâmetros físico-químicos das vinhaças *in natura* e biodigerida foi realizada conforme os métodos descritos na Tabela 3.1. Esta caracterização foi realizada em parceria entre os Laboratório de Processos Biológicos (LPB), Laboratório de Saneamento (LS/SHS) e o Laboratório BIOTACE, todos pertencentes à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP).

Tabela 3.1 – Variáveis físico-químicas e seus respectivos métodos de análise e referências utilizados na caracterização inicial da vinhaça *in natura* e biodigerida

Variáveis	Métodos	Referência
Carboidrato total (mg.L ⁻¹)	Método espectrofotométrico	Dubois et al. (1956)
P-Total (mg.L ⁻¹)	Espectrofotométrico-Método 4500P B – Digestão com persulfato	APHA (2005)
PO ₄ ³⁻ (mg.L ⁻¹)	Espectrofotométrico-Método 4500P E – Ácido ascórbico	
COT (g.L ⁻¹)	Método 5310 B – Combustão à alta temperatura	
DQOt (g.L ⁻¹)	Colorimétrico – Método 5220D – Refluxo fechado	APHA (2012)
DQOs (g.L ⁻¹)	Colorimétrico – Método 5220D – Refluxo fechado	
DBO (mg.L ⁻¹)	Método 5210D	
NTK (mg.L ⁻¹)	Método 4500N C – Digestão com persulfato e Método 4500Norg	
pH	Método potenciométrico (eletrodo de pH)	
SST, SSF e SSV (mg.L ⁻¹)	Gravimétrico - Método 2540D e 2540E	Buchanan e Nicell (1997) Greenhill (2004) Stickland (1951) Taylor (1996) Adorno, Hirasawa e Varesche (2014)
Sulfato (mgSO ₄ ⁻² .L ⁻¹)	Método turbidimétrico do cloreto de bário	
Fenóis totais	-	
Glicerol (mg.L ⁻¹)	-	
Proteína (mg.L ⁻¹)	-	
Ac. Lático (mg.L ⁻¹)	-	
Acetona (mg.L ⁻¹)	Método Cromatografia Gasosa por chama ionizante	
Metanol (mg.L ⁻¹)		
Etanol (mg.L ⁻¹)		
Ac. Acético (mg.L ⁻¹)		
Ac. Propiônico (mg.L ⁻¹)		
Ac. Isobutírico (mg.L ⁻¹)		
Ac. Butírico (mg.L ⁻¹)		
Ac. Isovalérico (mg.L ⁻¹)		
Ac. Valérico (mg.L ⁻¹)		
Ac. Capróico (mg.L ⁻¹)		

P-Total: fósforo total; PO₄³⁻: fósforo solúvel reativo; DQOt: demanda química de oxigênio total; DQOs: demanda química de oxigênio solúvel; COT: Carbono Orgânico Total; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; NTK: nitrogênio total Kjeldahl; pH: potencial hidrogeniônico; SST: sólidos suspensos totais; SSF: sólidos suspensos fixos e SSV: sólidos suspensos voláteis.

3.4.2 Experimento II: Avaliação do crescimento da biomassa de microalgas e remoção de nutrientes em meio sintético WC (condição controle) e em diferentes diluições de vinhaça *in natura* e biodigerida

O Experimento II consistiu em avaliar a capacidade de crescimento algal, produção de biomassa em vinhaça *in natura* e biodigerida. E também se relacionou à avaliação da remoção de poluentes ao final dos tratamentos biológicos realizados pelas microalgas *Chlorella sorokiniana* (Csk), *Chlorella vulgaris* (Cvg) e *Desmodesmus sp.* (Dsp) quando cultivadas na condição controle (meio sintético WC) e em diferentes diluições de dois tipos de vinhaça: *in natura* (Vnat) e biodigerida (Vbio).

Em todas as etapas deste experimento foram realizados cultivos axênicos para os cultivos controle em meio sintético WC e não axênicos para os cultivos em vinhaça. Por este fato, para o caso específico da vinhaça *in natura* e biodigerida houve consórcio entre as microalgas e demais microrganismos presentes. No entanto, apenas foi dado enfoque na performance das microalgas do estudo.

Dezessete condições experimentais foram realizadas para cada microalga, sendo:

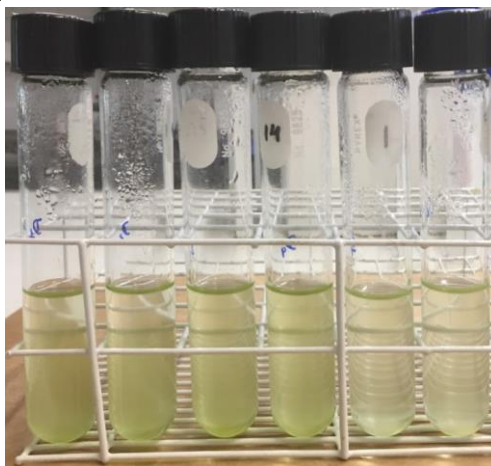
- 1 condição controle em meio sintético **WC**;
- 8 diluições de vinhaça *in natura* (Vnat) representadas pelas siglas: **1Vnat, 5Vnat, 10Vnat, 20Vnat, 30Vnat, 40Vnat, 60Vnat e 80Vnat**, que correspondem à **1, 5, 10, 20, 30, 40, 60 e 80% de diluição**; e
- 8 condições testadas em vinhaça biodigerida (Vbio) representadas pelas siglas **1Vbio, 5Vbio, 10Vbio, 20Vbio, 30Vbio, 40Vbio, 60Vbio e 80Vbio**, que correspondem à **1, 5, 10, 20, 30, 40, 60 e 80% de diluição**;

Antes do início do Experimento II foi necessária a aplicação de duas fases pré-experimentais, sendo a primeira para a obtenção da concentração mínima viável de biomassa microalgal para as microalgas utilizadas neste experimento (seção 3.4.2.1). E, a segunda, para a preparação das amostras do meio sintético WC e das vinhaças *in natura* e biodigerida (seção 3.4.2.2), relatadas a seguir.

3.4.2.1 Preparação da concentração mínima viável de biomassa microalgal

A partir do resultado obtido no capítulo II, aplicou-se o meio sintético WC nas etapas pré-experimentais do Experimento II. Foram primeiramente selecionados os cultivos em meio sintético WC de Csk, Cvg e Dsp, que serviram de pré-inóculos (repique zero - R_0), mantidos no Banco de cultura de algas do Laboratório BIOTACE, conforme demonstra a Figura 3.2.

Figura 3.2 – Pré- inóculos (R_0) das microalgas Csk, Cvg e Dsp, cultivadas em meios sintético WC mantidos até o momento do experimento no Banco de Cultura de Algas do Laboratório BIOTACE



<i>WC-Csk</i>	<i>WC-Cvg</i>	<i>WC-Dsp</i>
---------------	---------------	---------------

Fonte: autoria própria.

Para que se alcançasse uma concentração mínima viável de biomassa microalgal, foram preparados previamente, em triplicata, tubos de cultura de 50 mL e frascos de vidro Duran (250 mL e 500 mL), contendo os meios sintéticos WC autoclavados a 121°C.

A partir dos pré-inóculos (R_0 , Figura 3.2), na proporção de 10%, foram realizados quatro repiques sequenciais (R_1 a R_4), com inóculos em tubos de cultura com 20 mL de volume final (R_1), em frascos Duran com 100 mL (R_2), 200 mL (R_3) e 400 mL (R_4) de volume final. Após a realização de cada repique as culturas foram mantidas em incubadora (Nova Ética B.O.D 411D), adaptada com iluminação à LED (Light Emitting Diode), na temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de $130 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, conforme Candido (2019). O intervalo entre os

repiques correspondeu à metade da fase exponencial específica definida previamente para cada cepa (Capítulo II, seção 2.4.2, Tabela 2.5).

Para todas as cepas, com a finalidade de homogeneizar a concentração mínima viável de biomassa para as algas presentes nos inóculos foi então padronizada, considerando no último repique (R_4), o valor de densidade óptica inicial $D.O._{750nm} = 0,1$ (Andrade, 2014), medido com auxílio de espectrofotômetro DR4000 (HACH) equipado com luz ultravioleta (UV). Essa intervenção substituiu a realização da contagem inicial das amostras.

3.4.2.2 Preparação das amostras em WC e em vinhaça *in natura* e biodigerida

As amostras em meio sintético WC foram preparadas em condições axênicas, tubos de cultura com este meio foram previamente autoclavados (121 °C), armazenados até sua utilização em geladeira (7 °C) e os repiques realizados em capelas de fluxo laminar, preservando-se as condições de assepsia. Neste experimento, realizado em duplicata, foram necessários 6 tubos de cultura de 50 mL, sendo destinado 2 tubos para cada alga (Csk, Cvg e Dsp). O pH do meio sintético WC foi mantido em 7,6. Foram seguidos exatamente os mesmos procedimentos metodológicos para a caracterização do crescimento microalgal (curvas e parâmetros cinéticos de crescimento) e análise estatística, descritos no capítulo II (seções 2.3.4 e 2.3.5).




Para a vinhaça *in natura* (Vnat) e biodigerida (Vbio), foram previamente preparadas amostras quando completamente descongeladas e alcançassem a temperatura de 25°C, eram homogeneizadas e retiradas alíquotas de 1 L de cada tipo de vinhaça dos galões, sendo este volume transferido para provetas de 1 L. Aplicou-se apenas o processo de decantação com a finalidade de remover sólidos grosseiros e, após o período de 24 horas, retirava-se o sobrenadante, armazenando-o em uma nova embalagem, e mantendo-o em geladeira a 7°C. Não houve correção do pH dos cultivos diluídos de vinhaça *in natura* e biodigerida neste experimento.

Próximo ao início do experimento foram preparadas, em duplicata, tubos de cultura de 50 mL de capacidade, com 18 mL, nas diluições das amostras de 1 a 80%

(porcento) vinhaça:água deionizada para Vnat e Vbio. Para isso, padronizou-se a utilização de água deionizada, nas diferentes proporções requeridas, evitando-se contaminações e possíveis interferências da composição da água oriundas de fontes externas.

Na Figura 3.3 foram apresentados os tubos de cultura de 50 mL de capacidade, nas 17 condições experimentais, antes do recebimento dos inóculos de microalgas, ou seja, antes do início do experimento.

Figura 3.3 - Representação das dezessete condições experimentais antes do início do experimento: (A) condição controle em meio sintético WC (sem diluição), (B) oito diluições de vinhaça *in natura*, e (C) oito diluições da vinhaça biodigerida

(A) Meio sintético WC (controle)	(B) Amostras vinhaça in natura (1 a 80%)								(C) Amostras vinhaça biodigerida (1 a 80%)							
																
Diluições	1	5	10	20	30	40	60	80	1	5	10	20	30	40	60	80
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%

Fonte: autoria própria.

3.4.2.3 Condições de cultivo e aspectos físico-químicos

O experimento foi realizado em tubos de cultura de 50 mL (20 mL de volume total e 10% de inóculo de microalgas) e as algas foram mantidas em incubadoras (Nova Ética B.O.D 411D), adaptadas com iluminação à LED (Light Emitting Diode), nas condições de cultivo apresentadas na Tabela 3.2. A determinação dos aspectos físico químicos presentes na Tabela 3.2 foi definida a partir da metodologia desenvolvida por Candido (2019).

Tabela 3.2 - Condições de cultivo e aspectos físico-químicos

Condições	Descrição	
Microalgas (clorofíceas)	<i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Desmodesmus sp</i>	
Meios de cultura e Diluições (%)	WC (sintético)	sem diluição
	vinhaça <i>in natura</i> (Vnat) vinhaça biodigerida (Vbio)	1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 60% e 80%
Metabolismo	Mixotrófico	
Aspectos físico-químicos	Fotoperíodo	12 horas
	Temperatura	24 ± 1 °C
	Intensidade luminosa	130 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

No dia inicial (D_0) do Experimento II, para todas as algas, nas 17 condições, foram transferidos 2 mL das amostras iniciais (inóculos) e observou-se a melhor fase fisiológica das algas para esta transferência, i.e., a metade da fase exponencial de crescimento de cada alga, sendo estes dados obtido em testes anteriores (Capítulo II, seção 2.4.2, Tabela 2.5).

As culturas foram testadas em duplicata, com acompanhamento diário da absorbância ($\lambda_1= 683 \text{ nm}$) e, a partir destas informações foram elaboradas curvas de crescimento (absorbância versus tempo). Este acompanhamento foi encerrado quando era observada a estabilização do crescimento, ou seja, o alcance da fase estacionária de crescimento.

3.4.2.4 Caracterização do crescimento microalgal: curvas e parâmetros cinéticos de crescimento

Para todas as condições testadas foram confeccionadas curvas de crescimento, obtidas a partir das leituras de densidade óptica ($\lambda_1=683 \text{ nm}$) em espectrofotômetro DR4000 (HACH), pelo tempo de duração de cada condição.

Além da confecção das curvas de crescimento foram avaliados os parâmetros cinéticos (velocidade específica de crescimento, tempo de geração e amplitude), taxas de crescimento e o rendimento de biomassa por absorvância ($\lambda_1= 683\text{nm}$). Todos os procedimentos metodológicos relacionados à caracterização do crescimento microalgal foram descritos anteriormente na seção 2.3.4 do Capítulo II.

3.4.2.5 Estimativa de produção de clorofila a e biomassa algal

Para avaliar a produção de biomassa algal e a concentração de clorofila a, foram realizadas determinações de clorofila a e sólidos suspensos totais (SST), no dia inicial e ao final do experimento, seguindo os métodos e referências indicados na Tabela 3.3. Para avaliar a biomassa algal considerou-se apenas os sólidos suspensos voláteis (SSV), por se tratar da fração orgânica presente nas amostras analisadas.

Tabela 3.3 - Métodos e referências para avaliação da clorofila a e da biomassa algal por sólidos

Variáveis	Métodos	Referências
Clorofila a (mg.L^{-1})	Extração com etanol 80%	(NUSCH, 1980 modificado por NEDERLANDSE NORM, 1981)
Sólidos (SSV) (mg.L^{-1})	Gravimetria e Combustão - Método 2540D e 2540E	APHA (2012)

Obs: SSV: sólidos suspensos voláteis.

Para a determinação das concentrações de sólidos suspensos totais foram utilizadas membranas GFC/Whatman, com porosidade de $1,2 \mu\text{m}$ previamente calcinadas. As membranas passaram por secagem em estufa por um período de 24 horas, a $103 \text{ }^\circ\text{C}$ e mufla (30 minutos, 550°C). Após atingirem temperatura ambiente (25°C) foram pesadas para determinação das frações de interesse (orgânicas e inorgânicas).

3.4.2.6 Avaliação do pH e eficiência de remoção de poluentes em vinhaça *in natura* e biodigerida

No dia inicial (D_0) e ao final do experimento (décimo dia, D_{10}) foram avaliados a variação do pH durante o experimento e a eficiência de remoção dos poluentes, sendo medidos para monitorar a eficiência do tratamento empregado. Para o pH aplicou-se o método potenciométrico, com uso de medidor de pH TEC-2mp (Tecnal).

Para a determinação das concentrações de carbono orgânico total (fração orgânica e inorgânica), nitrogênio total (NT) e nutrientes dissolvidos como o nitrato (NO_3^-) e o fosfato solúvel reativo (PO_4^{3-}), alíquotas das amostras iniciais e finais foram centrifugadas e filtradas em membrana de fibra de vidro GF3 MN com porosidade de 0,6 μm . O volume filtrado foi então utilizado para realização das análises de NT e COT, processadas no Analisador de COT/NT (Shimadzu) e as concentrações de NO_3^- e PO_4^{3-} foram determinadas de acordo com os métodos descritos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Métodos e referências para avaliação dos efluentes após os cultivos com microalgas

Variável	Unidade	Método	Equipamento/Referência
pH (potencial hidrogeniônico)	-	Potenciométrico (eletrodo de pH)	-
Carbono Orgânico Total (COT)	mg L^{-1}	Método 5310 B – Combustão à alta temperatura	COT Shimadzu® APHA (2012)
Nitrogênio Total (NT)	mg L^{-1}	Espectrofotométrico Ultravioleta - Método 4500 NO_3 B	Espectrofotômetro Hach®
Nitrato (NO_3^-)	$\mu\text{g L}^{-1}$	Espectrofotométrico - Método 4500P.E	APHA (2012)
Fosfato solúvel reativo (PO_4^{3-})	$\mu\text{g L}^{-1}$		

A eficiência de remoção de poluentes foi calculada conforme Equação 1:

$$\text{Eficiência de remoção de poluentes (E\%)} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

Em que C_i é a concentração inicial e C_f é a concentração final dos poluentes alvo.

3.4.2.7 Análise estatística

As análises estatísticas referentes a este capítulo foram realizadas com o auxílio do software BioEstat versão 5.3. Os testes de normalidade utilizados foram Kolmogorov-Smirnov (testes paramétricos) e Kruskal-Walis seguido do método de Dunn (testes não paramétricos). Para a verificação de diferenças significativas entre os parâmetros analisados foi aplicada ANOVA seguida do teste t (LSD), com $p < 0,05$. Os resultados obtidos no Experimento II foram aplicados no Experimento III descrito na sequência.

3.4.3 Experimento III: Aumento da escala de cultivo, análise do efluente final e testes de fluorescência de clorofila *a* e viabilidade celular

3.4.3.1 Aumento da escala de cultivo

No Experimento III buscou-se aumentar o volume das culturas nas melhores condições obtidas em vinhaça *in natura* e biodigerida para Csk e Cvg no Experimento II. As quatro condições testadas no Experimento III foram exibidas no Quadro 3.1.

Quadro 3.1 – Microalgas e as quatro condições testadas no Experimento III realizado com *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* (40Vnat) e em vinhaça biodigerida (60Vbio)

Condições	Descrição
1	<i>Chlorella sorokiniana</i> – 40Vnat
2	<i>Chlorella vulgaris</i> – 40Vnat
3	<i>Chlorella sorokiniana</i> – 60Vbio
4	<i>Chlorella vulgaris</i> – 60Vbio

Obs.: 40Vnat: condição vinhaça *in natura* na diluição 40%
60Vbio: condição vinhaça biodigerida na diluição 60%.

O aumento do volume das culturas nas melhores condições alcançadas no Experimento II foi relevante para atestar que as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* pudessem ser aplicadas em fotobiorreatores com maior escala e

possibilitou a investigação de outras análises físico-químicas que por conta do pequeno volume testado de 20 mL do experimento anterior (Experimento II) esteve inviabilizado.

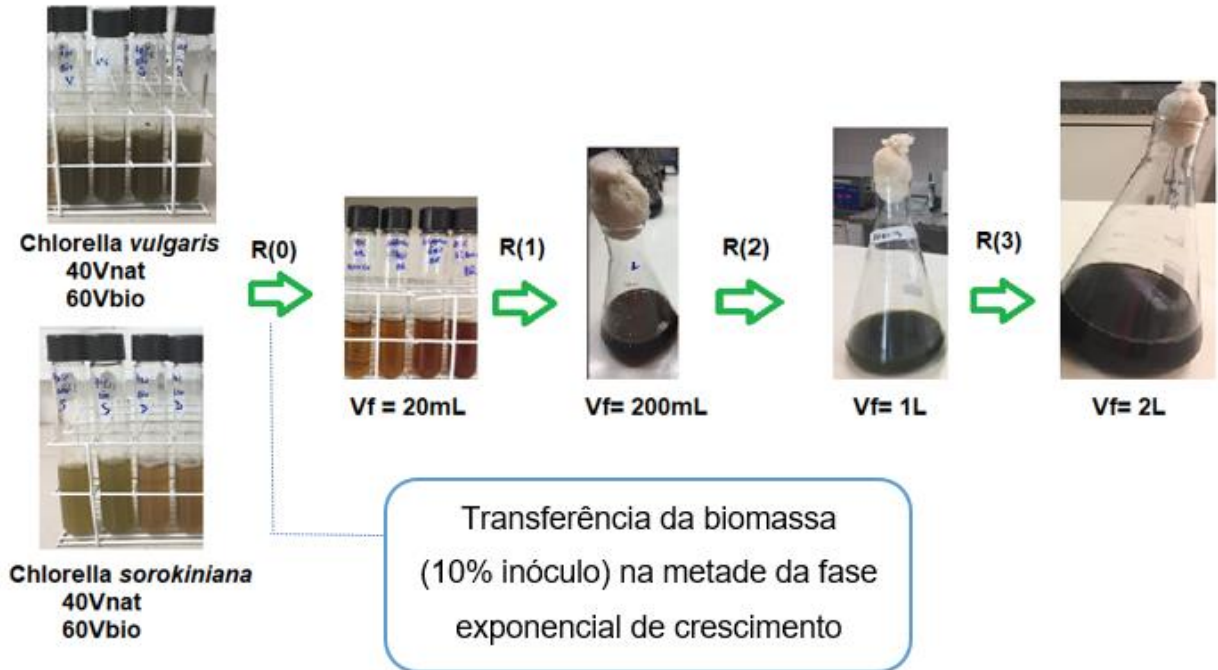
Conforme demonstrado na Figura 3.4 foram realizados repiques sequenciais que possibilitaram o aumento gradual da biomassa e do volume de cultivo nas condições fixadas. Antes de iniciá-los foram separadas as vidrarias e preparados tubos de vidro de 50 mL e frascos Erlenmeyers, em triplicata, com as amostras de vinhaça *in natura* e biodigerida diluídas em água deionizada, nas proporções exigidas (Quadro 3.1).

Em seguida foi realizada correção do pH para 10,2, com uso da solução NaOH 6M de acordo com a metodologia de Santos (2013), sendo aplicado a todas as amostras antes de receberem a alga. Esta correção se baseou em ensaio que não foi relatado neste trabalho.

Foram realizados de modo não-axênico, quatro repiques sequenciais (R_0 , R_1 , R_2 e R_3), considerando a proporção de 10% de cultura, em triplicata para cada condição testada, conforme demonstrado na Figura 3.4.

Para o repique (R_0), utilizou-se como pré-inóculos as amostras do final do Experimento II para todas as condições testadas (Quadro 3.1). O crescimento dessas amostras foi monitorado até a metade da fase exponencial e então foram transferidas para os tubos de cultura de 20 mL identificados como repiques iniciais (R_0). Portanto, os repiques se iniciaram com tubos de vidro com 20 mL de cultura e capacidade de 50 mL (R_0) e gradativamente foram aumentando de volume com os três repiques subsequentes realizados em frascos Erlenmeyers com 200 mL (R_1), 1 L (R_2) e 2 L (R_3) de cultura, com capacidade de 500 mL, 2 L e 5 L, respectivamente. Os repiques R_1 a R_3 foram executados na metade da fase exponencial de crescimento de cada condição (resultados obtidos no Experimento II), mantidos em incubadora (Nova Ética B.O.D 411D) adaptada com iluminação à LED (Light Emitting Diode), fotoperíodo de 12 h, sob intensidade luminosa de $130 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. O acompanhamento do crescimento microalgal foi realizado com uso de espectrofotômetro DR4000 (HACH) equipado com luz Ultravioleta (UV), com análises espectrofotométricas e leituras de densidade óptica a 683 nm (Santos, 2013).

Figura 3.4 – Arranjo experimental dos repiques sequenciais (R) para o aumento do volume de biomassa em culturas com vinhaça *in natura* e biodigerida



Obs.: Vf: volume final. R (0,1,2,,3):repiques sequenciais.

O aumento gradual dos volumes das culturas de microalgas *Chlorella sorokiniana* (Csk) e *Chlorella vulgaris* (Cvg), aclimatadas nas condições 40Vnat e 60Vbio, foi essencial ao desenvolvimento do Experimento III que se iniciou a partir do último repique (R₃).

Após a transferência do repique R₃, quando se alcançou o volume final de 2 L em Erlenmeyers com capacidade total de 5 L, foi então iniciado o Experimento III, nas 4 condições testadas (Quadro 3.1), realizadas em triplicata, mantidas em incubadora (Nova Ética B.O.D 411D), adaptada com iluminação à LED (Light Emitting Diode) (Figura 3.5). O experimento teve duração de 10 dias e foram aplicadas as condições indicadas na Tabela 3.5. As amostras foram agitadas manualmente 3 vezes ao dia. Foi realizado acompanhamento do comportamento do pH, com medidas de 2 em 2 dias, durante os 10 dias experimentais.

Figura 3.5 – Incubadora (Nova Ética B.O.D 411D), adaptada com iluminação à LED (Light Emitting Diode), com as 4 amostras do Experimento III, realizado em triplicata por um período de 10 dias para as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* nas condições de 40Vnat e 60Vbio



Fonte: autoria própria.

Tabela 3.5 – Condições de cultivo e aspectos físico-químicos aplicados ao crescimento das microalgas Csk e Cvg em fotobiorreatores de 5L no Experimento III

Condições	Parâmetros	Unidade
Aspectos físico-químicos	pH inicial	10,2
	Temperatura	24 °C
	Fotoperíodo	12h
	Intensidade luminosa	130 $\mu\text{mols.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Tipo de cultivo	não-axênico	-
Metabolismo	mixotrófico	-

3.4.3.2 Análise do efluente final

Após o período de 10 dias experimentais, o experimento foi encerrado e foram realizadas as análises de carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (NT), nitrato (NO_3^-), fósforo solúvel reativo (PO_4^{3-}), com métodos de referência previamente descritos na Tabela 3.4. Também foram avaliados clorofila a (Tabela 3.3.), o pH (Tabela 3.4) e biomassa seca (Leite e Daniel, 2020). As análises de sulfato (SO_4^{2-}) e potássio (K) foram realizadas pelo técnico do Laboratório de Saneamento (LS) da EESC-USP e os métodos de referência utilizados foram exibidos no Quadro 3.2.

Quadro 3.2 – Parâmetros e métodos de referência

Parâmetros	Método de referência
Potássio (mg.L^{-1})	SM 3500-K B (APHA, 2017)
Sulfato (mg.L^{-1})	HWAH 8051

3.4.3.2.1 Biomassa seca

O monitoramento da biomassa foi determinado a partir da análise de biomassa seca (Figura 3.6), realizado em triplicata para cada condição testada, conforme metodologia de Leite e Daniel (2020).

Figura 3.6– Imagem ilustrativa da análise de biomassa seca



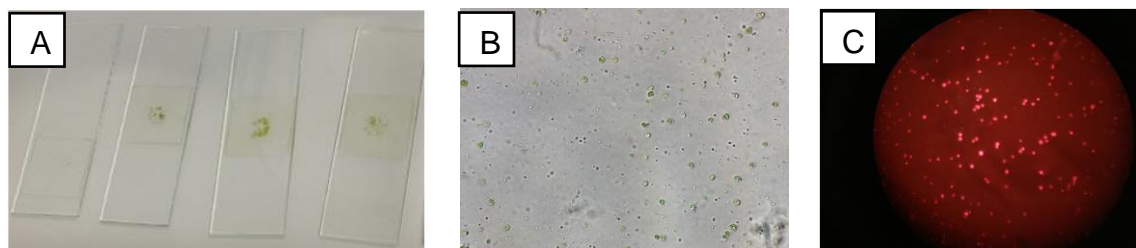
Fonte: autoria própria.

Foram retiradas alíquotas de 50 mL dos fotobiorreatores, sendo estas amostras centrifugadas e lavadas por três vezes. As amostras foram ressuspensas em alíquotas de 5mL e transferidos para cadinhos de porcelana com peso inicial (P0) conhecido e após o período de secagem de 24 horas, em estufa a 103°C, foi realizada nova pesagem em balança analítica para o cálculo do peso com a biomassa seca (P1). O peso final correspondeu à concentração de biomassa seca e foi calculado pela diferença entre P0 e P1. Posteriormente foi calculado o resultado de biomassa seca em relação ao volume da alíquota extraída do fotobiorreator, expresso em mg.L⁻¹.

3.4.3.2.4 Teste de fluorescência de clorofila *a*

Ao final dos 10 dias experimentais de cultivo foram retiradas alíquotas das amostras e preparadas lâminas para visualização das microalgas em microscópio óptico Olympus, com uso de filtro de fluorescência, sendo realizadas imagens microscópicas de todas as condições testadas, de acordo com a metodologia de Takahashi (2018). Na Figura 3.7 foram apresentadas as etapas pertencentes a este teste. O teste de presença de clorofila *a* foi realizado previamente ao teste de viabilidade celular, com a finalidade de certificar a presença das microalgas ao final do experimento e para todas as condições testadas (Quadro 3.1). Após esse teste procedeu-se ao teste de viabilidade celular das amostras.

Figura 3.7 – Etapas do teste de presença de clorofila *a* em amostras de microalgas: A- Lâminas com amostras do final do cultivo; B- imagem microscópica C- imagem microscópica com fluorescência



3.4.3.2.5 Teste de viabilidade celular

O próximo passo após o cultivo de microalgas é a colheita de sua biomassa do meio de cultura, neste caso, da vinhaça *in natura* e biodigerida. O principal fato neste processo é que os flocculantes que são usados para a colheita de microalgas não devem danificar as microalgas (Razack et al, 2015). Almeja-se ao final dos cultivos que sejam mantidas as suas estruturas morfológicas, visto que células microalgas rompidas pelos flocculantes, podem levar à liberação do seu conteúdo intracelular ao meio de cultura, o que, poderia implicar em consequências negativas, a depender da aplicação biotecnológica a qual se destina. Por isso, o teste de viabilidade celular é um importante estudo no processo de colheita de microalgas para diferentes aplicações tecnológicas.

Para este trabalho utilizou-se o sulfato de alumínio por ser um flocculante químico amplamente utilizado para coagulação e também para fins de colheita (Razack et al., 2015).

Nesta etapa foi avaliada a viabilidade das células microalgas ao final dos cultivos realizados no Experimento III, visando reconhecer se a estrutura fisiológica das algas foi mantida ao final dos experimentos. Nesta etapa foram utilizadas as microalgas *Chlorella sorokiniana* (Csk) e *Chlorella vulgaris* (Cvg) nas condições apresentadas no Quadro 3.1.

Os resultados foram avaliados por contraste, comparando-se as amostras do final dos cultivos (Fase A) com as amostras com 4 diferentes concentrações de sulfato de alumínio (0,8; 2,0; 10 e 100 g.L⁻¹), sem a presença de corantes (Fase B) e com corante azul de tripano (Fase C), descritos a seguir.

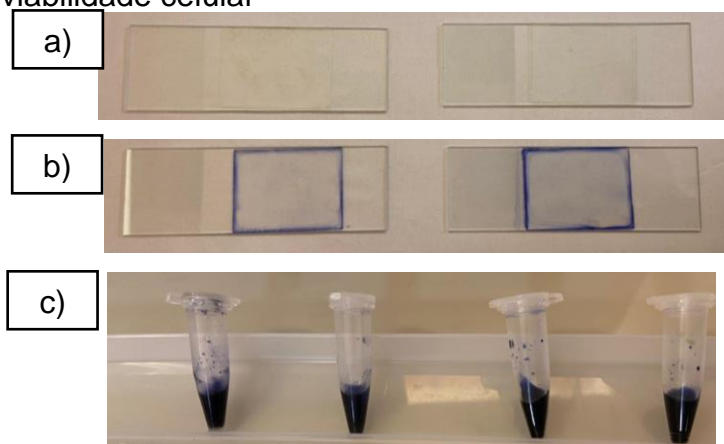
Preparo das amostras:

Após o encerramento do Experimento III, alíquotas de 50mL foram retiradas dos Erlenmeyers de vidro de 5 L com 2 L de cultura, nas 4 condições aplicadas em triplicata para as cepas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* (Quadro 3.1). As amostras foram transferidas para frascos Nalgene e passaram por centrifugação para retirada do sobrenadante e separação da biomassa, sendo utilizada centrífuga Eppendorf 5804R, por um período de 10 minutos, a 20°C e 2000 rpm.

Após a centrifugação a biomassa foi ressuspensa com água deionizada, para o volume de 20 mL, armazenadas em tubos de vidro de 50mL de capacidade.

Em seguida foram realizadas duas fases: A (controle) e B (sulfato de alumínio). Para cada fases foram preparados, em triplicata, tubos Eppendorf com capacidade máxima de 2 mL. Na Figura 3.8 foram ilustradas as fases A, B e C.

Figura 3.8 –Imagens ilustrativas a) das lâminas das fases A(controle) e B (sulfato de alumínio); b): lâminas das fases A e B coradas com Azul de Tripano e c) Imagem ilustrativa dos tubos Eppendorf com amostras coradas com Azul de Tripano a 1% para avaliação da viabilidade celular



Fonte: autoria própria.

- Fase A (controle):

Na fase A, todas as amostras foram preparadas adicionando-se 100 μ L da biomassa microalgal ressuspensa em tubos de vidro e 100 μ L de água deionizada.

- Fase B (sulfato de alumínio):

Na fase B adicionou-se 100 μ L da biomassa microalgal ressuspensa à 100 μ L de solução de sulfato de alumínio (Synth), nas 4 concentrações indicadas na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Concentrações de sulfato de alumínio testadas no experimento

Condição	Concentrações de sulfato de alumínio
1	0,8 g.L ⁻¹
2	2,0 g.L ⁻¹
3	10 g.L ⁻¹
4	100 g.L ⁻¹

Essa fase seguiu a metodologia proposta por Razak et al. (2015) e utilizou o sulfato de alumínio, em 4 diferentes concentrações, sob a justificativa de que este poderia afetar a estrutura fisiológica das células microalgais e possivelmente promover o rompimento celular (lise celular). Essas soluções foram preparadas pesando-se em balança analítica o sulfato de alumínio (0,04; 0,1; 0,5 e 5 g) em 50mL de água deionizada. Desse modo, foi possível identificar em qual condição, ou quais condições as microalgas se romperiam e em quais condições manteriam sua morfologia celular intacta.

As fases A (controle) e B (com sulfato de alumínio) ocorreram simultaneamente e as amostras passaram por um período de incubação de 30 minutos. Ao término deste período, as amostras foram avaliadas em microscópio óptico (Olympus), com aumento de 40 vezes e 200 vezes, com auxílio de câmera de aparelho celular (aumento de 5X). Após esta etapa, procedeu-se ao teste de viabilidade celular com corante Azul de Tripano (Trypan blue), descrito na Fase C.

- Fase C (Método de coloração por Azul de Tripano (Trypan blue))

A partir do método de coloração por Azul de Tripano (Trypan Blue) foi possível avaliar a viabilidade celular das microalgas pela integridade da membrana celular das amostras das fases A e B para todas as condições testadas do Experimento III (Quadro 3.1).

Alíquotas de 100µL das condições controle (fase A) e das condições com quatro diferentes concentrações de sulfato de alumínio (fase B) foram transferidas para novos tubos Eppendorf com capacidade de 2 mL, sendo adicionados 100 µL de solução de Azul de Tripano a 1% de concentração e incubados durante 30 minutos à

temperatura ambiente. As células foram avaliadas em microscópio óptico com aumento de 40 e 200 vezes, com verificação da coloração e da morfologia celular.

Nesse teste, observou-se se as células viáveis permaneceriam intactas e com coloração verde e se as células mortas apareceriam rompidas ou apresentariam Azul de Tripiano difundido em seu protoplasma (Razak et al., 2015).

3.5 Resultados e Discussão

3.5.1 Caracterização inicial da vinhaça *in natura* e biodigerida

A caracterização das propriedades físico-químicas da vinhaça *in natura* e biodigerida foram exibidas na Tabela 3.7 e estão em acordo com outros resultados reportados na literatura (Espanha-Gamboa et al., 2011; Candido e Lombardi, 2017; Del Nery et al., 2018; Fuess, Garcia e Zaiat, 2018; Siqueira et al., 2022).

Todas essas características físico-químicas da vinhaça *in natura* conferem à este efluente agroindustrial um alto potencial poluidor e sua disposição pode causar danos ao meio ambiente. A liberação da vinhaça em corpos d'água pode levar à processos de eutrofização e depleção do oxigênio dissolvido. Também pode causar processos de salinização e lixiviação de nitrato e potássio no solo, levando a problemas estruturais e de permeabilidade, além da contaminação da água subterrânea (Espanha-Gamboa et al., 2011; Siqueira et al., 2022).

Na análise dos dados observou-se que a vinhaça biodigerida possui o pH (8,17) e a acetona (7,1), como principais valores superiores quando comparada à vinhaça *in natura* (Tabela 3.7). Vários trabalhos observaram esse aumento do pH na vinhaça biodigerida que pode ser uma consequência da adição de alcalinizante para a biodigestão anaeróbia da vinhaça ou do próprio processo de digestão anaeróbia (Ferraz Junior et al., 2016; Del Nery et al., 2018).

Tabela 3.7 - Propriedades físico-químicas da vinhaça *in natura* e biodigerida

Parâmetros	Vinhaça <i>in natura</i>	Vinhaça biodigerida	Parâmetros	Vinhaça <i>in natura</i>	Vinhaça biodigerida
pH	4,56	8,17	NTK (mg.L ⁻¹)	620	413,0
DQOt (g.L ⁻¹)	27,7	5,3	Glicerol (mg.L ⁻¹)	3476	9,5
DQOs (g.L ⁻¹)	20,6	3,6	PO ₄ ³⁻ (mg.L ⁻¹)	5,3	6,2
Sulfato (mg.L ⁻¹)	2307,7	3,9	P-Total (mg.L ⁻¹)	33	7,2
Ác. Lático (mg.L ⁻¹)	746,7	15,3	Acetona (mg.L ⁻¹)	4,5	7,1
Proteína (mg.L ⁻¹)	9423,2	2728,1	Metanol (mg.L ⁻¹)	14,1	11,5
SST (mg.L ⁻¹)	1740	386,7	Etanol (mg.L ⁻¹)	213,2	19,8
SSF (mg.L ⁻¹)	164,4	59,6	Ac. Acético (mg.L ⁻¹)	996,8	1071,2
SSV (mg.L ⁻¹)	1575,6	327,1	Ac. Propiônico (mg.L ⁻¹)	133,6	517,0
Cálcio (mg.L ⁻¹)	258	124	Ac. Isobutírico (mg.L ⁻¹)	6,7	0,0
DBO (mg.L ⁻¹)	5015	874	Ac. Butírico (mg.L ⁻¹)	0,0	30,8
COT (g.L ⁻¹)	3124	546	Ac. Isovalérico (mg.L ⁻¹)	9,0	0,0
Fenóis totais (mg.L ⁻¹)	1610	1236,6	Ac. Valérico (mg.L ⁻¹)	0,0	0,0
Carboidrato (mg.L ⁻¹)	Total 5880	178,3	Ac. Capróico (mg.L ⁻¹)	10,7	0,0

Obs.: P-Total: fósforo total; PO₄³⁻: fosfato solúvel reativo; DQOt: demanda química de oxigênio total; DQOs: demanda química de oxigênio solúvel; COT: Carbono Orgânico Total; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; NTK: nitrogênio total Kjeldahl; pH: potencial hidrogeniônico; SST: sólidos suspensos totais; SSF: sólidos suspensos fixos e SSV: sólidos suspensos voláteis.

Em todos os demais parâmetros observados, pode-se destacar uma redução significativa na DQO total e solúvel, além da redução no teor de sulfato, proteínas, carboidratos totais, glicerol, fósforo total e etanol, justificado pelo tratamento biológico resultante da digestão anaeróbia realizada em reator UASB na própria usina. Na digestão anaeróbia da vinhaça, sulfato e maior parte da fração de matéria orgânica são removidas, enquanto alguns compostos orgânicos voláteis (ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e fenóis) e nutrientes (potássio, nitrogênio e fósforo) permanecem quase inalterados (Candido e Lombardi, 2017; Del Nery et al., 2018; Siqueira et al., 2022). A biodigestão anaeróbia da vinhaça não reduz a quantidade e nem o potencial de ser usada como fertilizante na lavoura (Siqueira et al., 2022).

Outra característica importante apresentada pela vinhaça biodigerida é a menor concentração de sólidos suspensos, apresentando redução da concentração de sólidos da ordem de 80% para os sólidos suspensos totais (Tabela 3.7). Del Nery

et al. (2018) observaram redução um pouco menor para a concentração de sólidos suspensos totais de 55% no tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB) em escala piloto. Candido e Lombardi (2017) trabalharam com vinhaça *in natura* e biodigerida com concentrações de sólidos suspensos totais de 1593 mg.L⁻¹ e 460 mg.L⁻¹, respectivamente, que são os valores próximos aos observados nas vinhaças deste estudo (concentração de sólidos suspensos totais de 1740 mg.L⁻¹ e 386,7 mg.L⁻¹ para a vinhaça *in natura* e biodigerida, respectivamente, Tabela 3.7). Essa menor concentração de sólidos suspensos na vinhaça biodigerida facilita a penetração da luminosidade no meio, que é um fator crítico para o crescimento das microalgas (Pacheco et al., 2015). A alta concentração de sólidos confere a vinhaça *in natura* uma coloração escura que pode dificultar a penetração de luz e diminuir as taxas de rendimento da atividade microalgal (Candido e Lombardi, 2017; Nur e Buma, 2019).

A partir da análise da Tabela 3.7 depreende-se que há diferenças significativas na comparação entre os dois tipos de vinhaça coletados (*in natura* e biodigerida). Essas diferenças foram importantes para as próximas etapas nas quais foram testadas diferentes diluições (vinhaça:água deionizada – 1 a 80%) e avaliados os modos de utilização dos recursos nutricionais disponíveis em cada tipo de vinhaça no tratamento biológico realizado pelas microalgas Csk, Cvg e Dsp.

3.5.2 Resultados do Experimento II

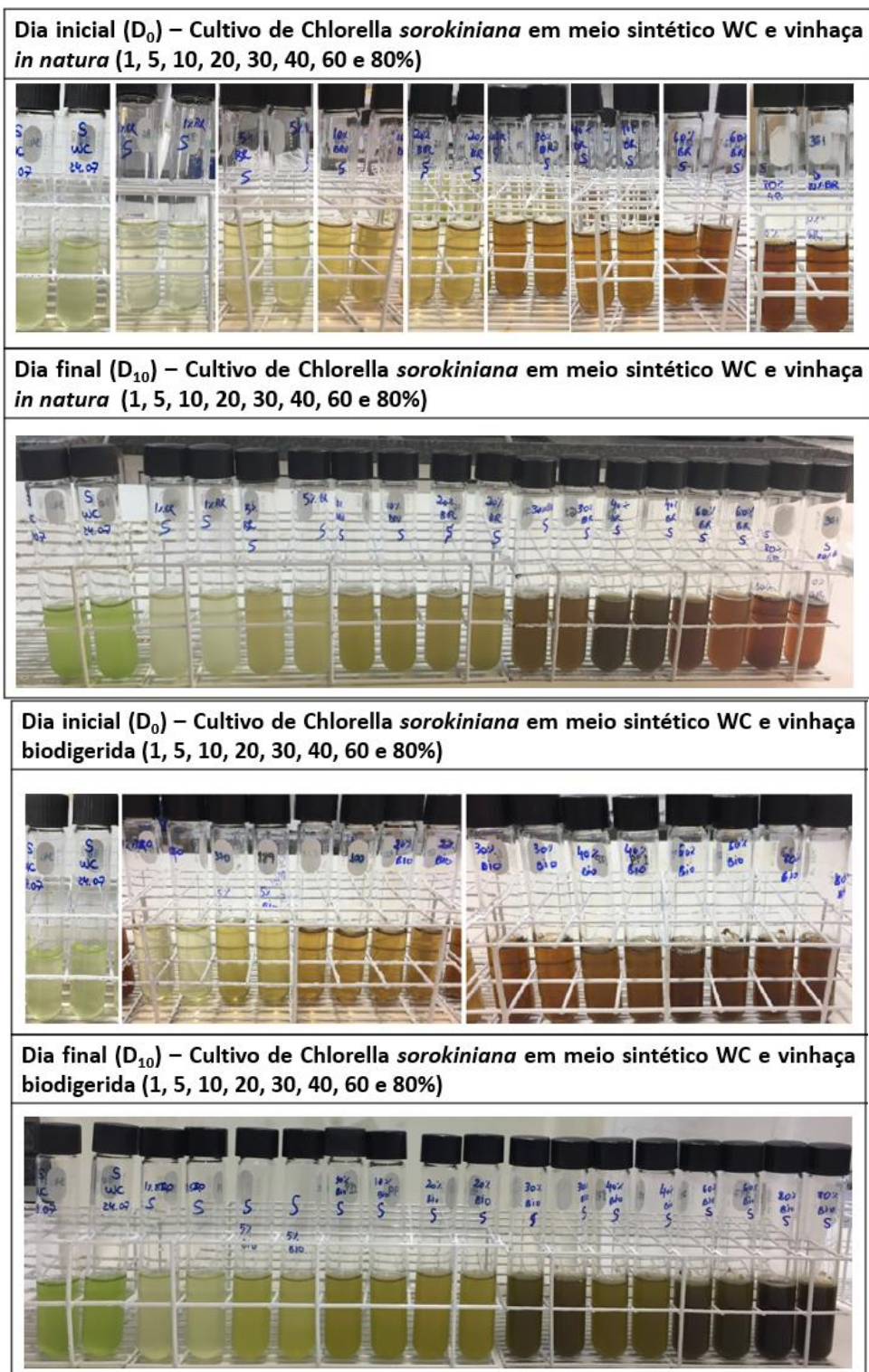
3.5.2.1 Avaliação do crescimento microalgal

As Figuras 3.9 (Csk), 3.10(Cvg) e 3.11(Dsp), retratam as imagens dos cultivos do Experimento II, nos dias iniciais (D₀) e no último dia de cultivo (D₁₀), nas condições testadas. Da análise comparativa das imagens é possível observar diferenças na coloração das culturas, com culturas gradualmente mais verdes no último dia de cultivo (D₁₀), o que visualmente poderia indicar o aumento da concentração da biomassa algal nos cultivos. Entre os dois tipos de vinhaça, verificou-se maior

diferença na coloração dos cultivos em vinhaça biodigerida, apresentando cores mais verdes no décimo dia de experimento, principalmente para as culturas de *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris*, em todas as condições avaliadas.

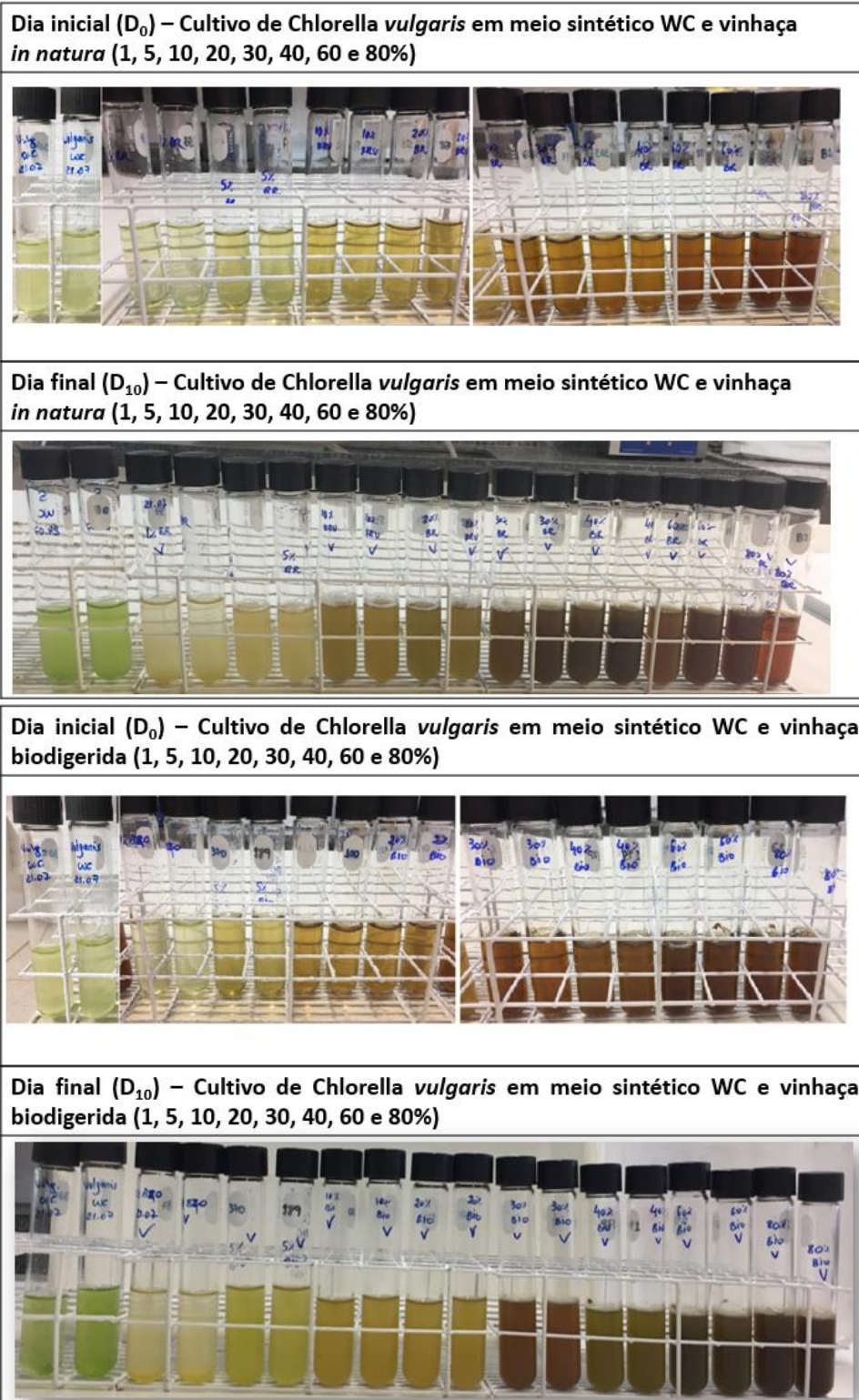
Como pode ser observado nas imagens das Figuras de 3.9 a 3.11, a vinhaça é uma água residuária com aparência e cor escura, principalmente por conta da presença de substâncias húmicas e melanoidinas (Silva et al., 2007; España-Gamboa et al., 2011; Siqueira et al., 2022). Mesmo com estas características, foi possível realizar este experimento, pois na fase inicial de preparo das amostras estas passaram por um pré-tratamento simplificado de decantação por 24 h. Além disso, como foram testadas diferentes diluições da vinhaça em água deionizada isto permitiu maior clarificação de todas as amostras, facilitando a penetração da luminosidade no meio de cultura e proporcionando o crescimento microalgal pela fotossíntese.

Figura 3.9- Crescimento algal de *Chlorella sorokiniana* (Csk) para o dia inicial (D₀) e dia final (décimo dia - D₁₀) para os cultivos em meio sintético WC e em diferentes diluições em vinhaça *in natura* e biodigerida



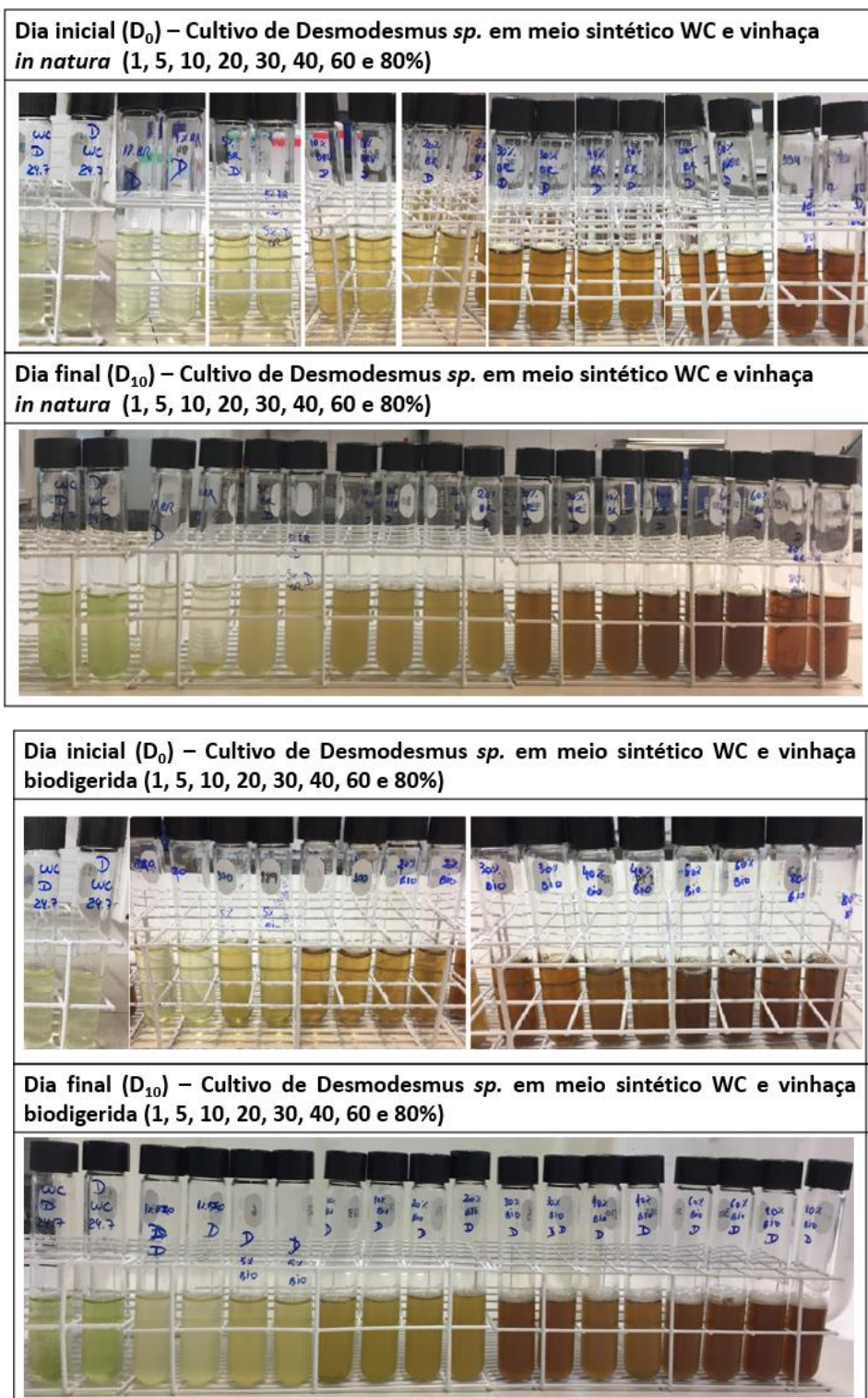
Fonte: autoria própria.

Figura 3.10- Crescimento algal de *Chlorella vulgaris* (Cvg) para o dia inicial (D₀) e dia final (décimo dia - D₁₀) para os cultivos em meio sintético WC e em diferentes diluições em vinhaça *in natura* e biodigerida



Fonte: autoria própria.

Figura 3.11- Crescimento algal de *Desmodesmus sp.* (Dsp) para o dia inicial (D₀) e dia final (décimo dia - D₁₀) para os cultivos em meio sintético WC e em diferentes diluições em vinhaça *in natura* e biodigerida

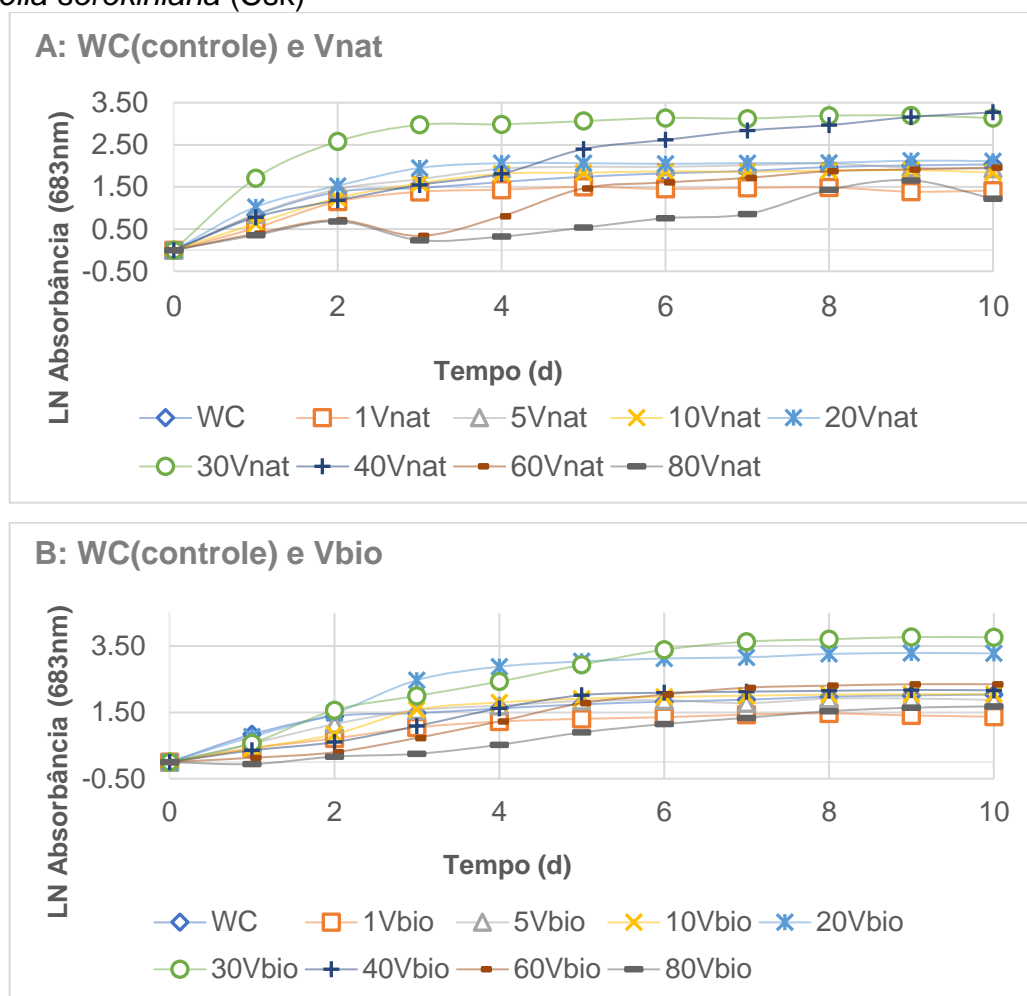


Fonte: autoria própria.

3.5.2.2 Análise das curvas de crescimento microalgal

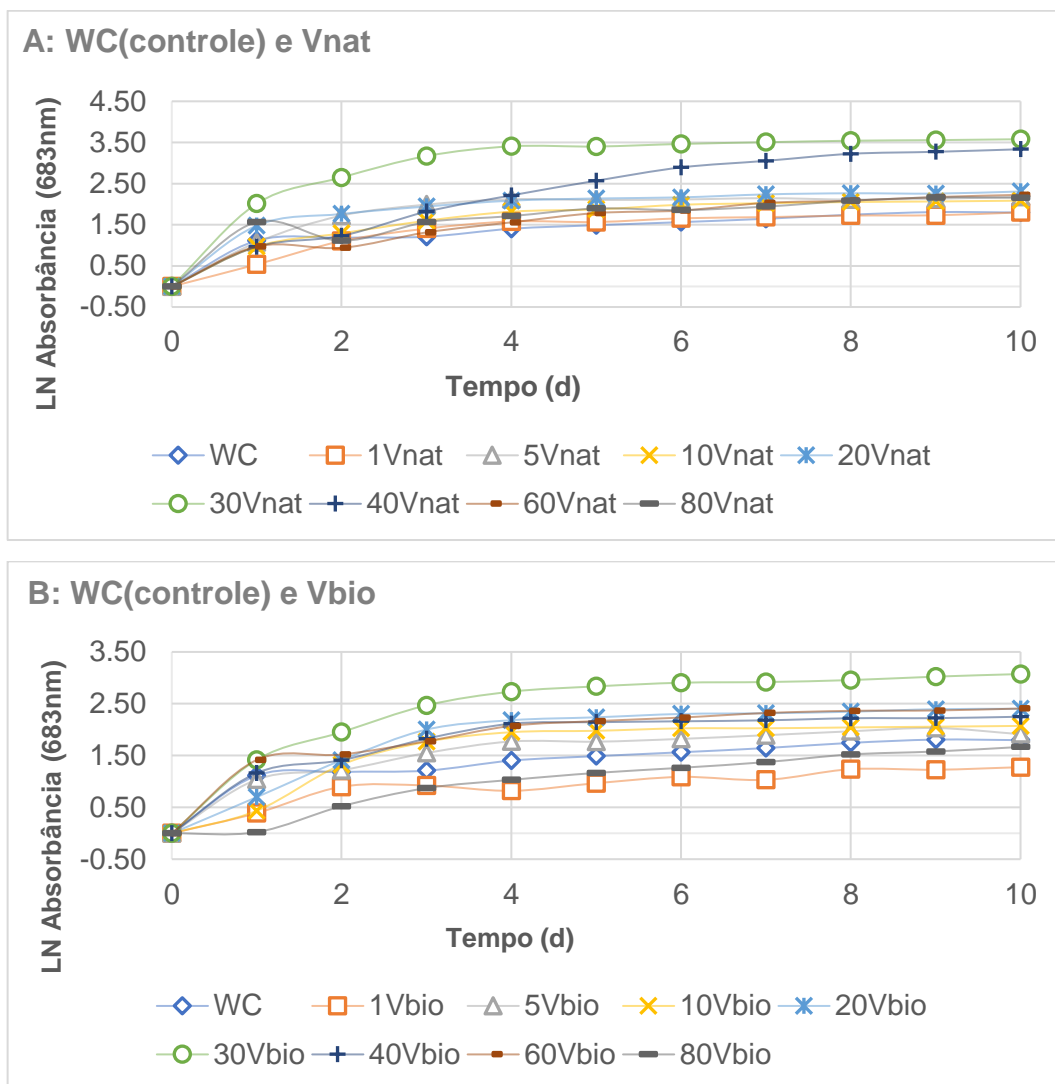
Pelo fato da análise visual das imagens das Figuras 3.9 a 3.11 serem apenas ilustrativas, foram confeccionados gráficos com as curvas de crescimento de cada condição para *Chlorella sorokiniana* (Figura 3.12), *Chlorella vulgaris* (Figura 3.13) e *Desmodesmus sp.* (Figura 3.14) a partir da absorbância ($\lambda_1=683\text{nm}$), e calculados os principais parâmetros cinéticos sob as diferentes diluições testadas em vinhaça Vnat e Vbio.

Figura 3.12- Curvas de crescimento linearizadas da absorbância ($\lambda=683\text{nm}$) nas condições controle com meio sintético (WC) e nas diluições de 1 a 80 por cento de diluição de A: vinhaça *in natura* (Vnat) e B: biodigerida (Vbio) para a cepa de microalga *Chlorella sorokiniana* (Csk)



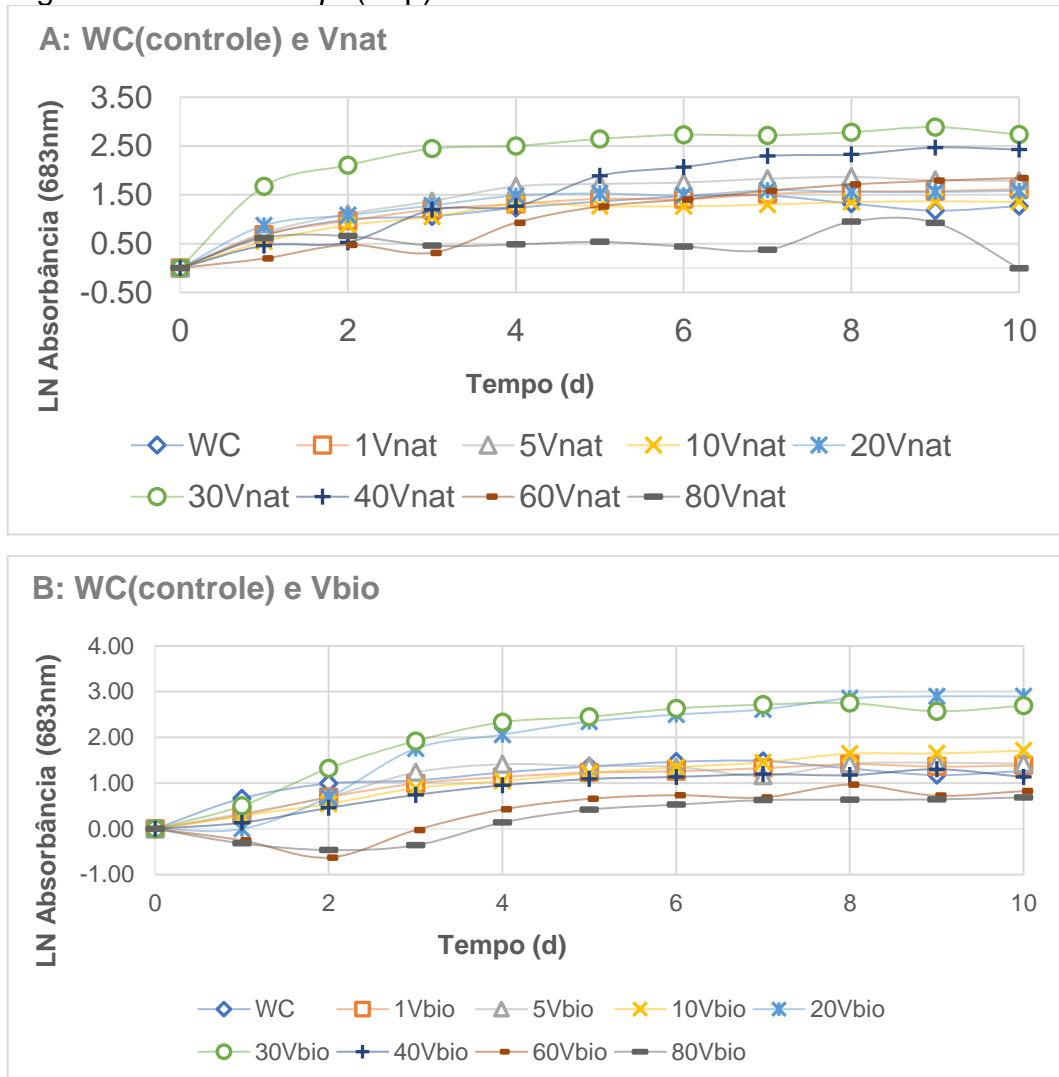
Fonte: autoria própria.

Figura 3.13- Curvas de crescimento linearizadas da absorbância (A.U. $\lambda=683\text{nm}$) nas condições controle com meio sintético (WC) e nas diluições de 1 a 80 por cento de diluição de A: vinhaça *in natura*(Vnat) e B: biodigerida(Vbio) para a cepa de microalga *Chlorella vulgaris* (Cvg)



Fonte: autoria própria.

Figura 3.14 - Curvas de crescimento linearizadas da absorbância (A.U. $\lambda=683\text{nm}$) nas condições controle com meio sintético (WC) e nas diluições de 1 a 80 por cento de diluição de A: vinhaça *in natura* (Vnat) e B: vinhaça biodigerida (Vbio) para a cepa de microalga *Desmodesmus sp.* (Dsp)



Fonte: autoria própria.

Pela análise dos gráficos exibidos nas Figuras 3.12; 3.13 e 3.14, conclui-se que nas diluições de vinhaça *in natura* (Vnat) de 30% (30Vnat) e 40% (40Vnat), foram as melhores condições de crescimento encontradas para as três cepas Csk, Cvg e Dsp. Porém, para os cultivos em vinhaça biodigerida (Vbio), os melhores resultados tanto para Csk quanto para Dsp, foram nas diluições de vinhaça 20% (20Vbio) e 30% (30Vbio). No entanto, para Cvg, houve adaptação em distintas concentrações, sendo os resultados com maior destaque as diluições de vinhaça 20% (20Vbio), 30% (30Vbio), 40% (40Vbio) e 60% (60Vbio). Candido e Lombardi (2017) observaram que

para o crescimento da *Chlorella Vulgaris* as melhores diluições foram de 40% e 50 % para a vinhaça *in natura* filtrada, de 10% e 20% para a vinhaça *in natura* centrifugada, de 80% e 100% para a vinhaça biodigerida filtrada e de 10% e 20% para a vinhaça biodigerida centrifugada. Esses valores estão próximos aos observados por este trabalho mesmo Candido e Lombardi (2017) terem aplicado diferentes pré-tratamentos na vinhaça *in natura* e biodigerida.

Ao analisar as curvas de crescimento no meio controle WC constatou-se, para todas as três cepas do estudo (Csk, Cvg e Dsp), que o desempenho encontrado em WC foi inferior quando comparado às curvas de crescimento obtidas em vinhaça *in natura* e biodigerida (Figuras 3.12; 3.13 e 3.14). Portanto, pode-se afirmar que a presença da matéria orgânica e dos nutrientes na vinhaça *in natura* (Vnat) e na biodigerida (Vbio) favoreceram o crescimento das microalgas estudadas quando comparado a condição controle do meio sintético WC. Todavia, Candido e Lombardi (2017) observaram que o controle usando o meio BG-11 foi o que apresentou o melhor crescimento em relação ao uso da vinhaça *in natura* e biodigerida pré-tratada por filtração e centrifugação. Isto pode ser explicado pela elevada concentração de nitrato (NO_3^-) que o meio BG-11 tem e que favorece a produção de biomassa microalgal, como já foi discutido no item 2.4 deste trabalho (Saadi, 2018; Purkayastha et al., 2017; Colusse et al., 2019).

3.5.2.3 Taxa de crescimento

Os resultados de taxas de crescimento foram descritos na Tabela 3.8. Avaliou-se a taxa de crescimento (μ) de cada cepa nas condições WC, Vnat e Vbio, com aplicação de teste de normalidade seguido de análise da variância (ANOVA e teste t (LSD) ($p < 0,05$)), para verificar a existência de diferença estatística significativa entre os resultados obtidos. As diferenças estatísticas foram apresentadas na Tabela 3.8.

Tabela 3.8- Taxas específicas médias de crescimento (μ , dia⁻¹) na condição controle em meio sintético WC e nas condições percentuais de diluição (1 a 80%) em vinhaça *in natura* (Vnat) e vinhaça biodigerida (Vbio) para Csk, Cvg e Dsp

Condição	Taxa de crescimento (μ , dia ⁻¹)					
	Alga	Csk		Cvg		Dsp
Meio WC (controle)		0,69		0,98 ^a		0,50 ^a
(percentual %)	Vnat	Vbio	Vnat	Vbio	Vnat	Vbio
1	0,44	0,31	0,36 ^b	0,43	0,26	0,30
5	0,47	0,50	0,40	0,25	0,40	0,41
10	0,46	0,48	0,31 ^b	0,52	0,31	0,20
20	0,60	1,35 ^{e,i,k}	0,26 ^b	1,47 ^{c,j}	0,32	1,84 ^{g,k}
30	1,02 ^{d,h,i}	0,56	0,58 ^{b,h}	0,51	0,61 ^{f,i}	0,58
40	0,42	0,41	0,38	0,38	0,33	0,25
60	0,23	0,36	0,21 ^b	0,22	0,24	0,40
80	0,11	0,21	0,22 ^b	0,39	0,11	0,38

Letras iguais nas linhas indicam diferenças estatísticas (ANOVA e teste t (LSD) ($p < 0,05$)).

Letras iguais nas colunas indicam diferenças estatísticas entre as condições testadas ($p < 0,05$).

Nos cultivos em WC foram observadas maiores taxas de crescimento (μ) para *Chlorella vulgaris* (0,98 dia⁻¹), seguida de *Chlorella sorokiniana* (0,69 dia⁻¹) e *Desmodesmus sp.* (0,50 dia⁻¹) (Tabela 3.8). Feito a análise estatística, pode-se concluir que houve diferença significativa apenas entre as cepas Cvg e Dsp. Candido e Lombardi (2020) obtiveram taxas de crescimento para *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus spinosus* quando cultivadas em meio sintético BG-11 de 1,5 dia⁻¹, 1,2 dia⁻¹ e 1,23 dia⁻¹, respectivamente. Estes valores foram superiores devido às diferentes condições de cultivo e escolha do meio sintético.

Na comparação entre os cultivos em meios sintéticos WC e os cultivos em vinhaça *in natura* e biodigerida foi possível verificar que as cepas testadas (Cvg, Csk e Dsp) apresentaram pelo menos uma taxa de crescimento com resultados maiores quando comparado ao cultivo em meios sintéticos controle (WC). De fato, esta afirmação pode ser confirmada para os resultados de Cvg na condição 20Vbio (1,47 dia⁻¹), Csk nas condições 30Vnat (1,02 dia⁻¹) e 20Vbio (1,35 dia⁻¹) e para Dsp nas condições 30Vnat (0,61 dia⁻¹) e 20Vbio (1,84 dia⁻¹), como pode ser observado na Tabela 3.8. O melhor crescimento obtido tanto em vinhaça *in natura* quanto em biodigerida, quando comparada ao meio sintético sugere que todas as culturas não estavam limitadas por nutrientes no intervalo entre 20 e 30% de diluição.

Por outro lado, observou-se que no intervalo entre 1 e 10% de diluição da vinhaça *in natura* e biodigerida, a taxa de crescimento para as três cepas foi menor do que nos ensaios com o meio sintético WC, e isto pode estar relacionado a menores concentrações de nutrientes disponíveis no meio (Candido e Lombardi, 2020). Já para o intervalo entre 40 e 80% de diluição de vinhaça *in natura* e biodigerida, as microalgas não conseguiram obter taxas de crescimentos maiores do que a observada no meio WC, fato que pode ser justificado pela dificuldade imposta pelas características da vinhaça como, elevada osmolaridade, toxicidade, turbidez, excesso de nutrientes e contaminação (Candido e Lombardi, 2018).

3.5.2.3.1 Comparação das taxas de crescimento obtidas para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) nas condições 30Vnat e 20Vbio

Na comparação de todos os resultados de taxa de crescimento para as três cepas em vinhaça *in natura* (Vnat) observou-se que 30Vnat foi a melhor condição para Cvg ($0,58 \text{ dia}^{-1}$), Csk ($1,02 \text{ dia}^{-1}$) e Dsp ($0,61 \text{ dia}^{-1}$). Por este fato optou-se por definir qual microalga obteve melhor desempenho na condição 30Vnat. E, por meio da aplicação do tratamento estatístico (ANOVA e teste t (LSD) ($p < 0,05$)) obteve-se diferenças estatisticamente significativas somente entre Cvg e Csk e entre as cepas Csk e Dsp, o que resultou na confirmação da cepa *Chlorella sorokiniana* ($1,02 \text{ dia}^{-1}$) na condição 30Vnat como o melhor resultado de taxa de crescimento dentre as 3 cepas estudadas.

Para a vinhaça biodigerida (Vbio) a condição 20Vbio foi a mais adequada para as três cepas que apresentaram taxas de crescimento de $1,47 \text{ dia}^{-1}$ (Cvg), $1,35 \text{ dia}^{-1}$ (Csk) e $1,84 \text{ dia}^{-1}$ (Dsp). A partir destes resultados foi possível aplicar estatística e comparar as 3 cepas nesta condição (20Vbio) e verificar qual obteve o melhor resultado baseado no tratamento estatístico (ANOVA e teste t (LSD) ($p < 0,05$)). Esta análise indicou que houve diferenças estatisticamente significativas somente entre Cvg e Csk e entre as cepas Csk e Dsp.. A partir desta análise constatou-se que a cepa *Desmodesmus sp.* foi a cepa que obteve melhor resultado de taxa de crescimento

1,84 dia⁻¹, dentre as cepas testadas na condição 20Vbio que foi considerada a melhor condição de todo o experimento com vinhaça biodigerida.

Ao analisar os gráficos das Figuras 3.12 (Csk), 3.13 (Cvg) e 3.14 (Dsp) (seção 3.5.2.2), estes corroboram com os resultados encontrados para as taxas de crescimento (Tabela 3.8) e pode-se concluir que 30Vnat e 20Vbio foram as condições mais benéficas ao crescimento das três cepas de microalgas estudadas. As melhores taxas de crescimento foram obtidas para as cepas *Chlorella sorokiniana* em 30Vnat (1,02 dia⁻¹) e *Desmodesmus* sp. na condição 20Vbio (1,84 dia⁻¹).

Na literatura pode-se encontrar valores de taxas de crescimento próximas aos observados neste trabalho para a vinhaça *in natura* e biodigerida, como pode ser observado na Tabela 3.9.

Tabela 3.9- Comparação das taxas de crescimento específicas (μ , dia⁻¹) obtidas na literatura e neste trabalho usando vinhaça *in natura* (Vnat) e vinhaça biodigerida (Vbio) para o cultivo das microalgas Csk, Cvg e Dsp

Microalga	Características do tratamento com vinhaça	Taxas de crescimento específica	Referências
<i>Chlorella sorokiniana</i>	15% de vinhaça <i>in natura</i> centrifugada	1,54 dia ⁻¹	Candido e Lombardi (2020)
	30% de diluição vinhaça <i>in natura</i>	1,02 dia ⁻¹	Neste trabalho
<i>Chlorella vulgaris</i>	20% de vinhaça <i>in natura</i> centrifugada	1,4 dia ⁻¹	Candido e Lombardi (2020)
	30% de diluição vinhaça <i>in natura</i>	0,58 dia ⁻¹	Neste trabalho
	60% de vinhaça <i>in natura</i> (filtração com argila esmectita e carvão ativado)	1,6 dia ⁻¹	Candido e Lombardi (2018)
	80% de vinhaça biodigerida centrifugada (filtração com argila esmectita e carvão ativado)	1,5 dia ⁻¹	Candido e Lombardi (2018)
	20% de vinhaça biodigerida	1,47 dia ⁻¹	Neste trabalho
<i>Desmodesmus sp</i>	20% de vinhaça <i>in natura</i> centrifugada	0,8 dia ⁻¹	Candido (2019)
	30% de diluição vinhaça <i>in natura</i>	0,61 dia ⁻¹	Neste trabalho

3.5.2.4 Rendimento de biomassa

Os resultados de rendimento de biomassa das três cepas cultivadas na condição controle (WC), em vinhaça *in natura* (Vnat) e em vinhaça biodigerida (Vbio) foram apresentados na Tabela 3.10. Aplicou-se o teste de normalidade seguido de análise da variância (ANOVA e teste t (LSD) ($p < 0,05$)), para verificar a existência de diferença estatística significativa, sendo estas também apresentadas na Tabela 3.10..

Tabela 3.10- Rendimento de biomassa pela absorvância a 683nm das três cepas (Csk, Cvg e Dsp) nas condições controle com meio sintético (WC) e nas diluições de 1 a 80% de vinhaça *in natura* (Vnat) e biodigerida (Vbio)

Condição	Rendimento de biomassa ($\lambda_1 = 683\text{nm}$)						
	Alga	Csk		Cvg		Dsp	
Meio WC (controle)		0,666 ^{a,c}		0,504 ^{a,b}		0,256 ^{b,c}	
(percentual %)	Vnat	Vbio	Vnat	Vbio	Vnat	Vbio	
1	0,367	0,413	0,495	0,341	0,423	0,399	
5	0,576	0,919	0,597	0,812	0,507	0,463	
10	0,853	1,294	0,924	1,253	0,509	0,791 ^l	
20	0,835	1,199	0,716	1,255	0,580	0,695 ^k	
30	1,130	2,212 ^g	1,465	0,902	0,742	0,454	
40	2,366 ^{f,l}	1,902 ^{g,h}	2,469 ^{d,l}	1,573 ^e	0,888 ^{i,l}	0,452	
60	0,741	2,196 ^h	0,878	1,627	0,745	0,271	
80	0,239	1,604	0,647	1,713 ^e	0,041	0,242	

Meios de cultura: WC: meio sintético; Vnat: vinhaça *in natura*; Vbio: vinhaça biodigerida;

Microalgas: Csk: *Chlorella sorokiniana*; Cvg: *Chlorella vulgaris*; Dsp: *Desmodesmus sp.*

Rendimento de biomassa é adimensional.

Letras iguais nas linhas indicam diferenças estatísticas (ANOVA e teste t (LSD) ($p < 0,05$)).

Letras iguais nas colunas indicam diferenças estatísticas entre as condições testadas ($p < 0,05$).

A condição controle (WC) foi avaliada nas três cepas estudadas e foram encontrados rendimentos de biomassa ($\lambda_1 = 683\text{ nm}$) de 0,666 para Csk, 0,504 para Cvg e 0,256 para Dsp (Tabela 3.10). Houve diferença estatisticamente significativa entre as três cepas e *Chlorella sorokiniana* (Csk) foi a cepa que apresentou maior rendimento de biomassa (0,666) quando cultivada na condição controle (meio sintético WC).

Na comparação entre os cultivos em meio sintético (WC) e os dois tipos de vinhaça (Vnat e Vbio), foi possível concluir para as três cepas Cvg, Csk e Dsp que os

resultados de rendimento de biomassa em Vnat e Vbio foram superiores aos obtidos nos cultivos controle em meio sintético WC (Tabela 3.10). Esse resultado é importante pois permite que a vinhaça possa vir a substituir meios sintéticos de cultivo, resultando em um benefício econômico e ambiental para aplicações biotecnológicas relacionadas com o cultivo de microalgas.

Observou-se baixo rendimento de biomassa para Dsp quando comparada às demais cepas nesta condição, o que pode ser indicativo que esta cultura não se desenvolveu adequadamente em WC durante este experimento, mesmo tendo sua biomassa inicialmente padronizada por meio das leituras iniciais de absorbância ($\lambda=750$ nm), procedimento realizado para as três cepas do estudo.

Para *Chlorella sorokiniana* (Csk), *Chlorella vulgaris* (Cvg), *Desmodesmus sp.* (Dsp) em vinhaça *in natura* (Vnat), pode-se observar que o melhor resultado foi obtido em 40% de diluição (40Vnat) apresentando os valores de 2,366; 2,469 e 0,888, respectivamente (Tabela 3.10). Análises estatísticas comprovaram diferenças significativas entre estes resultados e as demais condições testadas. A partir da análise estatística (ANOVA e teste t (LSD) ($p<0,05$)) conclui-se que houve diferença estatisticamente significativa entre todas as cepas (Cvg, Csk e Dsp), sendo possível inferir que a cepa *Chlorella vulgaris* obteve o melhor rendimento de biomassa na comparação com as demais cepas na condição testada de vinhaça *in natura* 40Vnat

Nas condições de cultivo em vinhaça biodigerida (Vbio) a cepa Csk teve os melhores resultados com diluições de 30% (30Vbio), 40% (40Vbio) e 60% (60Vbio), apresentando os valores de 2,212; 1,902 e 2,196, respectivamente (Tabela 3.10). Inferiu-se que houve diferença estatística significativa entre 40Vbio e 30Vbio e entre 40Vbio e 60Vbio; porém, não houve diferença estatística significativa entre 30Vbio e 60Vbio. Sendo assim, então considerado os melhores resultados encontrados nestas condições (30Vbio e 60Vbio).

Para *Chlorella vulgaris* (Cvg), nas condições de cultivo em vinhaça biodigerida (Vbio) apresentou os maiores resultados de biomassa quando foram cultivadas em diluições de 40% (40Vbio), 60% (60Vbio) e 80% (80Vbio) apresentando os valores de 1,573; 1,627 e 1,713, respectivamente (Tabela 3.10). Verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre 40Vbio e 80Vbio, com vantagem para a condição de 80Vbio. Na comparação entre as condições 60Vbio e 80Vbio, não houve diferença estatística, não podendo distinguir qual obteve o melhor rendimento, sendo estas

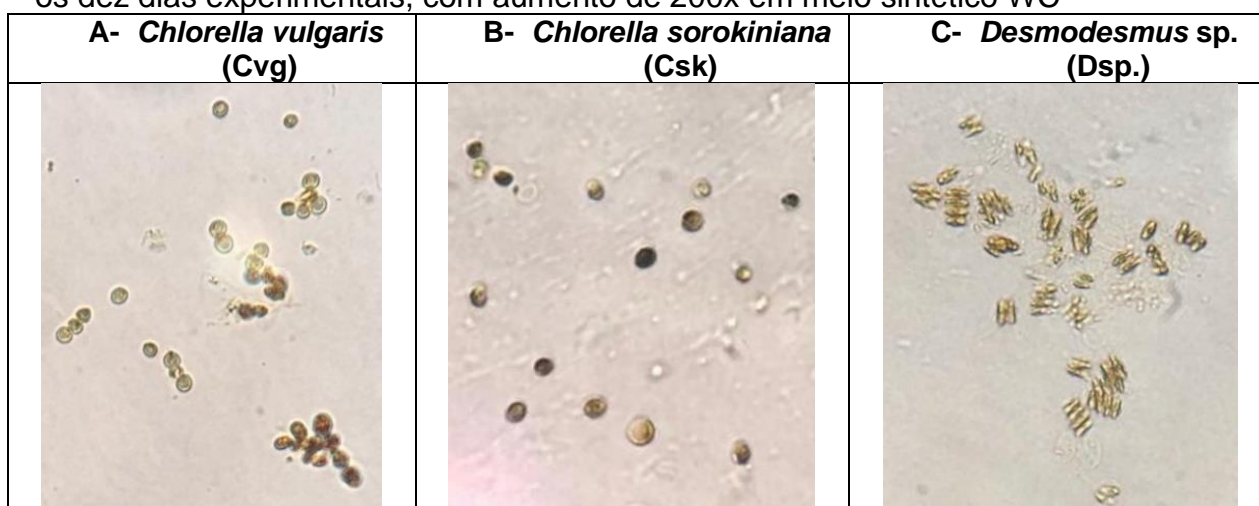
(60Vbio e 80Vbio) consideradas as melhores condições de cultivo da Cvg em vinhaça biodigerida.

Para os testes realizados em vinhaça biodigerida (Vbio), *Desmodesmus sp.* obteve os melhores resultados em condições com menores diluições, quando comparada às cepas Cvg e Csk. Os melhores resultados de Dsp foram obtidas em diluições de 10% (10Vbio) e 20% (20Vbio), com valores de 0,791 e 0,695, respectivamente (Tabela 3.10). Todavia, não houve diferença estatística significativa entre os resultados de rendimento de biomassa observados em 10Vbio e 20Vbio, sendo então os dois indicados como os melhores resultados.

3.5.2.5 Análise das imagens microscópicas ao final do período experimental

Ao final dos experimentos (décimo dia), todas as condições foram avaliadas por imagens microscópicas. Devido à quantidade elevada de condições que foram testadas e por grande parte não terem apresentado crescimento algal, optou-se por apresentar somente os resultados com a presença de microalgas, apresentados nas Figuras de 3.15 a 3.20. Na Figura 3.15 foram exibidas as microalgas Cvg, Csk e Dsp., nos cultivos controle axênicos, em meio sintético WC. Após o período experimental de dez dias, estas se encontravam na fase estacionária de crescimento.

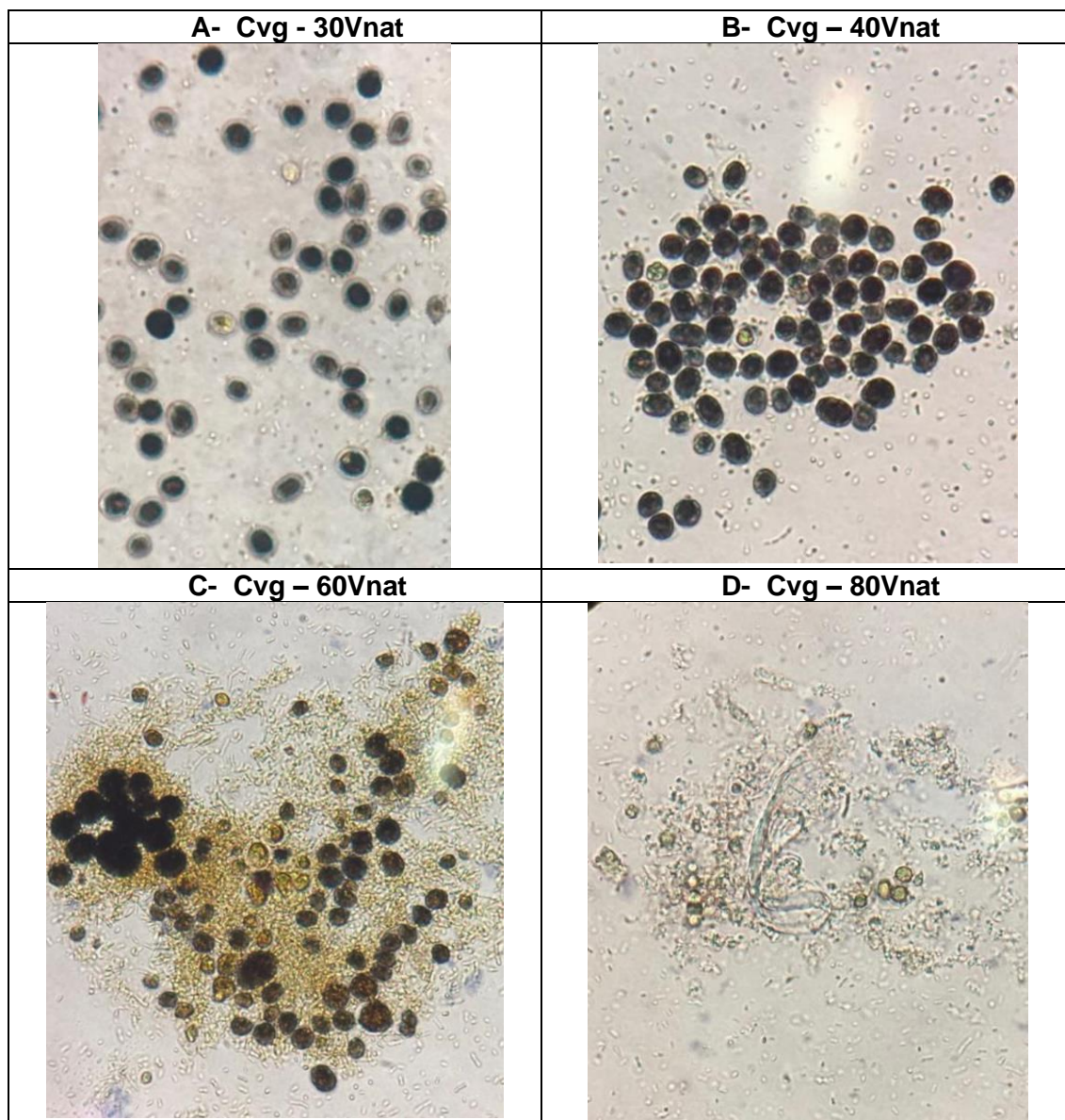
Figura 3.15- Imagens microscópicas das microalgas (A) Cvg, (B) Csk e (C) Dsp., após os dez dias experimentais, com aumento de 200x em meio sintético WC



Fonte: autoria própria.

Nas Figuras 3.16 e 3.17 foram apresentadas as imagens microscópicas da microalga *Chlorella vulgaris* (Cvg) em vinhaça *in natura* e biodigerida, respectivamente, ao final do período experimental de 10 dias.

Figura 3.16 - Imagens microscópicas da microalga *Chlorella vulgaris* (Cvg) em vinhaça *in natura* (Vnat) nas condições (A) 30Vnat, (B) 40Vnat, (C) 60Vnat e (D) 80Vnat, após dez dias experimentais, com aumento de 200x



Fonte: autoria própria.

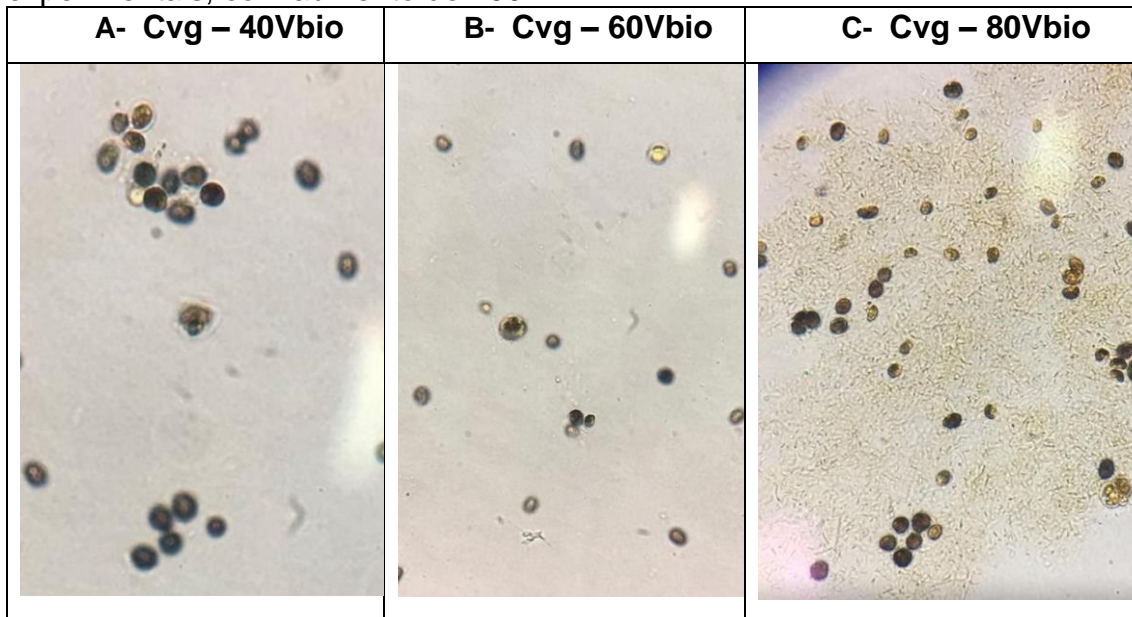
Para Cvg em vinhaça *in natura* (Vnat) (Figura 3.16), observou-se a presença expressiva desta alga nas concentrações 30Vnat, 40Vnat e 60Vnat. Por se tratar de cultivo não axênico, ocorreu a presença de diferentes microrganismos, que não foram

propriamente identificados, mas visualmente detectados nas imagens. Nesse sentido, observou-se uma relação entre as maiores concentrações destes microrganismos nas maiores concentrações de diluição testadas em vinhaça *in natura*.

Pode-se visualizar pela imagem na Figura 3.16-C elevada concentração de contaminantes na condição 60Vnat, que ainda apresentava uma concentração expressiva da microalga Cvg. O mesmo não ocorreu na condição 80Vnat em que quase não foram observadas microalgas e sim a presença expressiva de diferentes microrganismos não identificados. Por fim, pode-se concluir que as melhores condições para Cvg em vinhaça *in natura* foram 30Vnat, 40Vnat e 60Vnat.

A vinhaça bruta em altas concentrações não é considerada um bom meio de cultivo para microalgas devido a algumas características presentes neste resíduo que podem prejudicar o crescimento algal (Candido e Lombardi, 2017). Dentre estas características estão a sua elevada turbidez e coloração escura que reduzem a passagem de luz e interferem na fotossíntese (Silva et al., 2007). Além disso, a alta concentração de nutrientes minerais na vinhaça implica em problemas osmóticos e dificulta a sobrevivência e a reprodução algal (Algur e Kadioglu, 1992). Outro fator se relaciona à composição complexa deste resíduo pode envolver substâncias tóxicas às células algais como as melanoidinas (Robles-González et al., 2012).

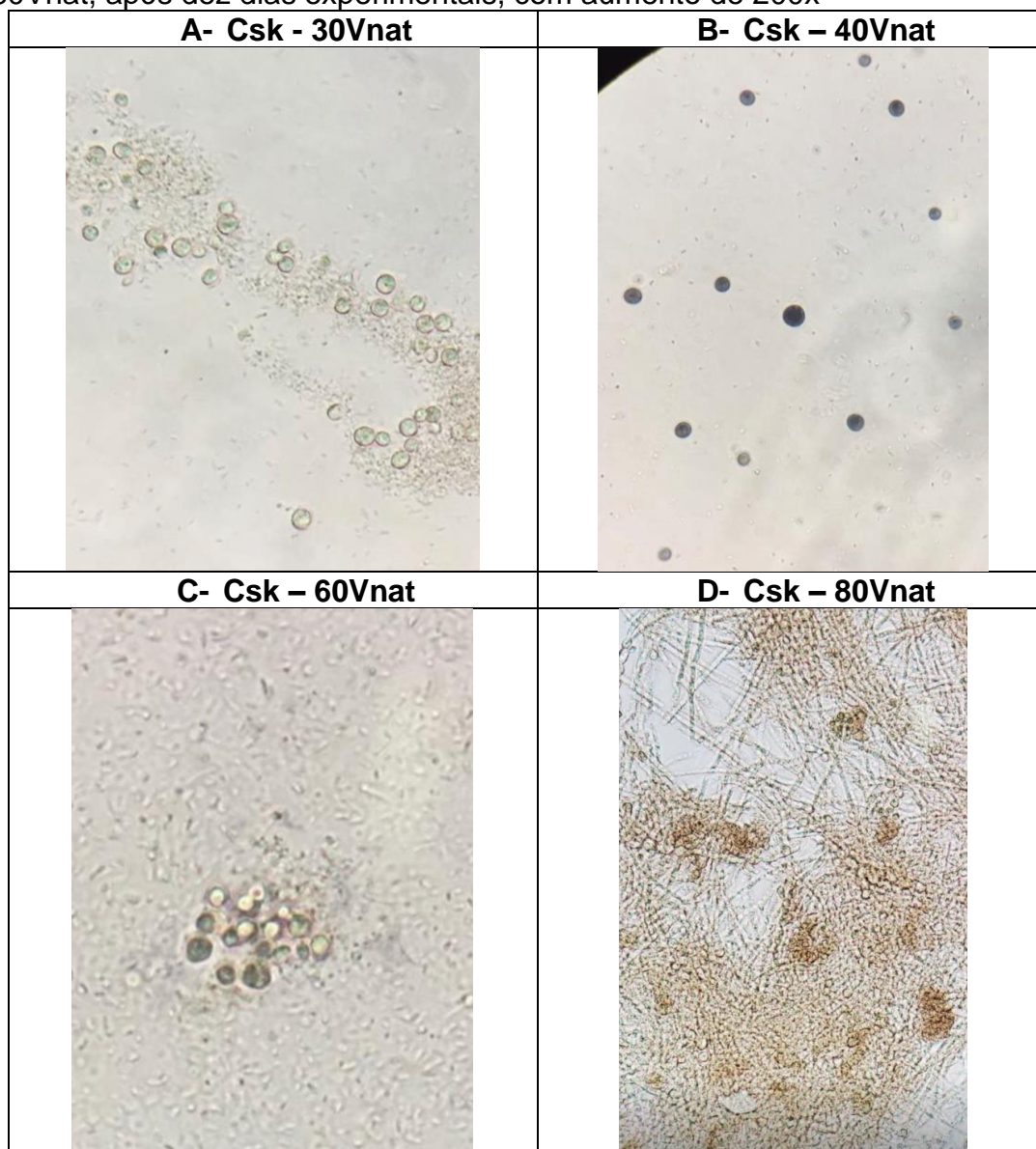
Figura 3.17- Imagens microscópicas da microalga *Chlorella vulgaris* (Cvg) em vinhaça *biodigerida* nas condições: (A) 40Vbio; (B) 60Vbio e (C) 80Vbio, após dez dias experimentais, com aumento de 200x



Fonte: autoria própria.

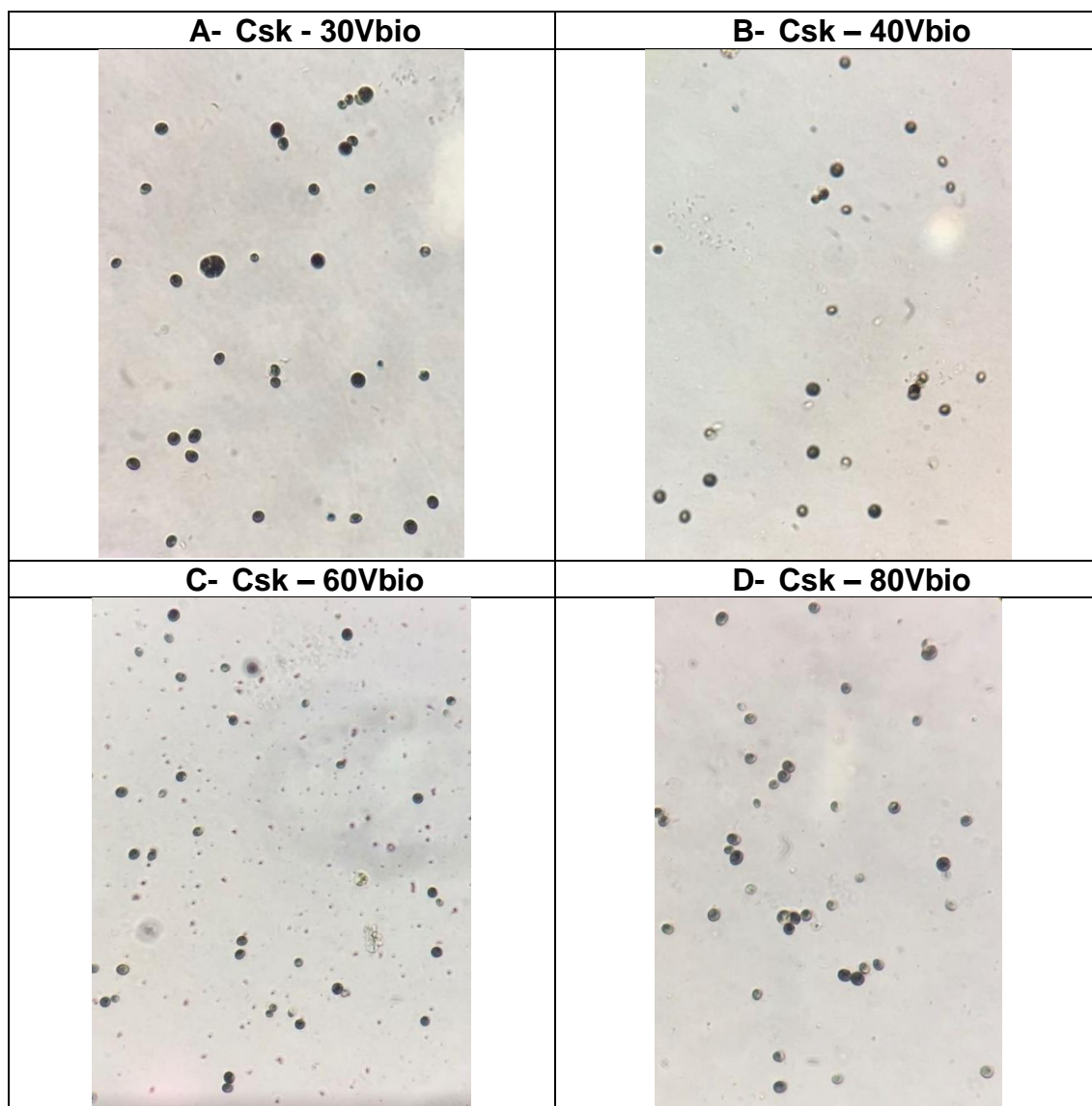
Para Cvg em vinhaça biodigerida (Figura 3.17), foram detectadas como melhores condições desta microalga em 40Vbio, 60Vbio e 80Vbio. Nesta última condição observou-se a presença expressiva de outros microrganismos que não foram identificados. Por se tratar de cultivo não axênico, era esperado a presença de outros microrganismos e pode-se observar que mesmo em consórcio e em condições tão elevadas de diluição (80Vbio), foi possível atestar a presença de Cvg ao final do experimento.

Figura 3.18 - imagens microscópicas da microalga *Chlorella sorokiniana* (Csk) em vinhaça *in natura* (Vnat) nas condições: (A) 30Vnat, (B) 40Vnat, (C) 60Vnat e (D) 80Vnat, após dez dias experimentais, com aumento de 200x



Fonte: autoria própria.

Figura 3.19- imagens microscópicas da microalga *Chlorella sorokiniana* (Csk) em vinhaça *biodigerida* (Vbio) nas condições: (A) 30Vbio, (B) 40Vbio, (C) 60Vbio e (D) 80Vbio, após dez dias experimentais, com aumento de 200x



Fonte: autoria própria.

Nas Figuras 3.18 e 3.19 foram apresentadas as melhores condições observadas para a microalga *Chlorella sorokiniana* (Csk) em vinhaça *in natura* (Vnat) e vinhaça biodigerida (Vbio), para o período experimental de 10 dias.

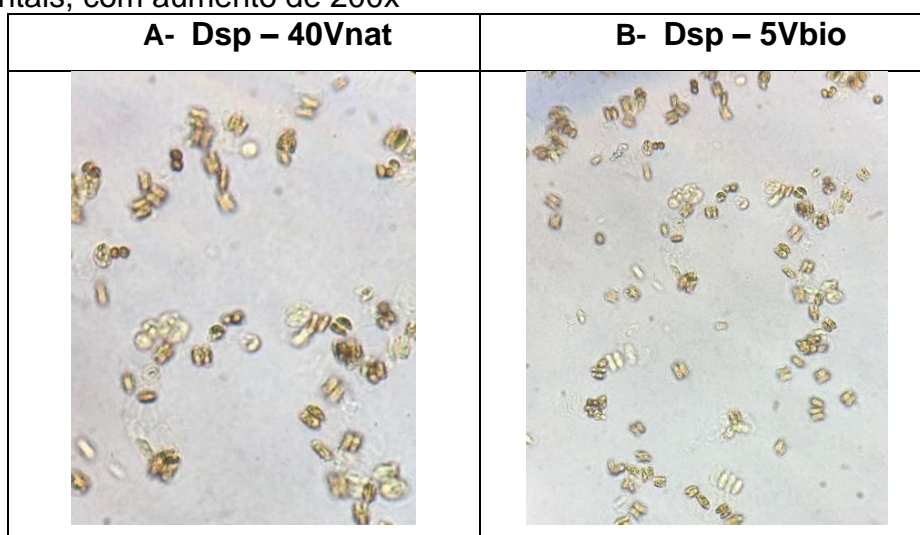
Para Csk em vinhaça *in natura* (Figura 3.18), observou-se que as condições 30Vnat, 40Vnat e 60Vnat apresentaram uma concentração mínima de microalgas, na fase estacionária que se encontravam ao final do experimento. Para a condição 80Vnat foi possível observar pela imagem o crescimento expressivo de fungos filamentosos que sobressaíram ao crescimento microalgal de Csk nesta condição.

Salienta-se que era previsto esta interação entre microalgas e microrganismos presentes na vinhaça, devido a condição experimental do cultivo ser não axênico.

Para Csk em vinhaça biodigerida (Figura 3.19). observou-se que nas condições 30Vbio, 40Vbio, 60Vbio e 80Vbio, esta microalga obteve os melhores desempenhos. Mesmo na condição mais extrema (80Vbio), Csk conseguiu sobressair quando comparada às demais algas nesta condição.

Para a cepa *Desmodesmus sp.*, somente foi possível o registro das imagens nas condições 40Vnat e 5Vbio (Figura 3.20), além da condição controle exibida na Figura 3.15. Para esta cepa observou-se a dificuldade adaptativa e de crescimento tanto em vinhaça *in natura* quanto em biodigerida.

Figura 3.20 - Imagens microscópicas da microalga *Desmodesmus sp.* (Dsp) em (A) vinhaça *in natura* (40Vnat) e em (B) vinhaça *biodigerida* (5Vbio), após dez dias experimentais, com aumento de 200x



Fonte: autoria própria.

3.5.2.6 Avaliação comparativa entre os resultados de clorofila a e sólidos

As concentrações finais de clorofila a e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram apresentadas na Tabela 3.11 para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) nos meios de cultivos WC, vinhaça *in natura* e vinhaça biodigerida. Esta análise foi importante para a avaliação da produção de clorofila a nas condições testadas ao final do

experimento e também foi usada como estratégia para identificar a presença de microalgas ao final dos cultivos testados devido a outros microrganismos não fotossintetizantes participarem em consórcio, durante o período experimental, pelo fato do cultivo em vinhaça ter ocorrido de modo não-axênico, como pode ser observado nas Figuras 3.15 a 3.20.

Tabela 3.11- Concentrações finais de clorofila *a* e sólidos suspensos voláteis (SSV) ao final do experimento para todas as condições testadas.

Condição	Clorofila <i>a</i> (mg.L ⁻¹)			SSV (mg.L ⁻¹)		
	Cvg	Csk	Dsp	Cvg	Csk	Dsp
WC controle	8,23	6,16	2,60	325,0	175,0	180,0
1Vnat	0,12	0,53	0,12	120,0	120,0	235,0
5Vnat	0,12	0,59	0,0	340,0	220,0	280,0
10Vnat	0,95	1,42	0,41	490,0	320,0	285,0
20Vnat	0,71	1,84	0,41	380,0	390,0	305,0
30Vnat	1,60	4,56	0,95	1010,0	600,0	425,0
40Vnat	1,36	9,24	2,6	1905,0	1502,0	825,0
60Vnat	0,47	1,0	0,12	1237,5	1440,0	1376,5
80Vnat	0,0	0,0	0,0	1696,7	1040,0	705,0
1Vbio	0,12	0,60	0,12	295,0	115,0	215,0
5Vbio	1,84	0,65	4,85	435,0	330,0	305,0
10Vbio	0,95	1,24	2,45	520,0	487,5	530,0
20Vbio	0,89	0,82	0,65	575,0	70,0	460,0
30Vbio	2,01	4,37	0,65	565,0	1446,4	280,0
40Vbio	6,34	2,56	0,71	990,0	1150,0	310,0
60Vbio	6,63	6,9	0,41	1115,0	1350,0	295,0
80Vbio	8,41	13,71	0,36	1117,5	950,0	320,0

Nos cultivos em meio WC (controle), foram observadas as maiores concentrações finais de clorofila *a* e sólidos suspensos voláteis para a *Chlorella vulgaris* com valores de 8,23 mg.L⁻¹ e 325,0 mg.L⁻¹, respectivamente (Tabela 3.11). Isto está relacionado ao maior valor de taxa de crescimento específico observado entre as três cepas estudadas (0,98 d⁻¹, Tabela 3.8). A cepa *Desmodesmus sp.* apresentou a menor concentração de clorofila *a* (2,60 mg.L⁻¹, Tabela 3.11) e também a menor taxa de crescimento específico (0,5 d⁻¹, Tabela 3.8), o que pode indicar que este meio de cultivo não foi propício para o seu desenvolvimento devido à ausência de algum micronutriente essencial.

Na comparação de todos os resultados de clorofila *a* para as três cepas em vinhaça *in natura* (Vnat) observou-se que a diluição de 30% (30Vnat) foi a melhor

condição para Cvg ($1,6 \text{ mg.L}^{-1}$, Tabela 3.11) e na diluição de 40% (40Vnat) para Csk ($9,24 \text{ mg.L}^{-1}$, tabela 3.11) e Dsp ($2,6 \text{ mg.L}^{-1}$, Tabela 3.11).

O meio de cultivo com 80% de vinhaça *in natura* (80Vnat) apresentou as menores concentrações de clorofila *a* para as três cepas estudadas (Tabela 3.11). Reconhece-se na literatura que a vinhaça bruta em altas concentrações não é considerada um bom meio de cultivo para microalgas (Candido e Lombardi, 2017). A coloração escura da vinhaça reduz a passagem da luminosidade impossibilitando a realização efetiva da fotossíntese e reduzindo a capacidade de crescimento microalgal (Silva et al., 2007; Ferreira et al., 2021). Outro motivo para que não houvesse clorofila *a* nesta condição pode estar relacionado com a alta condutividade apresentada pela vinhaça, devido ao seu conteúdo orgânico e inorgânico, que pode provocar problemas osmóticos em organismos de águas doces levando-os até a lise celular e a degradação de seus componentes citoplasmáticos (Algur e Kadioglu, 1992; Candido e Lombardi, 2017).

Em baixas diluições de vinhaça *in natura*, entre 1% (1Vnat) e 20% (20VNat), também foram observadas pequenas concentrações finais de clorofila *a* ($< 2 \text{ mg.L}^{-1}$) e de sólidos suspensos voláteis ($< 400 \text{ mg.L}^{-1}$) (Tabela 3.11), que podem ser justificados pelo estresse gerado pela ausência de macro e micronutrientes que suportam o crescimento microalgal, como o nitrogênio e o fósforo (Trevisan et al., 2020).

Para a vinhaça biodigerida, as maiores concentrações finais de clorofila *a* e sólidos suspensos voláteis para a *Chlorella vulgaris* e a *Chlorella sorokiniana* foram observados nas diluições de 60% e 80% (Tabela 3.11). Nestas condições, essas cepas encontraram alta disponibilidade nutricional que possibilitaram seu crescimento, atingindo os melhores rendimentos de biomassa (Tabela 3.10). É interessante, mencionar que estas cepas apresentaram valores superiores de clorofila *a* cultivadas em vinhaça biodigerida com 80% de diluição (80Vbio) do que o observado com o meio sintético, o que torna promissor o cultivo de microalgas com este tipo de efluente com pouco gasto de água.

Comparando os valores de clorofila *a* obtidos neste trabalho observou-se que são iguais ou superiores a outros presentes na literatura que utilizaram a vinhaça *in*

natura ou biodigerida como meio de cultivo das microalgas, como pode ser observado na Tabela 3.12. Desta forma, esses resultados podem ser considerados promissores uma vez que a clorofila *a* é uma valiosa biomolécula no mercado nutricional e farmacêutico por sua ação antioxidante (Candido e Lombardi, 2018).

Tabela 3.12- Comparação concentrações de clorofila *a* obtidas na literatura e neste trabalho usando vinhaça *in natura* (Vnat) e vinhaça biodigerida (Vbio) para o cultivo das microalgas Csk, Cvg e Dsp

Microalga	Características do tratamento com vinhaça	Clorofila <i>a</i> (mg.L ⁻¹)	Referências
<i>Chlorella sorokiniana</i>	15% de vinhaça <i>in natura</i> centrifugada	3,66	Candido e Lombardi (2020)
	40% de vinhaça <i>in natura</i>	9,24	Neste trabalho
	80% de vinhaça <i>biodigerida</i>	13,71	Neste trabalho
<i>Chlorella vulgaris</i>	20% de vinhaça <i>in natura</i> centrifugada	2,45	Candido e Lombardi (2020)
	30% de vinhaça <i>in natura</i>	1,60	Neste trabalho
	60% de vinhaça <i>in natura</i> (filtração com argila esmectita e carvão ativado)	4,60	Candido e Lombardi (2018)
	80% de vinhaça <i>biodigerida</i> centrifugada (filtração com argila esmectita e carvão ativado)	4,90	Candido e Lombardi (2018)
	40% de vinhaça <i>biodigerida</i>	3,05	Trevisan et al. (2020)
	80% de vinhaça <i>biodigerida</i>	8,41	Neste trabalho
<i>Desmodesmus sp</i>	20% de vinhaça <i>in natura</i> centrifugada	3,00	Candido e Lombardi (2020)
	40% de vinhaça <i>in natura</i>	2,60	Neste trabalho
	5% de vinhaça <i>biodigerida</i>	4,85	Neste trabalho

3.5.2.7 Avaliação do pH

Neste experimento optou-se pela não correção inicial do pH das amostras com vinhaça para testar a necessidade de correção do pH e testar a resiliência das cepas em crescerem em um meio com pH inicial ácido para a vinhaça *in natura*, variando de 4,7 a 5,1 e para a vinhaça biodigerida assumindo valores entre os intervalos de 7,4 a 8,2 (Tabela 3.13). Essa variação aconteceu por causa das diferentes condições de diluição dos efluentes com água deionizada, pois houve uma redução da carga orgânica, da acidez e da quantidade de compostos tóxicos presentes no meio (Siqueira, 2022).

Mesmo sem uma prévia correção do pH, observou-se um aumento natural e significativo do pH no meio controle (WC), em vinhaça *in natura* e biodigerida, como pode ser observado na Tabela 3.13. O aumento do pH durante a fotossíntese já é esperado devido ao consumo do carbono inorgânico pelas microalgas (Qiu et al., 2017; Siqueira et al., 2022). Esse aumento de pH pode promover a volatilização e a precipitação de algumas substâncias presentes nos efluentes, como o nitrogênio amoniacal e o fósforo (Siqueira et al., 2022).

Tabela 3.13- Valores de pH no início e ao final do experimento para todas as condições testadas

Condição	pH inicial	<i>Chlorella sorokiniana</i> (Csk)	<i>Chlorella Vulgaris</i> (Cvg)	<i>Desmodesmus</i> sp. (Dsp)
		pH _{final}	pH _{final}	pH _{final}
WC (controle)	7,6	10,2	8,7	8,5
1Vnat	5,1	9,3	8,3	8,2
5Vnat	4,9	8,9	8,2	8,3
10Vnat	4,8	8,6	8,1	7,8
20Vnat	4,7	8,3	8	8
30Vnat	4,7	8,5	7,9	7,6
40Vnat	4,7	7,9	7,4	7,2
60Vnat	4,7	7	6,9	7
80Vnat	4,7	5,8	4,9	4,6
1Vbio	7,4	9,9	8,6	8,8
5Vbio	8,1	9,8	9,2	9,1
10Vbio	8,1	10,1	9,3	10,2
20Vbio	8,1	10	9,3	10,1
30Vbio	7,8	9,2	9,9	8,9
40Vbio	8,3	10,6	9,9	8,9
60Vbio	8,2	9,9	9,9	8,9
80Vbio	8,2	9,7	9,8	9

Obs.: *pH inicial das amostras de Vnat e Vbio.

Vnat: vinhaça *in natura* e Vbio: vinhaça biodigerida.

As baixas taxas de crescimento (Tabela 3.8) e os menores rendimentos (Tabela 3.10) observados quando as três cepas foram cultivadas com diluição de 80% de vinhaça *in natura* (80Vnat) pode ser justificada pelo pH levemente ácido (pH<5) do cultivo, pois a atividade enzimática das microalgas são sensíveis a este pH (Siqueira et al., 2022). Para os cultivos em meios com pH próximo a neutralidade (pH=7) ou

levemente alcalino ($\text{pH} > 7$), como foi o caso das vinhaças biodigeridas com diluição de 20% (20Vbio) e 80% (80Vbio), estas apresentaram as maiores taxas de crescimento específicos e os maiores rendimentos de biomassa. Este mesmo comportamento foi observado por Bartley et al. (2014) e Tripathi, Singh, Thakur et al. (2015). Portanto fica claro que o pH desempenha um papel vital no crescimento e no rendimento da biomassa microalgal uma vez que este parâmetro está intimamente relacionado ao funcionamento adequado da microalga.

Sydney et al. (2019) também reportam que quando o pH da vinhaça usada para o crescimento de microalgas aumentou para valores próximos a 10, foi observado a precipitação de sólidos do meio de cultivo que alterou a composição do meio e influenciou diretamente o processo de crescimento das microalgas. Isto pode ter acontecido nas condições de uso da vinhaça biodigerida com diluição de 20% (20Vbio) e 80% (80Vbio), proporcionando os maiores valores de taxa de crescimento específica (Tabela 3.8) para as microalgas nestas condições.

3.5.2.8 Avaliação de nutrientes

3.5.2.8.1 Carbono Orgânico Total (COT)

As concentrações iniciais e finais de carbono orgânico total foram apresentados nas Tabela 3.14 para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) nos meios de cultivos WC, vinhaça *in natura* e vinhaça biodigerida.

Para o meio de cultivo WC (controle), pode-se observar um aumento na concentração de carbono orgânico total para as três cepas estudadas neste trabalho (Tabela 3.14), pois o metabolismo fotossintético das microalgas converte o dióxido de carbono presente no meio de cultivo em substâncias orgânicas, sendo o mesmo observado em outros trabalhos (Candido e Lombardi, 2018; Klein, Bonomi, Maciel Filho, 2018). Desta forma, as microalgas podem ser usadas para mitigar as emissões de dióxido de carbono, que contribuem para o efeito estufa e o aquecimento global, beneficiando, assim, o meio ambiente e a produção de bioenergia e bioprodutos (Cai, Park e Li, 2013).

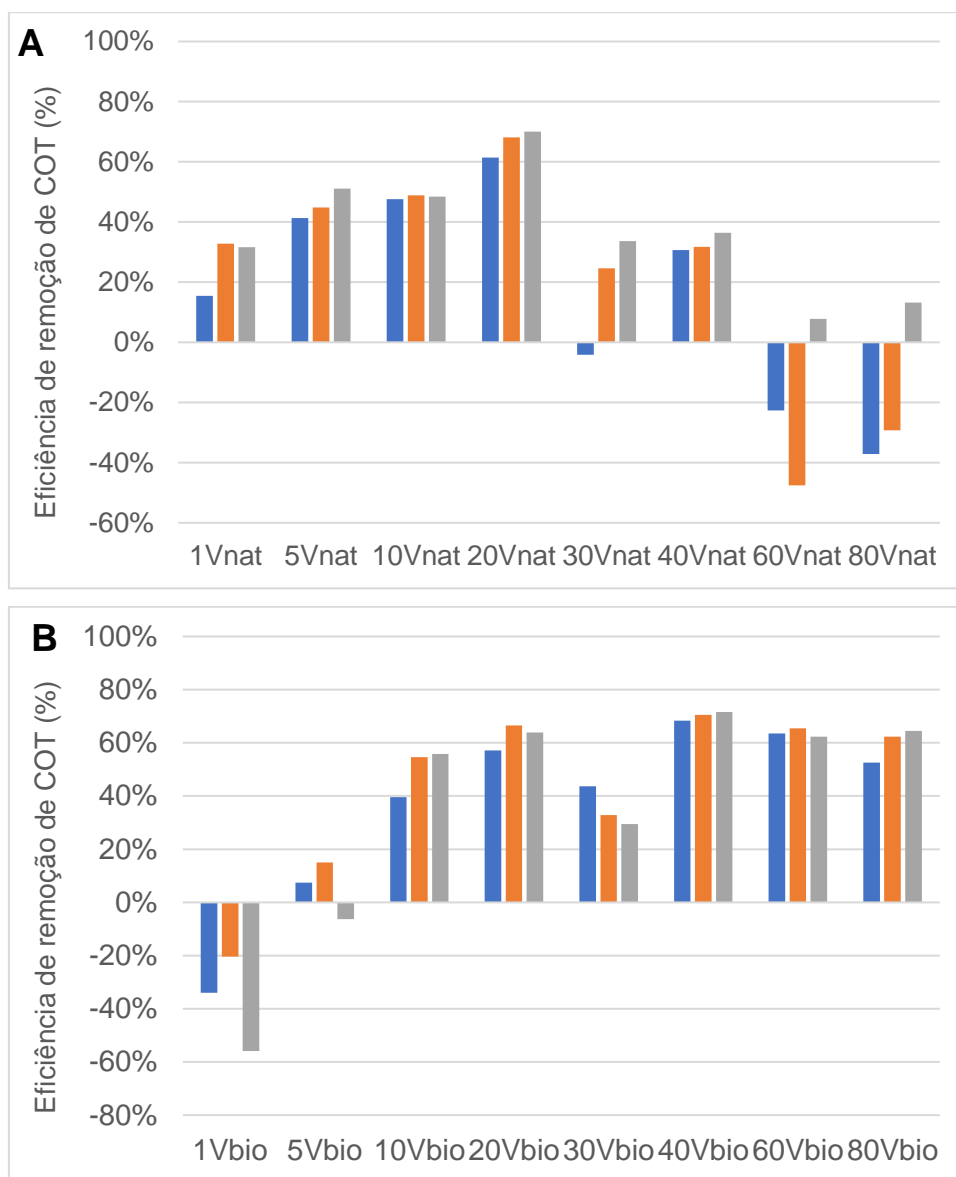
Tabela 3.14- Concentrações iniciais e finais de carbono orgânico total para todas as condições testadas

Condição	COT inicial (mg.L ⁻¹)	COT final (mg.L ⁻¹)		
		Csk	Cvg	Dsp
WC controle	8,2	328,8	262,2	313,6
1Vnat	123,2	104,19	82,84	84,2
5Vnat	366,1	215	202,21	179,2
10Vnat	730,5	383,1	373,3	376,4
20Vnat	1269,9	489,5	405,1	380,6
30Vnat	1469,9	1530,6	1109,1	975,2
40Vnat	1984,2	2375	1855,3	2162
60Vnat	3116	3821	4598	2872
80Vnat	4288	5882	5542	3721
1Vbio	60,3	80,76	72,58	94
5Vbio	209,2	193,63	177,77	222,4
10Vbio	418,3	252,7	190,05	185
20Vbio	531,6	227,6	178,15	191,8
30Vbio	829,6	467,2	556,9	585,4
40Vbio	1248,8	394,7	368,2	354,4
60Vbio	1482,4	540,8	511,3	558
80Vbio	1738,4	824	655,4	616,8

Analisando a Tabela 3.14, pode-se observar que na maioria dos casos houve uma redução da concentração de carbono orgânico total após o período de experimento, como pode ser visto na vinhaça *in natura* com diluição de 1% (1Vnat) a 40% (40Vnat) e na vinhaça biodigerida com diluição de 5% (5Vbio) a 80% (80Vbio). Como o cultivo das microalgas foi em sistema não axênico, grande parte dos compostos orgânicos foram removidos pelas leveduras, bactérias e outros microrganismos presentes na vinhaça *in natura* e biodigerida (Daneshvar et al., 2019).

Vale a pena mencionar que a vinhaça biodigerida apresentou sempre eficiências maiores do que a vinhaça *in natura* como pode ser observado na Figura 3.21, o mesmo foi observado por Candido e Lombardi (2018). Essa maior eficiência de remoção de carbono orgânico total na vinhaça biodigerida está relacionada com sua menor coloração e turbidez que proporcionou o crescimento mixotrófico das microalgas, o que já foi mais difícil ocorrer na vinhaça *in natura*.

Figura 3.21- Eficiência de remoção de COT para as cepas *Chlorella Sorokiniana* (Csk, ■), *Chlorella vulgaris* (Cvg, ■) e *Desmodesmus sp* (Dsp, ■) nas condições de vinhaça *in natura* (A) e biodigerida (B) diluídas entre 1% e 80%



As melhores eficiências de remoção de COT ocorreram no cultivo vinhaça biodigerida diluída a 40% (40Vbio) e 60% (60Vbio), atingindo valores próximos a 70% de remoção. Assim, o cultivo de microalgas pode ser usado para o tratamento de águas residuárias que apresentam potencial poluidor devido ao seu excesso de nutrientes. Comparando com a literatura, estes valores são próximos aos observado por Candido e Lombardi (2018) que obtiveram valores de eficiência de remoção de

COT ao redor de 30% no cultivo de *Chlorella vulgaris* usando vinhaça *in natura* filtrada diluída a 60% e vinhaça biodigerida filtrada diluída a 80%.

3.5.2.8.2 Nitrogênio total (NT)

As concentrações iniciais e finais de nitrogênio total foram apresentados nas Tabela 3.15 para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) nos meios de cultivos WC, vinhaça *in natura* e vinhaça biodigerida. O nitrogênio total representa a soma de nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), amônia (NH_4^+) e nitrogênio orgânico.

Tabela 3.15 - Concentrações iniciais e finais de nitrogênio para todas as condições testadas.

Condição	NT inicial (mg.L^{-1})	NT (mg.L^{-1})		
		Csk	Cvg	Dsp
WC controle	66,4	70,0	59,3	59,8
1Vnat	2,1	10,0	1,1	9,7
5Vnat	9,5	14,7	1,7	19,2
10Vnat	25,5	18,3	2,2	17,2
20Vnat	30,6	17,5	2,6	15,3
30Vnat	49,6	29,5	4,5	32,0
40Vnat	107,9	33,8	9,3	34,5
60Vnat	111,0	45,2	13,9	45,2
80Vnat	187,4	59,5	20,5	53,6
1Vbio	4,4	9,8	1,4	7,0
5Vbio	10,0	14,9	1,5	14,1
10Vbio	21,2	19,2	1,9	20,6
20Vbio	41,7	21,2	2,00	18,8
30Vbio	48,6	43,4	4,0	34,7
40Vbio	85,0	60,6	3,8	52,9
60Vbio	160,7	102,7	5,7	113,2
80Vbio	261,3	161,3	7,3	157,1

Analisando a Tabela 3.15, pode observar que na maioria dos casos houve uma redução da concentração de nitrogênio total após o período de experimento, como pode ser visto na vinhaça *in natura* com diluição de 30% (30Vnat) a 80% (80Vnat) e na vinhaça biodigerida com diluição de 40% (40Vbio) a 80% (80Vbio). Essa redução está relacionada com o fato de o nitrogênio ser um nutriente essencial para os

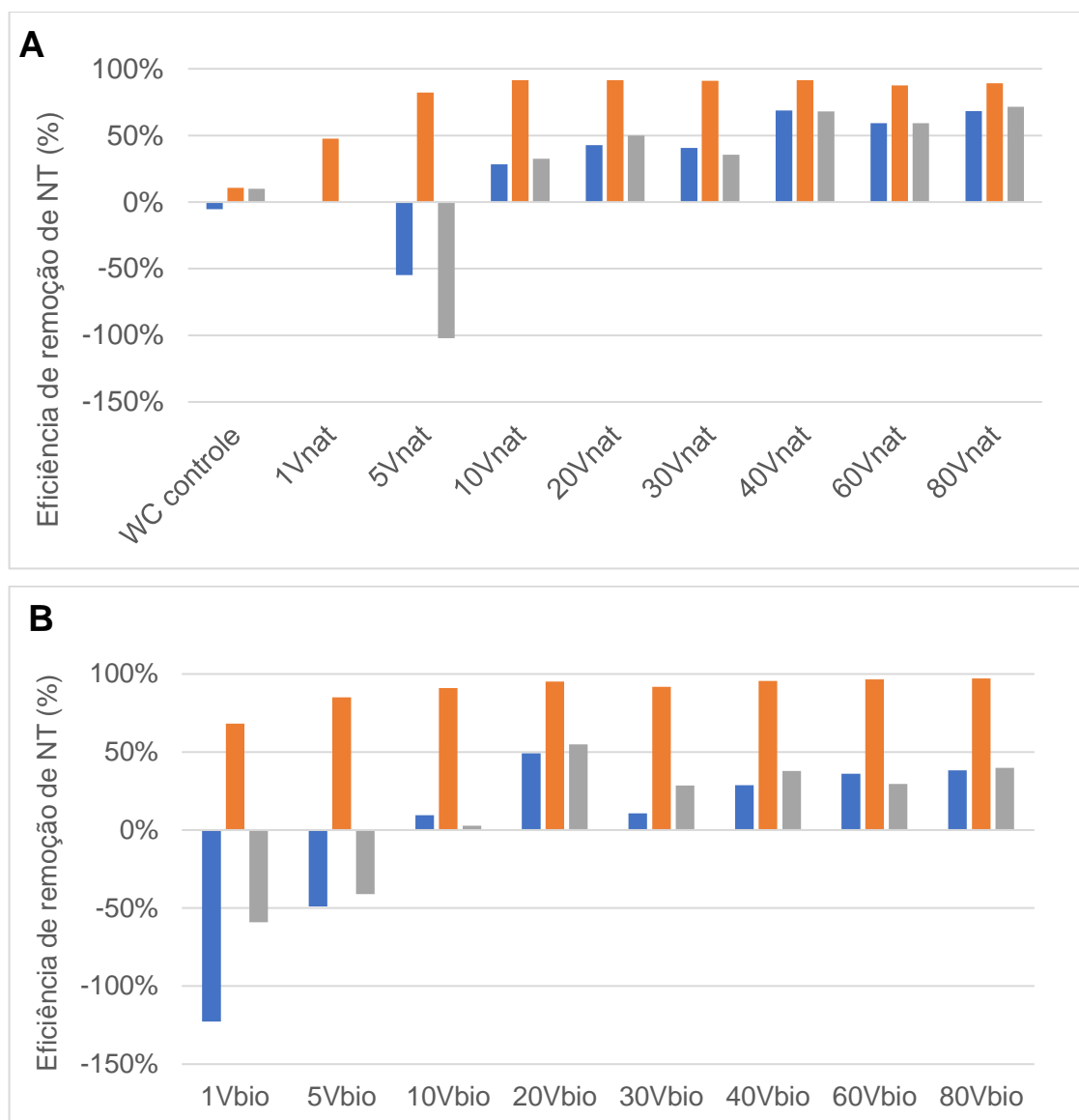
microrganismos e por estar relacionado com várias atividades celulares, como, síntese de aminoácido e duplicação do DNA (Siqueira et al, 2022). Essa alta taxa de assimilação de nitrogênio favoreceu o crescimento de biomassa, como pode ser observado pelos maiores valores de rendimento de biomassa obtidos (Tabela 3.10).

No entanto, para as cepas *Chlorella Sorokiniana* e *Desmodesmus sp* nas condições de vinhaça *in natura* e biodigerida diluídas a 1% e 5% (1Vnat, 5Vnat, 1Vbio e 5Vbio) pode-se observar aumento da concentração de nitrogênio total após o período de experimento. Para a diluição de 1% de vinhaça a concentração inicial de nitrogênio total era de 2,1 mg.L⁻¹ e a final quase quintuplicou atingindo o valor de 10 mg.L⁻¹. Nestas condições, as concentrações iniciais de nitrogênio total foram pequenas (< 20 mg.L⁻¹) que pode ter causado a senescência das células microalgais, liberando nitrogênio para o meio, como pode ser observado pelos menores valores de rendimento de biomassa (Tabela 3.10).

Foi interessante observar elevadas eficiências de remoção de nitrogênio total obtidas pela *Chlorella vulgaris*, superiores a 90% para o cultivo em vinhaça *in natura* com diluições de 30% (30Vnat) a 80% (80Vnat) e na vinhaça biodigerida com diluições de 40% (40Vbio) a 80% (80Vbio), como indicado na Figura 3.22.

Comparando-se com a literatura, estes valores são próximos aos observados por Daneshvar et al. (2019) que obtiveram eficiência de remoção de nitrogênio total de 92% para a *Scenedesmus quadricauda* e de 83% para a *Tetraselmis suecica* quando cultivada com água residuária de laticínios. Os valores obtidos neste experimento foram superiores aos obtidos por Candido e Lombardi (2018) que obtiveram eficiência de remoção de nitrogênio total de 75% para a vinhaça *in natura* filtrada e 50% para a vinhaça biodigerida filtrada cultivando *Chlorella vulgaris*.

Figura 3.22- Eficiência de remoção de NT para as cepas *Chlorella sorokiniana* (Csk, ■), *Chlorella vulgaris* (Cvg, ■) e *Desmodesmus sp* (Dsp, ■) nas condições de vinhaça *in natura* (A) e biodigerida (B) diluídas entre 1% e 80%



3.5.2.8.3 Nitrato (NO_3^-)

As concentrações iniciais e finais de nitrato foram apresentados nas Tabela 3.16 para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) nos meios de cultivos WC, vinhaça *in natura* e vinhaça biodigerida.

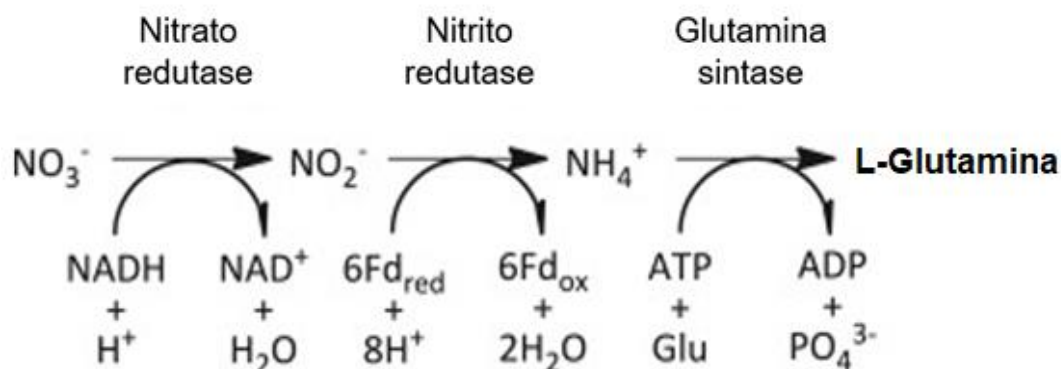
Tabela 3.16- Concentrações iniciais e finais de nitrato (NO_3^-) para todas as condições testadas

Condição	NO_3^- inicial (mg.L^{-1})	NO_3^- final (mg.L^{-1})		
		Csk	Cvg	Dsp
WC controle	54,6	0,6	8,9	8,2
1Vnat	4,7	2,8	7,6	1,6
5Vnat	18,5	7,0	20,9	5,7
10Vnat	57,0	19,1	25,5	17,1
20Vnat	113,0	34,2	56,1	22,1
30Vnat	111,5	62,9	96,7	53,8
40Vnat	198,4	97,8	20,6	107,0
60Vnat	354,6	152,1	176,5	160,8
80Vnat	447,0	441,3	269,7	430,0
1Vbio	2,0	1,8	1,3	7,8
5Vbio	4,9	2,3	5,4	8,7
10Vbio	12,2	10,3	9,7	9,5
20Vbio	13,2	7,9	9,6	8,3
30Vbio	21,7	11,6	10,5	17,7
40Vbio	48,9	22,0	21,0	20,3
60Vbio	105,6	29,3	31,3	34,4
80Vbio	52,9	47,1	44,0	43,7

Para o meio de cultivo WC (controle), pode-se observar uma redução significativa na concentração final de nitrato para as três cepas estudadas neste trabalho, no início a concentração era de $54,6 \text{ mg L}^{-1}$ e no final foi de $0,6$; $8,9$ e $8,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para as cepas *Chlorella sorokiniana* (Csk), *Chlorella vulgaris* (Cvg) e *Desmodesmus sp* (Dsp) (Tabela 3.16). Normalmente, as microalgas absorvem o nitrato (NO_3^-) do meio para o interior da célula e depois o reduzem para nitrito (NO_2^-) e amônia (NH_4^+) (Figura 3.23), que será usado no seu metabolismo. Nestas condições, a energia oriunda da luz e dos compostos orgânicos é consumida para a redução de nitrato a nitrito (Kim, Lee, Hwang; 2013).

O maior consumo de nitrato foi observado na *Chlorella sorokiniana* (Csk) do que nas demais cepas estudadas, o que proporcionou que esta cepa apresentasse o maior rendimento de biomassa microalgal, como pode ser observado na Tabela 3.10 (0,666).

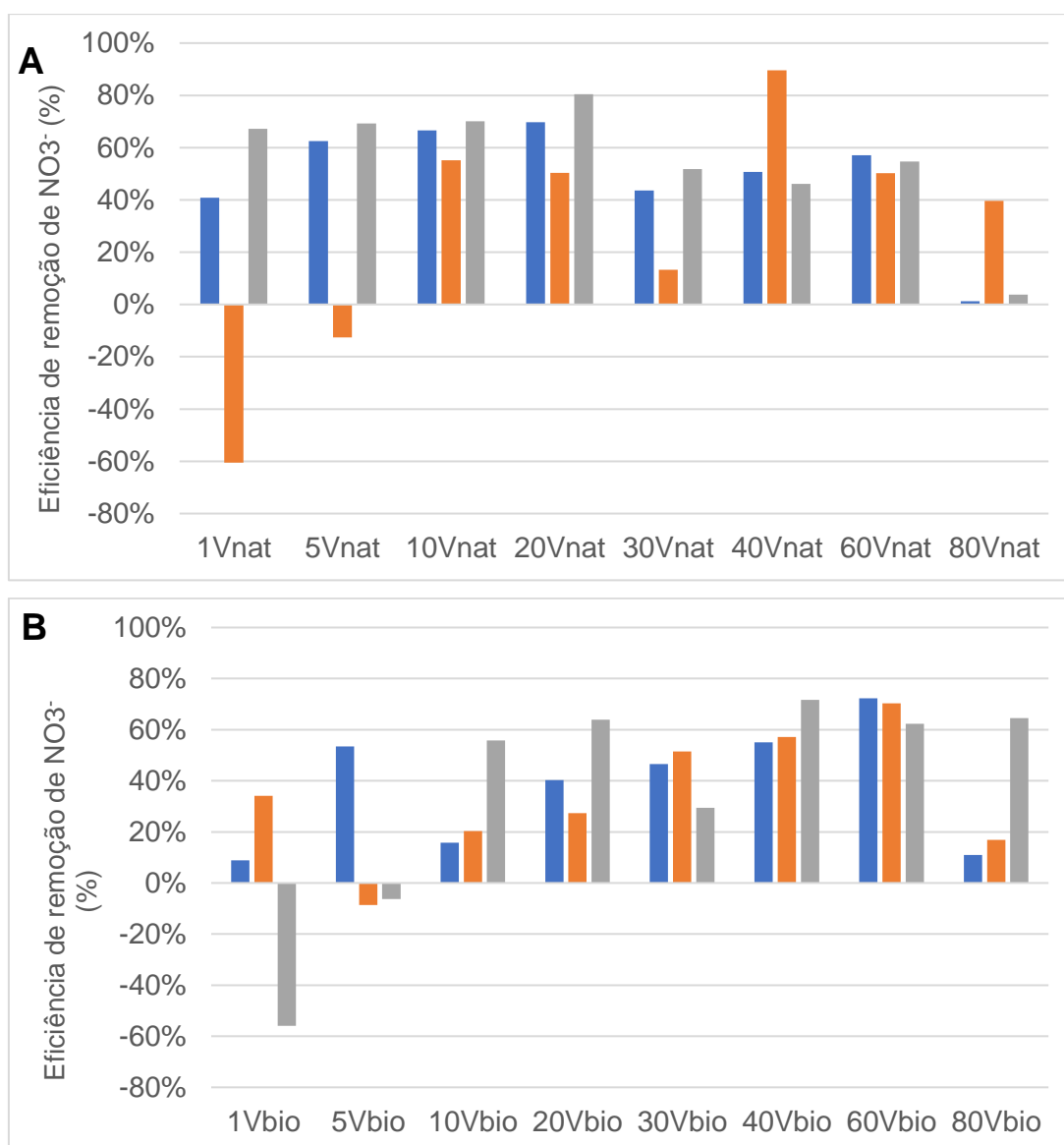
Figura 3.23- Esquema simplificado da assimilação de nitrogênio inorgânico pelas microalgas.



Fonte: Adaptado de Cai, Park, Li (2013) com permissão.

Vale a pena mencionar que a vinhaça *in natura* e biodigerida apresentaram elevadas eficiências de remoção de nitrato, como pode ser observado pelas menores concentrações finais de nitrato para as três cepas estudadas neste trabalho, que podem ser vistos na Tabela 3.16 e na Figura 3.24. Essa alta eficiência de remoção de nitrato pode estar relacionado à interação entre as microalgas e as bactérias presentes nestas águas residuárias, visto que o cultivo foi não-axênico (Carvalho et al., 2021). Em condições anóxicas, onde baixas concentrações de oxigênio dissolvido são observadas, principalmente, na fase de escuro do cultivo; o nitrato pode servir como um acceptor de elétrons para as bactérias nitrificantes (Zhang, Li, Ho, 2021). Na fase de claro, as microalgas podem assimilar a amônia que é a forma de nitrogênio preferencial, pois não tem reações de oxirreduções envolvidas nos seu processo de assimilação, requerendo, assim, uma menor quantidade de energia (Cai, Park, Li, 2013; Su, 2021; Zhang, Li, Ho, 2021). Em condições aeróbias, proporcionada pelo metabolismo fotossintético da microalga, a amônia pode ser oxidada a nitrito, ocorrendo o processo de nitrificação, que, também pode ser utilizado pela microalga (Carvalho et al., 2021).

Figura 3.24- Eficiência de remoção de nitrato (NO_3^-) para as cepas *Chlorella Sorokiniana* (Csk, ■), *Chlorella vulgaris* (Cvg, ■) e *Desmodesmus sp* (Dsp, ■) nas condições de vinhaça *in natura* (A) e biodigerida (B) diluídas entre 1% e 80%



As melhores eficiências de remoção de nitrato ocorreram no cultivo com vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e 60% (60Vnat) e com a vinhaça biodigerida diluída a 40% (40Vbio) e 60% (60Vbio), atingindo valores superiores a 50%. Desta forma, águas residuárias com elevado potencial poluidor podem ser usadas como meio de cultivo para as microalgas proporcionando tanto o benefício ambiental como a produção de bioprodutos de interesse.

3.5.2.8.4 Fosfato solúvel reativo (PO_4^{3-})

O fósforo é um fator chave no crescimento e metabolismo das microalgas e pode ser encontrado nos ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e produtos metabólicos intermediários da síntese de carboidratos (Cai, Park e Li, 2013). As concentrações iniciais e finais do fósforo solúvel reativos (PRS) foram apresentados nas Tabela 3.17 para as três cepas (Csk, Cvg e Dsp) nos meios de cultivos WC, vinhaça *in natura* e vinhaça biodigerida.

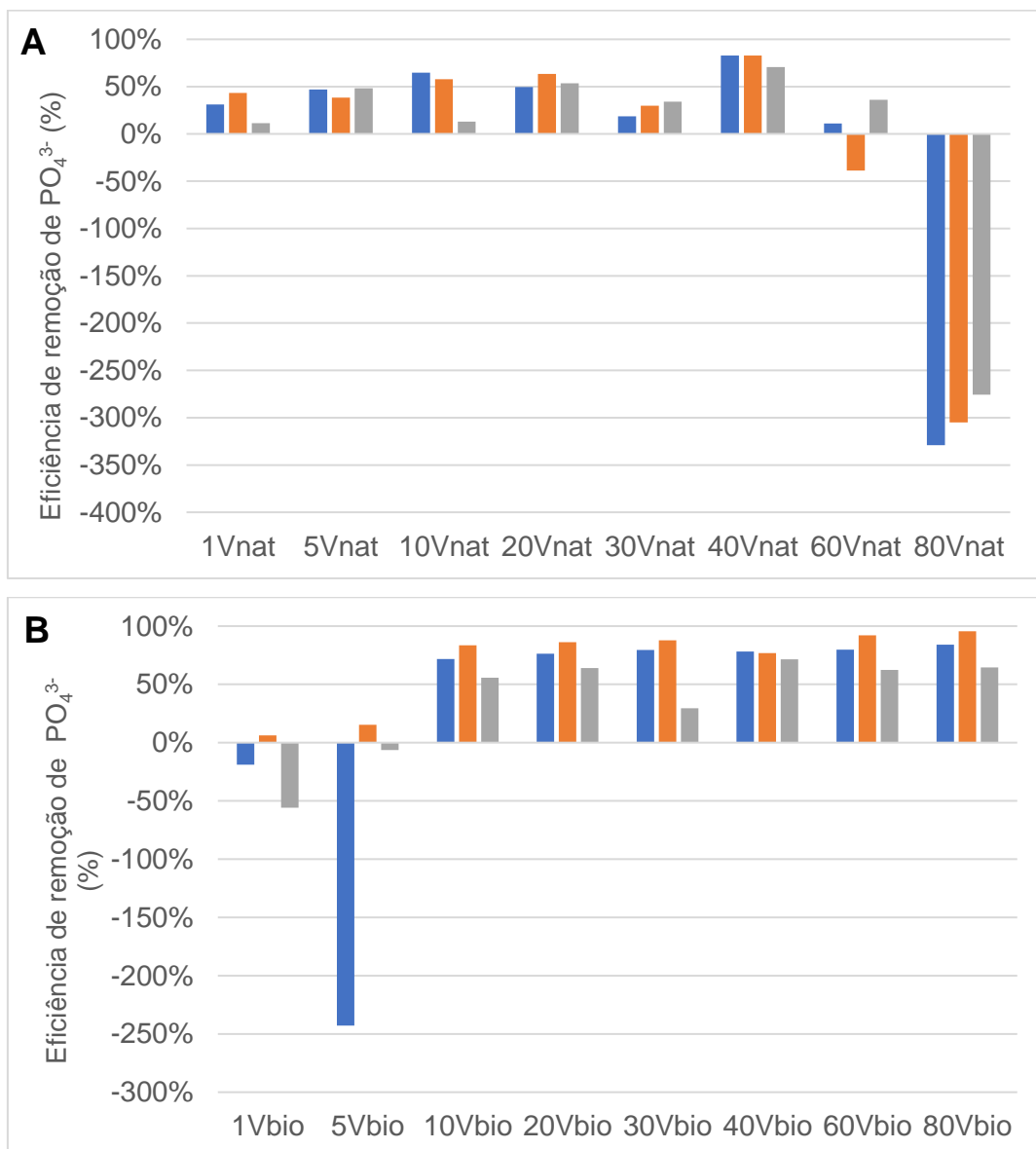
Tabela 3.17- Concentrações iniciais e finais do fósforo solúvel reativos (PO_4^{3-}) para todas as condições testadas

Condição	PO_4^{3-} inicial (mg.L^{-1})	PO_4^{3-} final (mg.L^{-1})		
		Csk	Cvg	Dsp
WC controle	0,9	0,195	0,375	0,785
1Vnat	0,20	0,140	0,115	0,180
5Vnat	0,40	0,210	0,245	0,205
10Vnat	0,74	0,260	0,310	0,640
20Vnat	0,75	0,380	0,275	0,350
30Vnat	0,59	0,480	0,415	0,390
40Vnat	1,43	0,245	0,245	0,420
60Vnat	1,78	1,590	2,475	1,140
80Vnat	1,85	7,930	7,485	6,945
1Vbio	0,14	0,165	0,13	0,270
5Vbio	0,11	0,365	0,09	0,165
10Vbio	0,64	0,180	0,105	0,210
20Vbio	0,95	0,225	0,13	0,245
30Vbio	1,03	0,210	0,125	0,285
40Vbio	1,33	0,29	0,310	0,310
60Vbio	2,27	0,460	0,180	0,300
80Vbio	3,48	0,550	0,155	0,300

Analisando a Tabela 3.17, pode observar que na maioria dos casos houve uma redução da concentração fósforo solúvel reativos (PRS) após o período de experimento, como pode ser visto na vinhaça *in natura* com diluição de 1% (1Vnat) a 60% (60Vnat) e na vinhaça biodigerida com diluição de 10% (40Vbio) a 80% (80Vbio). Essa redução está relacionada com o fato de o fósforo ser um nutriente essencial e

as microalgas precisam assimilar tanto para suas atividades anabólicas como metabólicas (Fu et al., 2019). Durante o metabolismo das microalgas, o fósforo, preferencialmente na forma de H_2PO_3^- e HPO_3^{2-} é incorporado nos compostos orgânicos pelos processos de fosforilação, que, em muitas das vezes, envolve geração de ATP (adenosina trifosfatada) a partir da adenosina difosfatada acompanhada por uma forma de entrada de energia (Cai, Park e Li, 2013).

Figura 3.25- Eficiência de remoção de PO_4^{3-} para as cepas *Chlorella Sorokiniana* (Csk, ■), *Chlorella vulgaris* (Cvg, ■) e *Desmodesmus sp* (Dsp, ■) nas condições de vinhaça *in natura* (A) e biodigerida (B) diluídas entre 1% e 80%



Vale a pena mencionar que outro motivo para essa elevada remoção de fósforo pode ser devido a precipitação química do mesmo em pH alcalinos ($\text{pH} > 10$), que pode ter ocorrido nos cultivos com a vinhaça biodigerida que apresentaram valores de pH próximos a este (Tabela 3.13) (Siqueira et al, 2022). Desta forma, as microalgas podem ser usadas como uma tecnologia sustentável para recuperação do fósforo na reciclagem do nutriente a partir do tratamento de águas residuárias.

Todavia, quando as microalgas foram cultivadas em vinhaça *in natura* com diluição de 80% (80Vnat) observou-se aumento da concentração final de fósforo solúvel reativo (PO_4^{3-}) após o período de experimento. Isso pode ter acontecido pela liberação de fósforo para o meio devido a morte das células microalgais causada pela presença de compostos tóxicos, elevada turbidez e outros microrganismos presentes nesta água residuária (Candido e Lombardi, 2018).

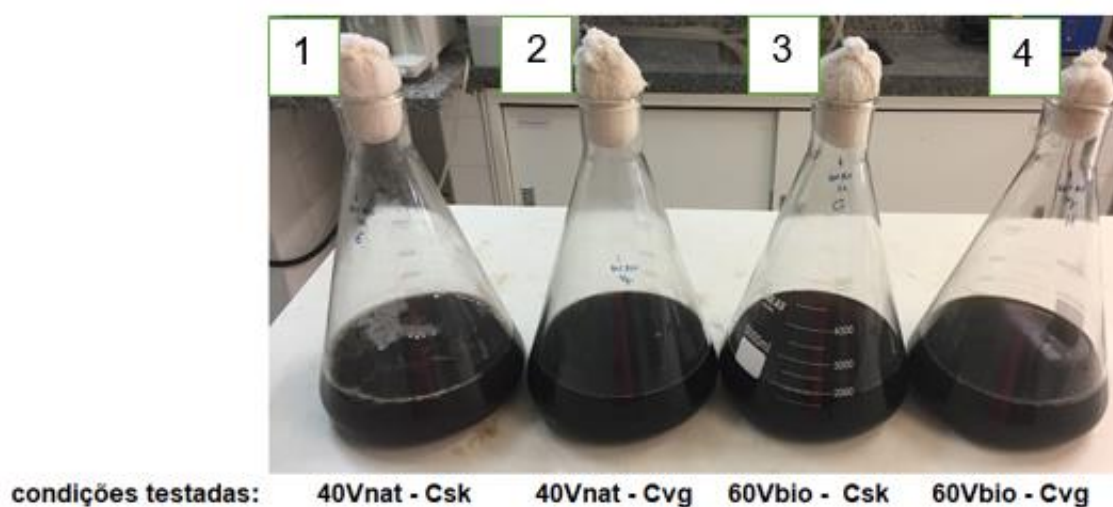
Foi interessante observar as elevadas eficiências de remoção de fósforo solúvel reativo (PO_4^{3-}) obtidas pela *Chlorella vulgaris*, superiores a 40% para cultivo em vinhaça *in natura* com diluição de 5% (5Vnat) a 40% (40Vnat) e superiores a 75% na vinhaça biodigerida com diluição de 10% (40Vbio) a 80% (80Vbio), como pode ser observado na Figura 3.25.

3.5.3 Resultados do Experimento III

Com as melhores condições obtidas no Experimento II, cultivo de microalgas em vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e em vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio), prosseguiu-se ao ensaio de bancada com aumento de escala dos fotobiorreatores a fim de observar se a vinhaça, tanto *in natura* quanto biodigerida, após o tratamento microalgal, ainda poderia ser usada como fertilizante na plantação de cana de açúcar. Outro objetivo foi de verificar se as microalgas estavam com sua morfologia preservada após os cultivos em vinhaça *in natura* e em vinhaça biodigerida. Como, a cepa *Desmodesmus sp* apresentou baixo crescimento e baixas taxas de consumo de nutrientes na vinhaça *in natura* e na biodigerida no Experimento II, essa microalga não foi escolhida para o experimento de aumento de escala (Experimento III), sendo mantida as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris*.

Na Figura 3.26 se encontram os fotobiorreatores de 5L utilizados no Experimento III com as culturas com as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e na vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio) após os 10 dias experimentais. Pode-se observar que ambas as cepas conseguiram se adaptar e crescer bem nas condições propostas no Experimento III, como pode ser visto pela coloração mais esverdeada observada pessoalmente.

Figura 3.26 – Fotobiorreatores de 5L com 2L de culturas com as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio) ao final do experimento



Na Tabela 3.18 foram apresentados os resultados obtidos para biomassa seca para as culturas com as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e na vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio) após os 10 dias de experimento. Pode-se observar que a maior produção de biomassa seca foi obtida para a cepa *Chlorella vulgaris* cultivada em vinhaça *in natura* diluída em 40%, isso pode ter ocorrido provavelmente devido a maiores concentrações de nutrientes disponíveis neste tipo de resíduos. Em vinhaça biodigerida as cepas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris*, obtiveram desempenho semelhante nos resultados de biomassa seca, com concentrações finais de 230,1 mg.L⁻¹ e de 267 mg.L⁻¹, respectivamente (Tabela 3.18). Valores próximos a estes foram encontrados por Trevisan et al. (2020) que encontrou 200 mg.L⁻¹ para a *Chlorella vulgaris* cultivada em vinhaça biodigerida em 50%.

Tabela 3.18 – Resultados encontrados para biomassa seca (mg.L^{-1}) e clorofila *a* (mg.L^{-1}) no Experimento III

Condição	Biomassa seca (mg.L^{-1})	Clorofila <i>a</i> (mg.L^{-1})
<i>Chlorella sorokiniana</i> – 40Vnat	85,3	3,12
<i>Chlorella vulgaris</i> – 40Vnat	387,1	8,90
<i>Chlorella sorokiniana</i> – 60Vbio	230,1	6,42
<i>Chlorella vulgaris</i> – 60Vbio	267,0	6,78

Na Tabela 3.18 foram apresentados os valores de clorofila *a* obtidos após 10 dias de experimento para as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e na vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio). O maior valor de clorofila *a*, também, foi obtido para a *Chlorella vulgaris* cultivada em vinhaça *in natura* diluída em 40%, com o valor de $8,9 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo esse valor superior ao observado no experimento em pequena escala foi de $1,9 \text{ mg.L}^{-1}$, nesta condição (Tabela 3.11).

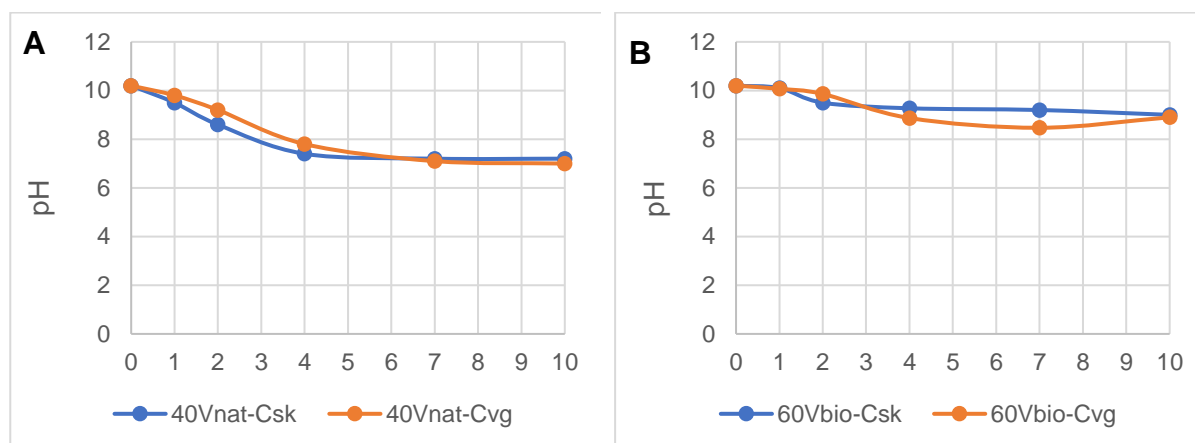
Essa maior concentração de clorofila *a* encontrada no experimento de maior escala pode estar relacionada com a maior quantidade de microalgas colocadas no início desta etapa (Experimento III, larga escala) do que no início do experimento de menor escala (Experimento II), mesmo mantido a mesma proporção de inóculo (Aravantinou, Theodorakopoulos e Manariotis, 2013). Outra justificativa para esse melhor desempenho pode estar relacionada ao ajuste do pH inicial a 10,2 com NaOH 6M já que este pH pode ter efeito sobre a comunidade microbiana presente na vinhaça *in natura* e também pode ter precipitado alguns compostos tóxicos da vinhaça, como observado por Sydney et al. (2019).

No entanto, na vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio), as cepas estudadas apresentaram valores de $6,42 \text{ mg.L}^{-1}$ para a *Chlorella sorokiniana* e $6,78 \text{ mg.L}^{-1}$ para a *Chlorella vulgaris* (Tabela 3.18), valores próximos aos observados no experimento em pequena escala de $6,90 \text{ mg.L}^{-1}$ e $6,93 \text{ mg.L}^{-1}$ para a *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente (Tabela 3.11). Comparando com a literatura estes valores são quase o dobro do obtidos por Trevisan et al. (2020) e Candido e Lombardi (2018) quando usaram vinhaça biodigerida diluída para o cultivo da *Chlorella vulgaris*. Portanto, esses resultados são bastante animadores, pois a

clorofila *a* é uma valiosa biomolécula no mercado nutricional e farmacêutico por sua ação antioxidante (Candido e Lombardi, 2018).

O perfil temporal do pH ao longo do período experimental pode ser observado na Figura 3.27 (A e B). Neste experimento, visando melhorar as condições de cultivos observadas no ensaio em pequena escala (Experimento II), o pH da vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e na vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio) foi ajustado a 10,2. Este ajuste foi realizado para este valor devido a ensaios prévios que não foram demonstrados neste trabalho. No entanto, na literatura foi possível verificar correções de pH próximas, como a correção inicial do pH para 9,2 realizada por Santos (2013) em seus experimentos.

Figura 3.27 – Gráficos com resultados do monitoramento do pH em (A) vinhaça *in natura* na diluição de 40% (40Vnat) e em (B) vinhaça biodigerida na diluição de 60% (60Vbio) para as cepas *Chlorella sorokiniana* (●) e *Chlorella vulgaris* (●)



Analisando a Figura 3.27, também é relevante comentar que o pH final de todos os experimentos foi menor do que o pH inicial, sendo este parâmetro mais acentuado no cultivo das microalgas em vinhaça *in natura* na diluição de 40%. Isso pode estar relacionado com a baixa alcalinidade do meio que não conseguiu tamponar o meio e com a degradação de matéria orgânica pela comunidade microbiana que gerou ácidos orgânicos ocorrendo a diminuição gradativa do pH.

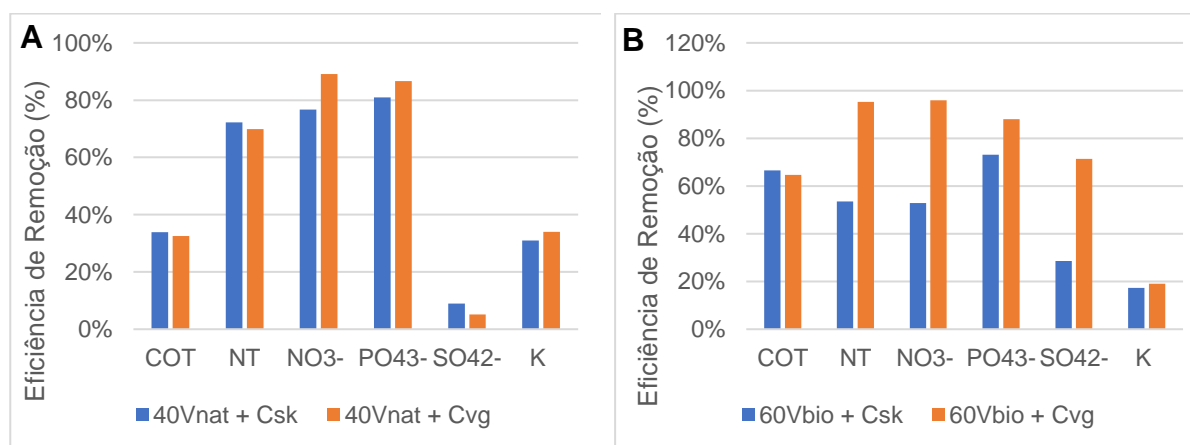
A remoção de nutrientes para as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (40Vnat) e na vinhaça biodigerida diluída a 60% (60Vbio), que está apresentada na Tabela 3.19 e na Figura 3.28, foi parecida ao observado no experimento em pequena escala (Experimento II), principalmente

para o carbono orgânico total (COT, Tabela 3.14), nitrogênio total (NT, Tabela 3.15), nitrato (NO_3^- , Tabela 3.16) e fosfato solúvel reativo (PO_4^{3-} , Tabela 3.17).

Tabela 3.19- Caracterização química de (A) vinhaça *in natura* na diluição de 40% (40Vnat) e em (B) vinhaça biodigerida na diluição de 60% (60Vbio) antes e após o cultivo das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris*

Condição	COT (mg.L ⁻¹)	NT (mg.L ⁻¹)	NO_3^- (mg.L ⁻¹)	PO_4^{3-} (mg.L ⁻¹)	SO_4^{2-} (mg.L ⁻¹)	K (mg.L ⁻¹)
40Vnat (inicial sem alga)	1784,2	103,9	95,6	1,87	522	1325
60Vbio (inicial sem alga)	1053	187,3	165,8	2,5	7	1100
40Vnat + Csk	1180	28,8	22,3	0,356	475	915
40Vnat + Cvg	1203	31,3	10,4	0,25	495	875
60Vbio + Csk	352	87	78,2	0,67	5	910
60Vbio + Cvg	372	8,9	6,7	0,3	2	890

Figura 3.28 – Eficiência de remoção de COT, NT, NO_3^- em (A) vinhaça *in natura* na diluição de 40% (40Vnat) e em (B) vinhaça biodigerida na diluição de 60% (60Vbio) para as cepas *Chlorella sorokiniana* (●) e *Chlorella vulgaris* (●).



Devido à pequena quantidade de amostra não foi possível avaliar dois constituintes principais da vinhaça no Experimento II (pequena escala), o sulfato e o potássio. No Experimento III, a concentração de sulfato variou pouco tanto na vinhaça *in natura* quanto na biodigerida, como pode ser observado na Tabela 3.19. A eficiência de remoção de sulfato variou entre 5% e 9% para a vinhaça *in natura* na diluição de 40% (40Vnat) entre 30 e 70% e na biodigerida na diluição de 60% (60Vbio) (Figura

3.28). Essa redução de concentração de sulfato se deve mais à própria assimilação do enxofre do sulfato para a síntese de aminoácidos essenciais, como a cisteína e a metioanina (Mera, Torres e Albade, 2016). Candido e Lombardi (2018) observaram eficiências de remoção de sulfato superiores a 95% quando usaram a vinhaça *in natura* diluída a 60% e vinhaça biodigerida diluída a 80% no cultivo de *Chlorella vulgaris*.

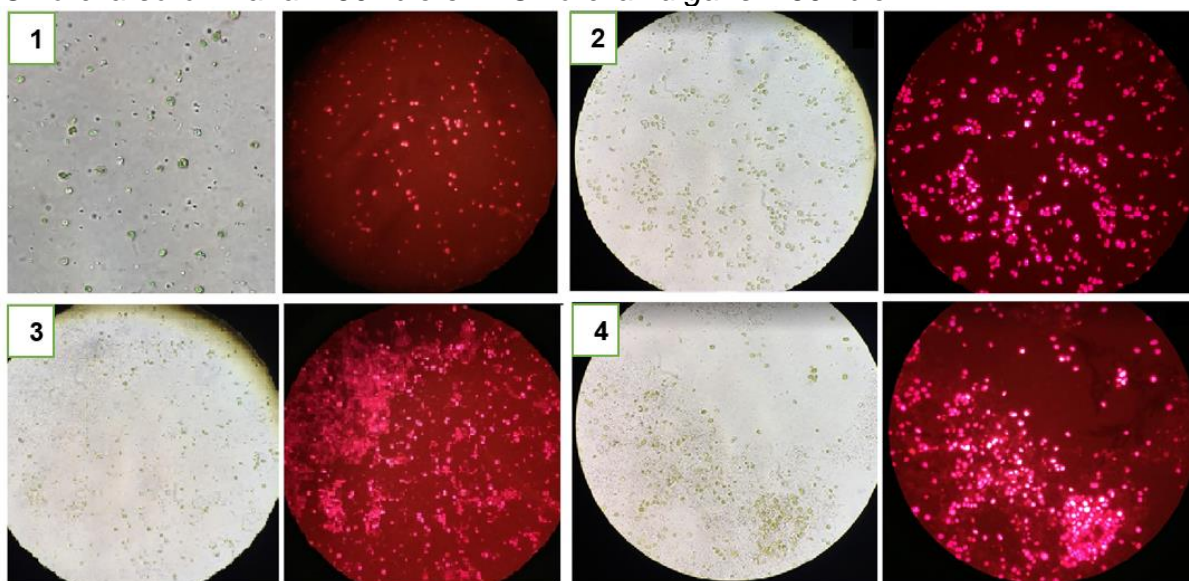
A concentração de potássio também reduziu durante o cultivo da *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* na diluição de 40% (40Vnat) e na biodigerida na diluição de 60% (60Vbio), apresentando uma eficiência de 30% e de 20%, respectivamente. Essa baixa eficiência pode estar relacionada com a assimilação desse elemento que é essencial para a microalga, pois pode ser usado como regulador osmótico e como auxiliador do potencial celular (Medeiros et al., 2020). Trevisan et al (2020) observaram também pequenas eficiências de remoções de potássio (< 20%) quando usaram a vinhaça biodigerida diluída a 50% no cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Estes resultados corroboram com a capacidade das microalgas de assimilarem nutrientes presentes na vinhaça, tanto *in natura* quanto biodigerida, com diluições, mesmo em condições não otimizadas e em cultivos não-axênicos, como no caso em questão. Fica evidente que há vantagens no uso de águas residuárias para o cultivo de microalgas tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico, pois trata-se o resíduo e diminui os gastos de matéria prima com o preparo de meios.

Mesmo a vinhaça *in natura* ou biodigerida sendo usada para o cultivo de microalgas, concentrações de matéria orgânica e nutrientes (como, potássio) ainda são remanescentes o que permite, ainda, usar esse resíduo como fertilizante.

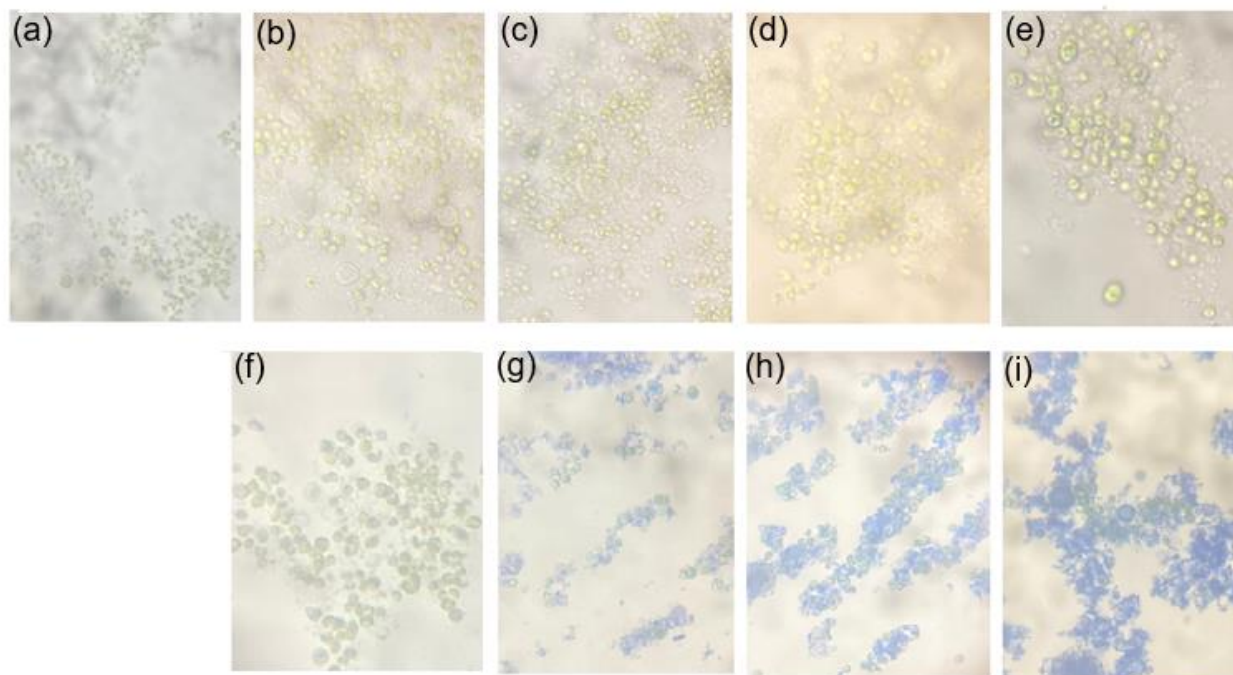
Na Figura 3.29 foram apresentadas as imagens do teste de fluorescência realizado para as quatro condições testadas. Esse teste antecedeu o teste de viabilidade celular e foi realizado com o intuito de validar a existência de microalgas ao final das 4 condições experimentais para então ser realizado o teste de viabilidade celular. Ao interpretar as imagens presentes na Figura 3.29 foi possível verificar a fluorescência nos cloroplastos das microalgas testadas (tons rosados brilhantes), evidenciando a presença de clorofila em todas as condições experimentais testadas.

Figura 3.29 – Imagens do teste de fluorescência de clorofila *a* realizado para as condições: 1- *Chlorella sorokiniana* – 40Vnat; 2- *Chlorella vulgaris* – 40Vnat; 3- *Chlorella sorokiniana* – 60Vbio e 4- *Chlorella vulgaris* – 60Vbio



Os testes de viabilidade celular foram realizados para as 4 condições testadas no Experimento III, realizado por avaliação e por contraste, conforme explicado na metodologia. O objetivo principal desse teste foi verificar se, ao final dos experimentos, as microalgas ainda estavam com sua morfologia preservada. Os resultados foram exibidos nas imagens das Figuras 3.30 a 3.33.

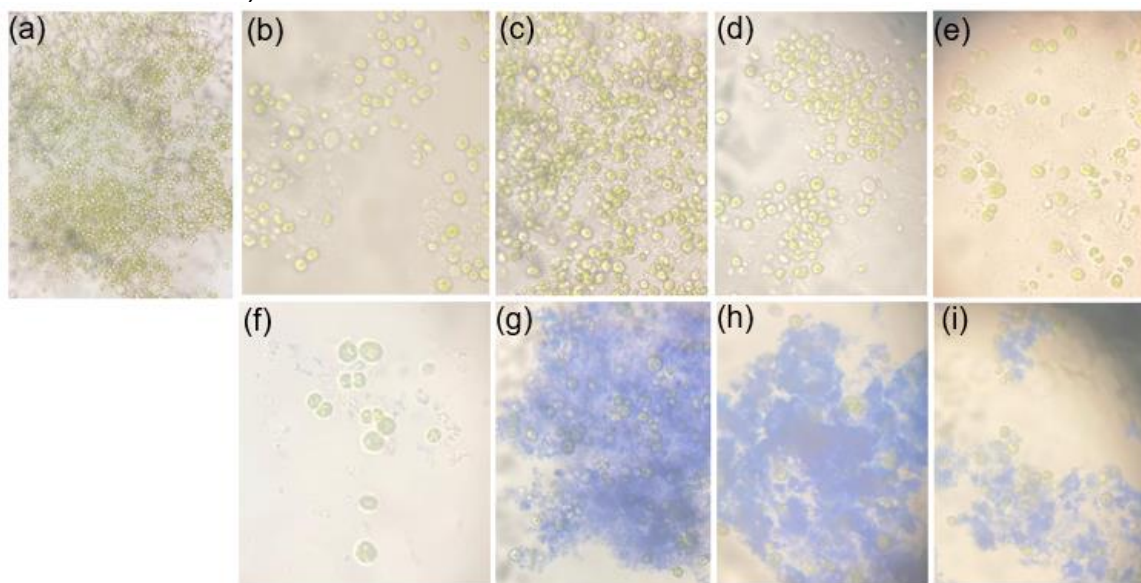
Figura 3.30 – Imagens do teste de viabilidade celular realizado para a condição 1-cultivo da *Chlorella sorokiniana* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (Csk-40Vnat), onde a) imagem do cultivo (aumento 40x); b) a e) imagens da microalga submetidas a 4 concentrações de sulfato de alumínio (aumento de 200x); e f) a i) imagens da microalgas nas 4 concentrações de sulfato de alumínio com corante azul de tripano e aumento de 200x.



Na Figura 3.30, que corresponde ao cultivo da *Chlorella sorokiniana* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (Csk-40Vnat) foi possível verificar que na imagem (a) as microalgas se encontravam preservadas, mantendo a aparência normal (formato arredondado esverdeado e bem definido). O mesmo pode-se perceber na imagem b com concentração utilizada de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de alumínio. Nas imagens (c) a (e), observou-se pelas imagens que algumas células se encontravam em formato diferente do inicial (mais ovaladas e esverdeadas) e outras se encontravam rompidas. Pode-se também observar a presença de morfologia de outros microrganismos não semelhantes a *Chlorella sorokiniana*. Analisando as imagens (g) a (i) pode-se observar a presença de manchas azuis no meio da lâmina causada pela reação do corante azul de tripano e do protoplasma das células que se romperam e se difundiram na lâmina. Portanto, nessas condições que correspondem as concentrações de $2,0$; $10,0$ e 100 g.L^{-1} de sulfato de alumínio, pode-se confirmar que as microalgas já não se encontravam em sua morfologia normal. É interessante apontar que antes do uso do sulfato de alumínio as células da microalga se mostravam intactas no cultivo da

vinhaça o que facilita a obtenção das biomoléculas de interesse. E, além disso demonstra a capacidade da microalga *Chlorella sorokiniana* em resistir às condições do resíduo, no caso a vinhaça *in natura* a 40% de diluição (40Vnat).

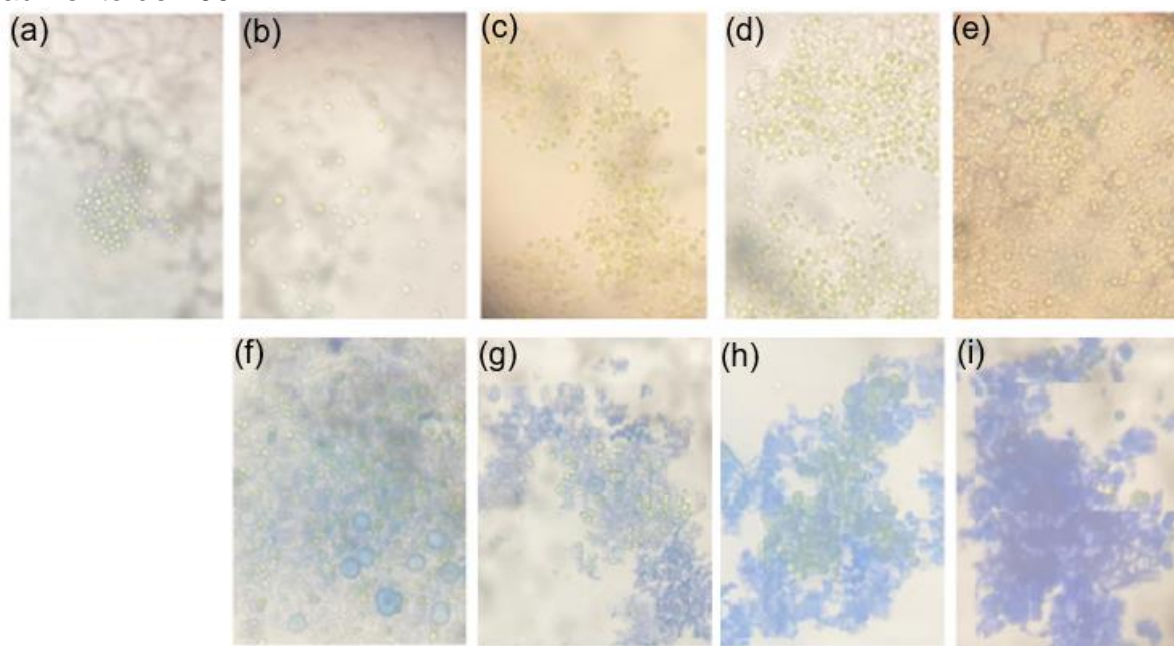
Figura 3.31 – Imagens do teste de viabilidade celular realizado para a condição 2 – cultivo da *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (Cvg-40Vnat), onde a) imagem do cultivo (aumento 40x); b) a e) imagens da microalga submetidas a 4 concentrações de sulfato de alumínio (aumento de 200x); e f) a i) imagens da microalgas nas 4 concentrações de sulfato de alumínio com corante azul de tripano e aumento de 200x).



Na Figura 3.31, que corresponde ao cultivo da *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% (Cvg-40Vnat), foi possível verificar na imagem (a) as microalgas se encontravam preservadas, mantendo a aparência normal (formato arredondado esverdeado e bem definido). Na imagem b, pode-se observar que, quando a concentração de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de alumínio foi utilizada, as microalgas não apresentaram diferenças em sua morfologia, mantendo seu formato arredondado esverdeado e bem definido. Porém, a partir da concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de alumínio representado pela imagem (c) até a concentração 100 g.L^{-1} de sulfato de alumínio representado pela imagem (e), foi possível comprovar alterações na estrutura das células algais apresentando estruturas mais ovaladas e maiores do que as observadas na imagem a. Além disso, pode-se observar que algumas células estavam

em estado de lise (ruptura). Essa confirmação pode ser comprovada observando as imagens (g) a (i), que mostram manchas azuis que são devido à reação do corante azul de tripano e do protoplasma das células que se romperam e se difundiram na lâmina. Vale mencionar, que antes de usar o sulfato de alumínio, as células da *Chlorella vulgaris* em vinhaça *in natura* diluída a 40% estavam intactas, mostrando a viabilidade do cultivo de microalgas submetido a um resíduo agroindustrial como a vinhaça.

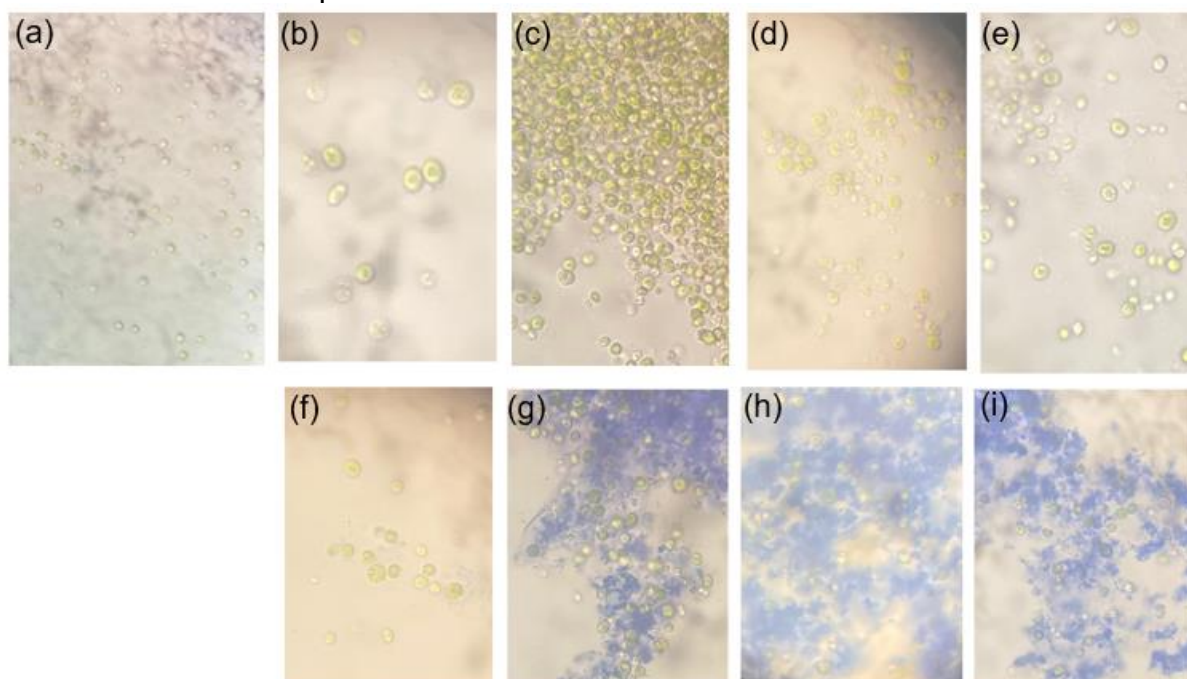
Figura 3.32 – Imagens do teste de viabilidade celular realizado para a condição 3-*Chlorella sorokiniana* em vinhaça biodigerida diluída a 60% (Csk-60Vbio), onde a) imagem do cultivo (aumento 40x); b) a e) imagens da microalga submetidas a 4 concentrações de sulfato de alumínio (aumento de 200x); e f) a i) imagens da microalgas nas 4 concentrações de sulfato de alumínio com corante azul de tripano e aumento de 200x.



Na Figura 3.32, que corresponde ao cultivo da *Chlorella sorokiniana* em vinhaça biodigerida diluída a 60% (Csk-60Vbio), foi possível verificar que na imagem (a) as microalgas se encontravam preservadas, mantendo a aparência normal (formato arredondado esverdeado e bem definido). No entanto, a partir da concentração de 0,8 g.L⁻¹ até a de 100 g.L⁻¹ de sulfato de alumínio observou-se pelas imagens de b até e que algumas células microalgais se encontravam em formato diferente do inicial (mais ovaladas e esverdeadas) e outras se encontravam rompidas. Esse resultado pode ser confirmado nas imagens de (f) a (i), que mostram manchas azuis no meio da lâmina causada pela reação do corante azul de tripano e do protoplasma das células que se

romperam e se difundiram na lâmina. É interessante apontar que antes do uso do sulfato de alumínio as células da microalga se mostravam intactas no cultivo da vinhaça o que facilita a obtenção das biomoléculas de interesse.

Figura 3.33 – Imagens do teste de viabilidade celular realizado para a condição 4-*Chlorella vulgaris* – 60Vbio, onde a) imagem inóculo (aumento 40x); b) a e) imagens da fase A (microalga nas 4 concentrações de sulfato de alumínio e aumento de 200x); e f) a i) imagens da fase C (microalgas nas 4 concentrações de sulfato de alumínio com corante azul de tripano e aumento de 200x)



Na Figura 3.33, que corresponde ao cultivo da *Chlorella vulgaris* em vinhaça biodigerida diluída a 60% (Cvg-60Vbio), foi possível verificar que na imagem (a) as microalgas se encontravam preservadas, mantendo a aparência normal (formato arredondado esverdeado e bem definido). Na imagem b, pode-se observar que, quando a concentração de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de alumínio foi utilizada, as microalgas não apresentaram diferenças em sua morfologia, mantendo seu formato arredondado esverdeado e bem definido. Porém, a partir da concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de alumínio representado pela imagem (c) até a concentração 100 g.L^{-1} de sulfato de alumínio representado pela imagem (e), foi possível comprovar alterações na estrutura das células algais apresentando estruturas mais ovaladas e maiores do que as

observadas na imagem a. Além disso, pode-se observar que algumas células estavam em estado de lise celular. Essa confirmação pode ser comprovada observando as imagens (g) a (i), que mostram manchas azuis que são devido à reação do corante azul de tripano com os protoplasmas das células que se romperam e se difundiram na lâmina. Cumpre ressaltar que, antes de usar o sulfato de alumínio, as células da *Chlorella vulgaris* em vinhaça biodigerida diluída a 60% estavam intactas, mostrando a viabilidade do cultivo de microalgas no resíduo agroindustrial.

3.6 Considerações finais

A caracterização da vinhaça inicialmente foi válida por indicar diferenças importantes entre os dois tipos de vinhaça utilizados neste trabalho, vinhaça *in natura* e biodigerida. A vinhaça biodigerida, por já ter passado por um tratamento prévio de digestão anaeróbia, apresentou diferenças significativas como o pH alcalino e redução da ordem de 80% na concentração de sólidos suspensos totais, sendo fatores atrativos ao cultivo de microalgas, visto que as microalgas reconhecidamente se desenvolvem melhor em meios de cultivo alcalinos e conseguem obter melhor desempenho de fotossíntese em ambientes mais translúcidos.

O cultivo controle em meio sintético WC sob metabolismo fotoautotrófico foi importante para se ter uma referência ao longo dos experimentos deste capítulo. Na análise do crescimento microalgal e rendimento de biomassa (Experimento II), observou-se para as três cepas estudadas resultados superiores em vinhaça *in natura* e biodigerida quando comparada ao meio sintético WC. Esses resultados podem estar relacionados às diferenças entre os metabolismos do meio WC (fotoautotrófico) e dos experimentos contendo a vinhaça (mixotrófico), sendo o metabolismo mixotrófico reconhecido na literatura por promover resultados de crescimento e produtividade de biomassa superiores, devido à a capacidade de uso combinado da luz e fonte de carbono orgânico. Outro fator importante que justifica esse achado se relaciona à presença da matéria orgânica e dos nutrientes na vinhaça *in natura* (Vnat) e na biodigerida (Vbio) que favoreceram o crescimento das microalgas estudadas quando comparado a condição controle do meio sintético WC.

A vinhaça tanto *in natura* quanto biodigerida pode ser utilizada como meio de cultivo para as microalgas sem a necessidade de grandes diluições. Isso mostra uma vantagem, visto que antes eram usados percentuais baixos de vinhaça (apenas 10% da vinhaça para 90% de diluição), o que implicava em grandes volumes de água gastos para a diluição. A água é um recurso valioso e nesse sentido observou-se que a água deionizada utilizada neste trabalho não seria a mais indicada, principalmente devido aos custos ambientais e econômicos relacionados ao seu uso. Portanto, outras alternativas como o uso da água da chuva (a depender da região do país) ou reuso de água de processos internos das próprias usinas sucroalcooleiras ou outros efluentes tratados podem contribuir com a diluição da vinhaça como meio de cultivo para microalgas.

Em relação às microalgas, pode-se observar que as microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* foram capazes de utilizar os nutrientes disponíveis na vinhaça e obterem taxas de crescimento melhores que a cepa *Desmodesmus sp.* que se adaptou somente a condições de diluição mais baixas (5Vnat e 20Vbio), mostrando que essa microalga precisa de meios mais translúcidos para se desenvolver e ambientes com menor adversidade (menor concentração de matéria orgânica, de compostos tóxicos e menor concentração de íons).

Além das melhores taxas de crescimento e rendimento de biomassa microalgal, as cepas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris*, também, alcançaram os melhores resultados finais de clorofila *a*, em 30% para *Chlorella vulgaris* e 40% para *Chlorella sorokiniana* em vinhaça *in natura*. Em vinhaça biodigerida, *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* se destacaram nas diluições de 60% e 80%. Com valores próximos ou até mesmo superiores à literatura, estes resultados de produção de clorofila *a* podem ser considerados promissores uma vez que esta é uma valiosa biomolécula no mercado nutricional e farmacêutico por sua ação antioxidante.

Vale destacar que mesmo não sendo aplicados diferentes pré-tratamentos e os cultivos em vinhaça terem sido não-axênicos, pode-se obter resultados interessantes para o cultivo de microalgas clorofíceas, principalmente para as cepas do gênero *Chlorella* que são reconhecidas por sua robustez e adaptação a diferentes águas residuárias.

A análise das imagens microscópicas foi uma alternativa encontrada para verificar tanto a sobrevivência das microalgas quanto a sua interação com os demais microrganismos presentes na vinhaça. Contudo, a contaminação apresentada nas amostras dificultou a execução de outras ferramentas de avaliação, como a contagem e o biovolume. Além disso, considera-se uma lacuna neste trabalho a falta de identificação dos outros microrganismos presentes nas amostras.

Mesmo assim pode-se atestar a presença de microalgas em concentrações elevadas de vinhaça, o que foi satisfatório para o estudo. No caso, para *Chlorella vulgaris* os melhores cultivos observados foram entre 30% e 60% de diluição na vinhaça *in natura* (30Vnat a 60Vnat) e entre 40% e 80% de diluição na vinhaça biodigerida (40Vbio e 80Vbio). Para *Chlorella sorokiniana*, os melhores cultivos observados foram entre 30% e 60% de diluição na vinhaça *in natura* (30Vnat a 60Vnat) e entre 30% e 80% de diluição na vinhaça biodigerida (30Vbio a 80Vbio).

Na cepa *Desmodesmus sp.*, que não se adaptou satisfatoriamente ao resíduo, apenas observou-se pelas imagens as melhores condições em diluição de 40% para a vinhaça *in natura* (40Vnat) e 5% para a vinhaça biodigerida (5Vbio). Não foi possível definir o que limitou o crescimento de *Desmodesmus sp.* nos dois tipos de vinhaça. De modo geral, por se tratar de um cultivo não-axênico era esperado a presença de outros microrganismos e pode-se observar que mesmo em consórcio as algas conseguiram se desenvolver em elevadas diluições.

CONCLUSÃO

De acordo com a primeira hipótese deste trabalho, pode-se concluir que foi possível realizar o cultivo não axênico em fotobiorreatores com capacidade de 50 mL e de 5 L, com elevadas concentrações de vinhaça *in natura* e biodigerida. Desta forma, o uso destes resíduos é uma estratégia tecnicamente viável para a produção da biomassa apenas para as microalgas clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*. Por outro lado, a cepa *Desmodesmus sp.* não se desenvolveu bem nas condições testadas, principalmente em elevadas concentrações de vinhaça (diluições maiores que 20% de vinhaça).

Para futuros trabalhos, sugere-se a otimização dos parâmetros de cultivos das microalgas clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana* nas diluições de 30% e 40% da vinhaça *in natura* e nas diluições de 60% e 80% da vinhaça biodigerida, avaliando a influência da temperatura, da intensidade luminosa, do pH inicial e do fornecimento de CO₂. Além da otimização sugere-se a investigação de possíveis produtos de interesse, visto que neste trabalho apenas um produto de interesse se destacou, com valores próximos ou até mesmo superiores à literatura: clorofila a.

Em relação à segunda e à terceira hipótese, analisando a remoção de nutrientes pelas microalgas, observou-se que principalmente as cepas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana* tiveram eficiências de remoção de nutrientes significativas. No entanto, devido à alta disponibilidade de nutrientes presentes na vinhaça *in natura* e biodigerida, estas algas não conseguiram remover todos os compostos, destacando-se, principalmente, a elevada presença de potássio ao final dos experimentos com a diluição de 40 % de vinhaça *in natura* (40Vnat) e de 60% de vinhaça biodigerida (60Vbio). O potássio é considerado o elemento principal para a definição da aplicação de vinhaça como fertilizante em lavouras de cana-de-açúcar. Diante desse fato, a disponibilidade de potássio observada no meio de cultivo após o período experimental permite que este meio de cultivo, retorne ao solo como fertilizante para as culturas de cana-de-açúcar, dentro dos padrões de diluição indicados pela norma ambientais vigentes.

Os testes de fluorescência de clorofila *a* e de viabilidade celular foram considerados instrumentos válidos para o monitoramento das microalgas ao final dos cultivos. No entanto, houve uma carência na confirmação das cepas existentes ao final dos tratamentos. O uso de ferramentas de identificação por biologia molecular seria essencial para a confirmação das espécies presentes ao final dos estudos. Em relação a avaliação da viabilidade celular da biomassa algal ao final dos cultivos, o teste de viabilidade celular mostrou ser relevante e importante, podendo ser indicado como ferramenta de acompanhamento da fisiologia das microalgas ao longo do tempo, principalmente, quando se tem escalas maiores de cultivo e se faz necessário manter a integridade das células. O intuito de realizar a verificação da viabilidade celular, além de atestar a fisiologia das células microalgais, também se relaciona ao modo de extração da biomassa algal.

O uso de diferentes microalgas neste estudo permitiu a comparação entre as tolerâncias aos tipos de vinhaça testados e contribuiu para o entendimento e seleção de linhagens para aplicações biotecnológicas. Portanto, diante das informações geradas, espera-se que possam auxiliar no aperfeiçoamento de futuras pesquisas. Além disso, que agregue conhecimento ao desenvolvimento de novas tecnologias que permitam o aperfeiçoamento da produção de microalgas em vinhaça.

REFERÊNCIAS

- ADORNO, M.A.T., HIRASAWA, J.S., VARESCHE, M.B.A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, p. 406–414, 2014.
- Algur, O.F., Kadioglu, A. The effects of vinasse on the growth, biomass and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 39, p. 139–144, 1992.
- ANDERSEN, R. Algal Culturing Technique. San Diego. Elsevier, 2005.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (2014). Microalgas de Águas Continentais: Produção de Biomassa e Coprodutos. Londrina, IAPAR, 2014, v. 2, 443 p. ISBN 978-85-8818-449-7
- ANDRADE, L.M. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrofotometria de massas**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- ANSARI, F. A.; SINGH, P.; GULDHE, A.; BUX, F. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: integrated biomass generation and nutrient remediation. **Algal Research**, v. 21, p. 169-177, 2017.
- APHA – American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005.
- APHA – American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.
- APHA – American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- ARAVANTINOU, A. F.; THEODORAKOPOULOS, M. A.; MANARIOTIS, I. D. Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. **Bioresource Technology**, v. 147, 130-134. (2013)
- AYALA, J.F.; BRAVO, B.P. Animal wastes media for Spirulina production. **Algological Studies**, v. 67, p. 349–355, 1984.
- BARTLEY, M. L.; BOEING, W. J.; DUNGAN, B. N.; HOLGUIN, F. O.; SCHAUB, T. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1431-1437, 2014.
- BAUMGARTNER, T. R.S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 250–255, 2013.

BEBÉ F.V.; ROLIM M.M.; PEDROSA E.M.; SILVA G.B.; OLIVEIRA V.S. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 781-787, 2009.

BONINI, M.D.A.. **Potencial de utilização de vinhaça como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*: aspectos toxicológicos e microbiológicos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

BORDONAL, R.O.; CARVALHO, J. L. N.; LAL, R.; FIGUEIREDO, E. B.; OLIVEIRA, B. G.; SCALA, N. L. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, 13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0490-x>

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

BUCHANAN, I. D.; NICELL, J. A. Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, n.3, p. 251-261, 1997.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.

CANDIDO, C. **Fisiologia de microalgas em vinhaça tratada e a temática dos resíduos na educação ambiental**. 2019. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2019.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. Growth of *Chlorella vulgaris* in treated conventional and biodigested vinasses. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 45–53, 2017.

CANDIDO, C.; LOMBARDI A.T. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal Research**, v. 30, p. 79-85, 2018.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. Mixotrophy in green microalgae grown on an organic and nutrient rich waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.36, 20, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2802-y>

CARMO J.B.D.; FILOSO S.; ZOTELLI L.C.; DE SOUSA NETO, E.R.; PITOMBO L.M.; DUARTE-NETO, P.J.; CANTARELLA, H. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **Gcb Bioenergy**, v. 5, n. 3, p. 267-280, 2013.

CARVALHO, V. C. F.; KESSLER, M.; FRADINHO, J. C.; OEHMEN, A.; REIS, M. A. M. Achieving nitrogen and phosphorus removal at low C/N ratios without aeration through a novel phototrophic process. **Science of The Total Environment**, 148501, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148501>

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2006). **Vinhaça critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. Norma Técnica P4.231**. São Paulo:CETESB, 2006. 12p.

CHEN R; BLAGODATSKAYA E; SENBAYRAM M; BLAGODATSKY S; MYACHINA O; DITBERT K; KUZYAKOV Y Decomposition of biogas residues in soil and their effects on microbial growth kinetics and enzyme activities. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 221-229, 2012.

CHENG, J.; YE, Q.; LI, K.; LIU, J.; SHOU, J. Removing ethinylestradiol from wastewater by microalgae mutant *Chlorella* PY-ZU1 with CO₂ fixation. **Bioresource Technology**, v. 249, n. February 2018, p. 284–289, 2018.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.

COLUSSE, G. A.; DUARTE, M. E. R.; DE CARVALHO, J. C.; NOSEDA, M. D. Media effects on laboratory scale production costs of *Haematococcus pluvialis* biomass. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, 100236, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100236>

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Planejamento Energético**, v. 2, n.2, 1-17, 1992.

COSTA, R.H.; MEDRI, W.; PERDOMO, C.C. High-rate pond for treatment of piggery wastes. **Water Science and Technology**, v. 42, n.10-11, p. 357–362, 2000.

CRISTÓBAL, J.; MATOS, C.T.; AURAMBOUT, J. P.; MANFREDI, S.; KAVALOV, B. Environmental sustainability assessment of bioeconomy value chains. **Biomass and Bioenergy**, v. 89, p. 159–171, 2016.

CRUZ, J.I.D.; PORTUGAL, R.D.S.; LUCENDO, M.; ELIS, V.R.; FACHIN, S.J.D.S.; USTRA AT; BORGES, W.R. Detecção de contaminação de solo por vinhaça através de análise de dados de eletrorresistividade. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 26, n. 4, p. 481-492. 2008.

DANESHVAR, E.; ZARRINMEHR, M.J.; KOUTRA, E.; KORNAROS, M.; FARHADIAN, O.; BHATNAGAR, A. Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition. **Bioresource Technology**, v. 273, n. February 2019, p. 556–564, 2019.

DEL NERY, V.; ALVES, I.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; PIRES, E. C. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 411-417, 2018.

DELGADILLO-MIRQUEZ, L.; LOPES, F.; TAIDI, B.; PAREAU, D., Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. **Biotechnology Reports**, v. 11, n. September 2016, p. 18–26, 2016.

DICKINSON, S.; MIENTUS, M.; FREY, D.; AMINI-HAJIBASHI, A.; OZTURK, S.; SHAIKH, F.. EL-HALWAGI, M. M. A review of biodiesel production from microalgae. **Clean technologies and Environmental Policy**, v. 19, n. 3, p. 637-668, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ELISABETH, B.; RAYEN, F.; BEHNAM, T. Microalgae culture quality indicators: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 457–473, 2021.

ERMIS, H., GUVEN-GULHAN, U., CAKIR, T., & ALTINBAS, M. Effect of iron and magnesium addition on population dynamics and high value product of microalgae grown in anaerobic liquid digestate. **Scientific Reports**, 3510, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020->

60622-1

ESPAÑA-GAMBOA E.; MIJANGOS-CORTES J.; BARAHONA-PEREZ L.; DOMINGUEZ-MALDONADO J.; HERNÁNDEZ-ZARATE G.; ALZATE-GAVIRIA L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, p.1235-1250, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1177/0734242X10387313>

FADEL, M.; ZOHRI, A. N. A.; MAKAWY, M.; HSONA, M. S.; ABDEL-AZIZ, A. M. Recycling of vinasse in ethanol fermentation and application in Egyptian distillery factories. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 47, 2014.

FARHAT, N.; ELKHOUNI, A.; ZORRIG, W.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C.; RABHI, M. Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning. **Acta physiologiae plantarum**, v.38, n. 6, 145, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2165-z>

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N., KOYAMA, M. H., DE ARAÚJO JÚNIOR, M. M., ZAIAT, M. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245-252, 2016.

FERREIRA, G. F.; RIOS PINTO, L. F.; CARVALHO, P. O.; COELHO, M. B.; EBERLIN, M. N.; MACIEL FILHO, R.; FREGOLENTE, L. V. Biomass and lipid characterization of microalgae genera *Botryococcus*, *Chlorella*, and *Desmodesmus* aiming high-value fatty acid production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 5, p.1675-1689, 2021.

FERREIRA, G. F.; PINTO, L. F. R.; MACIEL FILHO, R.; FREGOLENTE, L. V. Effects of cultivation conditions on *Chlorella vulgaris* and *Desmodesmus* sp. grown in sugarcane agro-industry residues. **Bioresource Technology**, v.342, 125949, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125949>.

FILOSO, S.; DO CARMO, J. B.; MARDEGAN, S. F.; LINS, S. R. M.; GOMES, T. F.; MARTINELLI, L. A. Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, December 2015, p.1847–1856, 2015.

FU, L.; LI, Q.; YAN, G.; ZHOU, D.; CRITTENDEN, J. C. Hormesis effects of phosphorus on the viability of *Chlorella regularis* cells under nitrogen limitation. **Biotechnology for biofuels**, v.12, 121, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1458-z>

FUESS, L. T. **Biodigestão anaeróbia termofílica de vinhaça em sistemas combinados do tipo acidogênico-metanogênico para potencialização da recuperação de bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira geração**. 2017. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2017.

FUESS, L. T.; RODRIGUES, I. J.; GARCIA, M. L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 52, n. 11, p. 1063-1072, 2017

FUESS, L. T., GARCIA, M. L., ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 29-40, 2018.

GALVEZ, A; SINICCO, T; CAYUELA, ML; MINGORANCE, MD; FORNASIER, F; MONDINI, C Short term effects of bioenergy by-products on soil C and N dynamics, nutrient availability and biochemical properties. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.160, p.3-14, 2012.

GOLLO, A.L.; SILVA A.L.L.; LIMA, K.K.D.; COSTA J.D.L.; CAMARA M.C.; BIASI L.A.; SOCCOL C.R. Developing a plant culture medium composed of vinasse originating from *Haematococcus pluvialis* Culture. **Pakistan Journal of Botany**, v. 48, n. 1, p. 295-303, 2016.

GREENHILL, S. (2004) Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel. US Patent WO 2004/059315

GRIFFITHS, M.J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R.P.; HARRISON, S.T.L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 119-123, 2011.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

GUPTA, S.; PAWAR, S. B.; PANDEY, R. A. Current practices and challenges in using microalgae for treatment of nutrient rich wastewater from agro-based industries. **Science of the Total Environment**, v. 687, p. 1107–1126, 2019.

HOSSAIN, N.; MAHILA, T.M.I. Progress in physicochemical parameters of microalgae cultivation for biofuel production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 835-859, 2019.

HUY, M.; KUMAR, G.; KIM, H. W.; KIM, S. H. Photoautotrophic cultivation of mixed microalgae consortia using various organic waste streams towards remediation and resource recovery. **Bioresour Technol**, v. 247, p. 576-581, 2018.

JIMENEZ-PEREZ, M.V.; SANCHEZ-CASTILLO, P.; ROMERA, O.; FERNANDEZ-MORENO, D.; PEREZ-MARTINEZ, C. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n.5, p. 392-398, 2004.

KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; YEW, G. Y.; LEONG, W. H.; CHAI, Y. H.; SHOW, P. L.; CHEN, W. H. Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production. **Bioresour Technol**, v.304, 122996, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122996>.

KIM, S.; LEE, Y.; HWANG, S. J. Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 511-516, 2013.

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 1376-1392, 2018.

LEITE, L. S. DE; DANIEL, L. A. Optimization of microalgae harvesting by sedimentation induced by high pH. **Water Science and Technology**, v. 82, n. 6, p. 1227–1236, 2020.

LING, J.; NIP, S.; CHEOK, W. L.; ALVES DE TOLEDO, R.; SHIM, H. Lipid production by a mixed culture of oleaginous yeast and microalga from distillery and domestic mixed wastewater. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 132–139, 2014.

LISKA, A. J.; CASSMAN, K.G. Towards Standardization of Life-Cycle Metrics for Biofuels: Greenhouse Gas Emissions Mitigation and Net Energy Yield. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v.2, n. 3, p. 187-203, 2008.

LONGATI, A.A.; LINO, A.R.A.; GIORDANO, R.C.; FURLAN, F.F.; CRUZ, A.J.G. Biogas production from anaerobic digestion of vinasse in sugarcane biorefinery: A Techno- economic and environmental analysis. **Waste Biomass Valorization**, v. 11, p. 4573–4591, 2019.

MAGALHÃES, A.I.; DE CARVALHO, J.C.; DE MELO PEREIRA, G.V.; KARP, S.G.; CAMARA, M.C.; MEDINA, J.D.C.; SOCCOL, C.R. Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, p. 1505–1519, 2019.

MARCHELLO, A.E.; LOMBARDI, A.T.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; SOUZA, C.W.O. Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n.1, p. 75-84, 2015.

MARIN, A.R.; ESPINOSA, L. G. M; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 58-64, 2010.

MEDEIROS, V. P. B. DE; PIMENTEL, T. C.; VARANDAS, R. C. R.; DOS SANTOS, S. A.; DE SOUZA PEDROSA, G. T.; DA COSTA SASSI, C. F.; MAGNANI, M. Exploiting the use of agro-industrial residues from fruit and vegetables as alternative microalgae culture medium. **Food Research International**, v.137, 109722, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109722>.

MENANDRO, L.M.S.; CANTARELLA, H.; FRANCO, H.C.J.; KÖLLN, O.T.; PIMENTA, M.T.B.; SANCHES, G.M.; RABELO, S.C.; CARVALHO, J.L.N. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Bioproducts and Biorefining**, v. 11, p. 488–504, 2017.

MERA, R.; TORRES, E.; ABALDE, J. Effects of sodium sulfate on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii*: implications for the optimization of algal culture media. **Journal of phycology**, v.52, n. 1, p. 75-88, 2016.

METTING JR., F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology**, v.17, p. 477-489, 1996.

MITRA D.; VAN LEEUWEN J.H.; LAMSAL B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v.1, p. 40–48, 2012.

MORAES B.S.; JUNQUEIRA T.L.; PAVANELLO L.G.; CAVALETT O.; MANTELATTO P.E.; BONOMI A; ZAIAT M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825- 835, 2014.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015.

NAABB (2014) National Alliance for Advanced Biofuels and Bio-products (NAABB) Synopsis. United States Dep Energy; Off Energy Effic Renew Energy; Natl Alliance Adv Biofuels Bio-products 150.

NUR, M. M. A.; BUMA, A. G. Opportunities and challenges of microalgal cultivation on wastewater, with special focus on palm oil mill effluent and the production of high value compounds. **Waste and Biomass Valorization**, v.10; n. 8, p. 2079-2097, 2019.

NUSCH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaepigment. **Archiv für Hydrobiologie**, v.14, p. 14-36, 1980.

OLGUÍN, E.J.; DORANTES, E.; CASTILLO, O.S.; HERNÁNDEZ-LANDA, V.J. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. **Journal of applied phycology**, v.27, n.5, p. 1813-1822, 2015.

OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP – 211 / 11b)**. 1988. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos. 1988

PACHECO, M. M.; HOELTZ, M.; MORAES, M. S.; SCHNEIDER, R. C. Microalgae: cultivation techniques and wastewater phycoremediation. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, n. 50, v. 6, p. 585-601, 2015.

PIPPO, W.A.; LUENGO, C.A.; ALBERTERIS, L.A.M.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G.; Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. **Waste Biomass Valorization**, v. 2, p.1–16. 2011.

PIRES, J.C.M.; ALVIM-FERRAZ, M.C.M; MARTINS, F.G.; SIMÕES, M. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 5096–5105, 2013.

POKOO-AIKINS, G.; NADIM, A.; EL-HALWAGI, M.M.; MAHALEC, V. Design and analysis of biodiesel production from algae grown through carbon sequestration. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 12, n. 3, p. 239–254, 2010.

PRADO, R.D.M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C.N.S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, 2013, 581984, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/581984>

PURKAYASTHA, J.; BORA, A.; GOGOI, H. K.; SINGH, L. Growth of high oil yielding green alga *Chlorella ellipsoidea* in diverse autotrophic media, effect on its constituents. **Algal Research**, v.21, p. 81-88, 2017.

QIU, R.; GAO, S.; LOPEZ, P. A.; OGDEN, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 28, p. 192-199, 2017.

QUINTERO-DALLOS, V; GARCIA-MARTÍNEZ, J. B.; CONTERAS-ROPERO, J. E.; BARAJAS-SOLANO, A. F.; BARAJAS-FERREIRA, C.; LAVECCHIA, R.; ZURRO, A. Vinasse as a Sustainable Medium for the Production OF *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. **Water**, v.11, n.8, 1526, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/w11081526>

RAMIREZ, N.N.V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER J.O. Growth of microalgae *Scenedesmus sp* in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n. 5, p. 630-635, 2014.

RAZACK, S. A.; DURAIARASAN, S.; SHELLMITH, A. S.; MURALIKRISHNAN, K. Statistical optimization of harvesting *Chlorella vulgaris* using a novel bio-source, *Strychnos potatorum*. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 150-156, 2015.

RAZZAK, S. A.; ALI, S. A. M.; HOSSAIN, M. M.; DELASA, H. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 379–390, 2017.

REIS, C. E. R.; HU, B. Vinasse from sugarcane ethanol production: Better treatment or better utilization? **Frontiers in Energy Research**, v. 5, n. APR, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fenrg.2017.00007>

RIPPKA, R. Isolation and purification of Cyanobacteria. In: L. Pacher & A.N. Glazer (eds.). **Cyanobacteria Methods in Enzymology**. Blackwell, v. 167, p. 3- 27, 1979

ROBLES-GONZÁLEZ, V.; GALÍNDEZ-MAYER, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H.M. Treatment of mezcal vinasses: A review. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 4, p. 524-546, 2012.

ROSSI, R.A. **Seleção de microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* produtoras de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel**. 2013. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2013.

SAADI, F.N. **Fotobiorreator de iluminação interna para produção de biomassa algal e seus metabólitos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2018.

SAAVEDRA, M.D.M. **Processo integrado de eletrocoagulação e cultivo mixotrófico de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar**. 2019. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2019.

SALGUEIRO, J.L.; PEREZ, L.; MACEIRAS, R.; SANCHEZ, A.; CANCELA, A. Bioremediation of wastewater using *Chlorella vulgaris* microalgae: Phosphorus and organic matter. **International Journal of Environmental Research**, v. 10, n. 3, p. 465–470, 2016.

SANDER, K.; MURTHY, G. S. Life cycle analysis of algae biodiesel. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v.15, n.7, p. 704-714, 2010.

SANTANA, H.; CEREIJO, C.R.; TELES, V.C.; NASCIMENTO, R.C.; FERNANDES, M.S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R.C.; SOARES, I.P.; SILVA, F.C.P.; SABAINI, P.S.; SIQUEIRA, F. G.; BRASIL, B. S. A. F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 2017.

SANTOS, P.V. **Seleção de cepas oleaginosas da microalga *Chlorella spp.* e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel**. 2013. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2013.

SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES L.C. Uso de Vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108 – 14, 2007.

SILVA, M.A.; BARBOSA, G.H.; CODATO, C.B.; MATTOS, L.F.A.; BASTOS, R.G.; KIECKBUSCH, T.G. Heterotrophic growth of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* in ethanol distillation wastewater (vinasse) and lipid extraction with supercritical CO₂. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.92, p.573-579, 2017.

SILVA, T.L.D.; MONIZ, P.; SILVA, C.; REIS, A. The Role of Heterotrophic Microalgae in Waste Conversion to Biofuels and Bioproducts. **Processes**, 2021, 9, 1090, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr9071090>

SINGH, N.K.; PATEL, D.B. Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. In *Farming for Food and Water Security*; Lichtfouse, E., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2012; pp. 83–109.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep, 1995. 72 p.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos**. São Carlos: Editora RiMa.2001. 106 p.

SIQUEIRA, J. C.; BRAGA, M. Q.; ÁZARA, M. S.; GARCIA, K. J.; ALENCAR, S. N. M.; RAMOS, T. S.; ENSINAS, A. V. Recovery of vinasse with combined microalgae cultivation in a conceptual energy-efficient industrial plant: Analysis of related process considerations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.155, 111904, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111904>.

SOTO, M. F.; DIAZ, C. A.; ZAPATA, A. M.; HIGUITA, J. C. BOD and COD removal in vinasses from sugarcane alcoholic distillation by *Chlorella vulgaris*: Environmental evaluation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 176, 108191, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108191>

STICKLAND, L. H.. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. **Microbiology**, v.5, n. 4, p.698-703, 1951.

SU, Y. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, 762, 144590, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>

SUBHADRA, B. G. Water management policies for the algal biofuel sector in the Southwestern United States. **Applied Energy**, v.88, n. 10, p.3492-3498, 2011.

SYDNEY, E. B.; NETO, C. J. D.; DE CARVALHO, J. C.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P.; SYDNEY, A. C. N.; LETTI, L. A. J.; SOCCOL, C. R. Microalgal biorefineries: Integrated use of liquid and gaseous effluents from bioethanol industry for efficient biomass production. **Bioresource Technology**, v.292, 121955, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121955>

SYDNEY, E. B.; CARVALHO, J.C DE; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; MARTINEZ-BURGOS, W. J.; CANDEO, E. DE S.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. DE S.; DALMAS NETO, C. J.; MEDEIROS, A. B. P.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Current developments and challenges of green technologies for the valorization of liquid, solid, and gaseous wastes from sugarcane ethanol production. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, , 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124059>.

TAKAHASHI, T. Applicability of Automated Cell Counter with a Chlorophyll Detector in Routine Management of Microalgae. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

TAYLOR, K. A. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 49-58, 1996.

TREVISAN, E.; GODOY, R. F. B.; RADOMSKI, F. A. D.; CRISIGIOVANNI, E. L.; BRANCO, K. B. Z. F.; ARROYO, P. A. *Chlorella vulgaris* growth in different biodigested vinasse concentrations: biomass, pigments and final composition. **Water Science and Technology**, v. 82, n. 6, p. 1111-1119, 2020.

TRIPATHI, R.; SINGH, J.; THAKUR, I. S. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 74, p. 774-781, 2015.

UNICA. União da indústria de cana-de-açúcar (2017). **Etanol, açúcar e energia. São Paulo**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 10.12.2019.

VARGAS, S.R. **Produção de hidrogênio por Chlamydomonas spp. e Anabaena spp.** 2016. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2016.

WALTER, A.; DOLZAN, P.; QUILODRÁN, O.; DE OLIVEIRA, J. G.; DA SILVA, C.; PIACENTE, F.; SEGERSTEDT, A. Sustainability assessment of bio-ethanol production in Brazil considering land use change, GHG emissions and socio-economic aspects. **Energy Policy**, v. 39, p. 5703–5716, 2011.

XIN, C.; ADDY, M.M.; ZHAO, J.; CHENG, Y.; CHENG, S.; MU, D.; LIU, Y.; DING, R.; CHEN, P.; RUAN, R. Comprehensive techno-economic analysis of wastewater-based algal biofuel production: a case study. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 584–593, 2016.

YANG, J.; XU, M.; ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; CHEN, Y.. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 159–165, 2011.

YANG, X.; WANG, K.; WANG, H.; ZHANG, J.; MAO, Z. Ethanol fermentation characteristics of recycled water by *Saccharomyces cerevisiae* in an integrated ethanol-methane fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 609–614, 2016.

YIN, Z.; ZHU, L.; LI, S.; HU, T.; CHU, R.; MO, F.; LI, B. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. **Bioresource Technology**, v.301, 122804, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>

ZHANG, Y. M.; CHEN, H.; HE, C. L.; WANG, Q. Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. **PLoS one**, v.8, n.7, e69225, 2013). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.006922>

ZHANG, C.; LI, S.; HO, S. H. Converting nitrogen and phosphorus wastewater into bioenergy using microalgae-bacteria consortia: a critical review. **Bioresource Technology**, v. 342, 126056, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126056>

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875-1881, 1990.