

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica  
Área de Tecnologia de Fermentações

**Avaliação do crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em  
fotobiorreator tubular empregando nutrientes provenientes da  
vinhaça tratada**

**Lauris del Carmen Mejia da Silva**

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: **Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho**  
Co-orientadora: **Profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna**

São Paulo  
2020

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica  
Área de Tecnologia de Fermentações

**Avaliação do crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em  
fotobiorreator tubular empregando nutrientes provenientes da  
vinhaça tratada**

**Lauris del Carmen Mejia da Silva**

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: **Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho**  
Co-orientadora: **Profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna**

São Paulo  
2020

Autorizo a reprodução e divulgação 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 eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M516a Mejia da Silva, Lauris del Carmen  
Avaliação do crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em fotobiorreator tubular empregando nutrientes provenientes da vinhaça tratada / Lauris del Carmen Mejia da Silva. - São Paulo, 2020.  
92 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.  
Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de  
Coorientador: Sant'Ana, Célia Leite

1. Tratamento de efluentes: Vinhaça. 2. Biomassa Microbiana . 3. Micro-organismos fotossintetizantes. 4. Biotecnologia . 5. Bioquímica microbiana. I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador. III. Sant'Ana, Célia Leite , coorientador.

**Lauris del Carmen Mejia da Silva**

**Avaliação do crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em fotobiorreator  
tubular empregando nutrientes provenientes da  
vinhaça tratada**

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho  
orientador/presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

São Paulo, 20 de janeiro de 2020.

*A meu esposo Mario e  
a minha filha Maria Fernanda,  
obrigada por fazerem parte da minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, por sua orientação, por todos os aprendizados e pela confiança depositada em mim durante todo este tempo.

A profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna, pela coorientação, por sua disponibilidade e valiosa contribuição na identificação dos micro-organismos fotossintetizantes.

A meu esposo Mario, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e pela compreensão e paciência demonstrada durante o período do projeto.

A minha filha Maria Fernanda por encher a minha vida de alegrias e amor, quando eu mais preciso. Você é a minha inspiração para alcançar todos meus objetivos.

A meus pais, Martin Mejia e Amilys Doria, pelos valores que me inculcaram e pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Jahidyt e Iver, embora estando longe são uma parte importante da minha vida.

A todos meus familiares e amigos que me apoiaram sempre e torcem pelo meu sucesso.

Aos colegas do laboratório, Marcelo, Lina, Evellin e, Eleane, agradeço a todos pela amizade, pela colaboração e pela convivência no laboratório, foi um prazer trabalhar com vocês.

Institucionalmente, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica por ter-me acolhido todo o tempo da minha pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de estudo concedida para meu doutorado e para concretização desta pesquisa.

A Deus, por ser minha força em momentos de fraqueza e por me dar uma vida cheia de aprendizado, experiências e acima de tudo felicidade.

*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada,  
ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.*

**Albert Einstein**

## RESUMO

MEJIA, L. C. **Avaliação do crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em fotobiorreator tubular empregando nutrientes provenientes da vinhaça tratada.** 2020. 92 p. (Tese de Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2020.

A vinhaça é resultante da produção de álcool, após a fermentação do mosto e destilação do vinho. É um resíduo rico em nutrientes, principalmente matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e potássio. Para ser despejado em rios e lagos, esse efluente deve passar por tratamentos para remoção desses nutrientes, pois o excesso desses elementos nos corpos hídricos poderia levar a grandes problemas ambientais, de modo que tem sido utilizado em fertirrigação. Micro-organismos fotossintetizantes absorvem nutrientes inorgânicos, podendo absorver nutrientes de águas residuais. Se for removida a parte orgânica da vinhaça, a fração inorgânica ou com baixa carga orgânica pode ser a base ou o próprio meio de cultivo destes micro-organismos, que absorvem gás carbônico e sua biomassa é de interesse industrial. Neste contexto, foi estudado o cultivo de *Monoraphidium contortum* e *Synechocystis salina*, oriundos de água de mangue, em frascos de Erlenmeyer e em fotobiorreatores tubulares por processo descontínuo, empregando a vinhaça proveniente do tratamento aeróbio (biológico), acoplada a processos físico-químicos, com diferentes diluições. As características físico-químicas das vinhaças tratadas foram avaliadas. Além disso, foram comparados os crescimentos celulares nas diferentes condições experimentais adotadas para o crescimento da microalga *M. contortum* e da cianobactéria *S. salina* na vinhaça tratada com e sem diluição. Em cultivos em frascos de Erlenmeyer, em meio proveniente de tratamento biológico, o crescimento celular não diferiu do cultivo em meio padrão, com diluições de 5 e 2 vezes da vinhaça tratada para *M. contortum* e *S. salina*, respectivamente. Em fotobiorreator tubular, independente do tratamento ser apenas biológico ou também com carvão ativado, as concentrações celulares máximas ( $X_m$ ) de *M. contortum* e *S. salina* foram da ordem de  $1,86 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  e  $7,90 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, valores esses menores que os obtidos em meio padrão, com valores de  $X_m$  de  $2,69 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  e  $1,27 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para *M. contortum* e *S. salina*, respectivamente. Em fotobiorreatores tubulares, os teores de mínimos de lipídios de *M. contortum* e *S. salina* foram de 33,4 % e 11,0 %, respectivamente. Adicionalmente, os teores mínimos de proteínas da microalga foram de 15,1 % e da cianobactéria foi de 23,2 %.

**Palavras-chaves:** micro-organismos fotossintetizantes, vinhaça, tratamento biológico aeróbio, tratamento físico-químico, biomassa microbiana.

## ABSTRACT

MEJIA, L. C. **Evaluation of the growth of photosynthetic microorganisms in tubular photobioreactor using nutrients from treated vinasse.** 2020. 92 p. (Doctoral Thesis) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. 2020.

The vinasse is the result of the production of alcohol after the fermentation of the mash and the distillation of the wine. It is a waste rich in nutrients, mainly organic matter, nitrogen, phosphorus and potassium. To be discharged into rivers and lakes, this effluent must be treated in order to remove nutrients, because the excess of these elements in water bodies can lead to major environmental problems, so that it has been used in fertigation. Photosynthetic microorganisms absorb inorganic nutrients and they can absorb nutrients from wastewater. If the organic fraction of vinasse is removed, the inorganic or low organic fraction may be the basis or a medium of cultivation of these microorganisms, which absorb carbon dioxide and its biomass is of industrial interest. In this context, *Monoraphidium contortum* and *Synechocystis salina* from mangrove water were cultivated in Erlenmeyer flasks and in tubular photobioreactors by batch process using vinasse from aerobic biological treatment, coupled to physicochemical treatments with different dilutions. The physicochemical characteristics of the treated vinasse were evaluated. In addition, cell growth was compared under different experimental conditions adopted for growth of microalgae *M. contortum* and cyanobacteria *S. salina* in vinasse treated with and without dilution. In Erlenmeyer flask cultivations, in medium from the biological treatment, the cell growth was not different of that one in standard medium cultivation, with dilutions of 5 and 2 times the vinasse treated for *M. contortum* and *S. salina*, respectively. In the tubular photobioreactor, irrespective if the treatment is only biological or also is carried out treatment with activated charcoal, they were obtained maximum cell concentrations ( $X_m$ ) of *M. contortum* and *S. salina* of  $1.86 \times 10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  and  $7.90 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , respectively, lower than the standard, whose  $X_m$  values were  $2.69 \times 10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  and  $1.27 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  for *M. contortum* and *S. salina*, respectively. In tubular photobioreactors, the minimum lipid contents of *M. contortum* and *S. salina* were 33.4 % and 11.0 %, respectively. In addition, the minimum protein content of microalgae was 15.1 % and cyanobacterium was 23.2 %.

**Keywords:** photosynthetic microorganisms, vinasse, aerobic biological treatment, physicochemical treatment, microbial biomass.

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b>	Fluxograma da produção de etanol (de 1ª geração) e açúcar a partir da cana de açúcar, com a geração de vinhaça e outros subprodutos.	22
<b>Figura 2.</b>	Esquema da digestão anaeróbica	27
<b>Figura 3.</b>	<i>Monoraphidium contortum</i> .	38
<b>Figura 4.</b>	<i>Synechocystis salina</i> .	40
<b>Figura 5.</b>	Reator aeróbio	43
<b>Figura 6.</b>	Ensaio em <i>Jar Test</i> .	44
<b>Figura 7.</b>	(A) Cianobactéria <i>S. salina</i> (J2-5A-i2) (B) Microalga <i>Monoraphidium contortum</i> (CB3-b) (C) Microalga <i>Chlorella</i> (CB2-C) (D) Microalga <i>Elakatothrix</i> (CB2-b) e (E) Microalga <i>Monoraphidium contortum</i> (P3Fb-Re-b).	48
<b>Figura 8.</b>	Fotobiorreator tubular do tipo <i>air-lift</i>	52
<b>Figura 9.</b>	Vinhaça in natura antes da coagulação-floculação (A) e após precipitação (B).	57
<b>Figura 10.</b>	Demanda química de oxigênio (DQO) em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do primeiro conjunto de experimentos.	59
<b>Figura 11.</b>	Nitrogênio total (◆) e nitrato total (△) em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do primeiro conjunto de experimentos.	60
<b>Figura 12.</b>	Fosfato total em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do primeiro conjunto de experimentos.	60
<b>Figura 13.</b>	Demanda química de oxigênio (DQO) em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do segundo conjunto de experimentos.	61
<b>Figura 14.</b>	Nitrogênio total (□) e nitrato total (□) em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do segundo conjunto de experimentos.	61
<b>Figura 15.</b>	Fosfato total em função do tempo, do tratamento semi-contínuo da vinhaça no segundo lote por processo aeróbio.	62
<b>Figura 16.</b>	Foto com vinhaças provenientes de cultivo semi-contínuo aeróbio que foram submetidas a tratamento com diferentes concentrações de CAP. O tubo denominado “Biológico” não sofreu o tratamento com CAP.	64
<b>Figura 17.</b>	Absorbância a 475 nm de vinhaças provenientes de cultivo semi-contínuo aeróbio que foram submetidas a tratamento com diferentes concentrações de CAP. No trecho de 0,5 a 20 g L <sup>-1</sup> de CAP, houve uma relação linear (Absorbância = -0,076 . CAP + 1,902; R <sup>2</sup> = 0,9728)	64
<b>Figura 18.</b>	Cultivo de <i>M. contortum</i> em frascos de Erlenmeyer com meio Bold (◆) e vinhaças tratadas por biodigestão aeróbica diluídas 2 vezes (△), diluídas 5 vezes (○) e diluídas 10 vezes (■). X: concentração celular.	68

<b>Figura 19.</b>	Cultivo de <i>S. salina</i> em frascos de Erlenmeyer com meio Bold (◇) e vinhaças tratadas por biodigestão aeróbica diluídas 2 vezes (△), diluídas 5 vezes (○) e diluídas 10 vezes (□). X: concentração celular	70
<b>Figura 20.</b>	Cultivo de <i>M. contortum</i> em fotobiorreator com meio Bold (◆) e vinhaça tratada por biodigestão aeróbica diluída 5 vezes (●). X: concentração celular.	72
<b>Figura 21.</b>	Cultivo de <i>S. salina</i> em fotobiorreator com meio Bold (◆) e vinhaça tratada por biodigestão aeróbica diluída 2 vezes (▲). X: concentração celular.	74
<b>Figura 22.</b>	Cultivo de <i>M. contortum</i> empregando meio Bold em frascos de Erlenmeyer (◇) e em fotobiorreatores (◆), e vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com carvão ativado em pó (20 g L <sup>-1</sup> ), diluída 5 vezes, em frascos de Erlenmeyer (+) e em fotobiorreatores (×). X: concentração celular.	76
<b>Figura 23.</b>	Cultivo de <i>S. salina</i> empregando meio Bold em frascos de Erlenmeyer (◇) e em fotobiorreatores (◆), e vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com carvão ativado em pó (20 g L <sup>-1</sup> ), diluída 2 vezes, em frascos de Erlenmeyer (+) e em fotobiorreatores (×). X: concentração celular.	78

## LISTA DE TABELAS

		Pag.
<b>Tabela 1.</b>	Características da vinhaça resultante do mosto de melaço, de caldo de cana e mistura de ambos (misto).	23
<b>Tabela 2.</b>	Comparação de tratamento aeróbio e anaeróbio.	26
<b>Tabela 3.</b>	Diferentes abordagens da vinhaça para o cultivo de micro-organismos fotossintéticos	35
<b>Tabela 4.</b>	Classificação taxonômica de <i>Monoraphidium contortum</i> .	38
<b>Tabela 5.</b>	Classificação taxonômica de <i>Synechocystis salina</i> .	39
<b>Tabela 6.</b>	Composição do Meio Bold padrão (UTEX, 2010) por litro de água destilada.	49
<b>Tabela 7.</b>	Composição do meio de cultura vinhaça mineral.	50
<b>Tabela 8.</b>	Resultados referentes à caracterização físico-química da vinhaça obtida do processo coagulação-floculação.	58
<b>Tabela 9.</b>	Resultados referentes à caracterização físico-química da vinhaça obtida do processo de adsorção dom CAP.	63
<b>Tabela 10.</b>	Concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ) e valor de pH final, obtidos dos cultivos de micro-organismos fotossintetizantes, realizados por processo descontínuo em frascos de Erlenmeyer usando o meio de vinhaça mineral (MVM).	65
<b>Tabela 11.</b>	Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO <sub>i</sub> ) e final (DQO <sub>f</sub> ) obtidos nos cultivos de <i>M. contortum</i> em Frascos de Erlenmeyer.	69
<b>Tabela 12.</b>	Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO <sub>i</sub> ) e final (DQO <sub>f</sub> ) obtidos nos cultivos de <i>S. salina</i> em Frascos de Erlenmeyer.	71
<b>Tabela 13.</b>	Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO <sub>i</sub> ) e final (DQO <sub>f</sub> ) obtidos nos cultivos de <i>M. contortum</i> em fotobiorreatores.	73
<b>Tabela 14.</b>	Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO <sub>i</sub> ) e final (DQO <sub>f</sub> ) obtidos nos cultivos de <i>S. salina</i> em fotobiorreatores.	74
<b>Tabela 15.</b>	Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO <sub>i</sub> ) e final	77

(DQOf) obtidos nos cultivos de *M. contortum* empregando vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com carvão ativado em pó ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), diluída 5 vezes.

- Tabela 16.** Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[\text{NO}_3]_i$ ) e final ( $[\text{NO}_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[\text{PO}_4]_i$ ) e final ( $[\text{PO}_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQOi) e final (DQOf) obtidos nos cultivos de *S. salina* empregando vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com carvão ativado em pó ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), diluída 2 vezes. 78
- Tabela 17.** Valores médios de conteúdos de lipídeos, proteínas, cinzas e carboidratos obtidos nos cultivos de *S. salina* e *M. contortum* em fotobiorreator tubular empregando vinhaça tratada por biodigestão aeróbica diluído 2 vezes (V. dil 2x) e diluído 5 vezes (V. dil 5x), e tratamento acoplado biodigestão aeróbica e carvão ativado em pó ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), diluída 2 vezes (CAP + V. dil 2x) e diluído 5 vezes (CAP + V. dil 5x) na devida ordem. 80

## LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
CAG	Carvão ativado granulado
CAP	Carvão ativado em pó
DBO	DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio ( $\text{g L}^{-1}$ )
DQO	Demanda Química de Oxigênio ( $\text{g L}^{-1}$ )
°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
P <sub>x</sub>	Produtividade em célula ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )
RPM	Revoluções por Minuto
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis ( $\text{g L}^{-1}$ )
ST	Sólidos Totais ( $\text{g L}^{-1}$ )
SVT	Sólidos Voláteis Totais ( $\text{g L}^{-1}$ )
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias
USP	Universidade de São Paulo
UTEX	<i>University of Texas</i>
VVM	<i>Volume of air per volume medium</i>
X	Concentração celular ( $\text{mg L}^{-1}$ )
X <sub>m</sub>	Concentração celular máxima ( $\text{mg L}^{-1}$ )

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
<b>2.1. Vinhaça</b>	21
2.1.1. Características da vinhaça	22
2.1.2. Uso da vinhaça	24
2.1.3. Tecnologias para o tratamento da vinhaça	25
2.1.3.1. Tratamento anaeróbio	26
2.1.3.2. Tratamento aeróbio	28
2.1.3.3. Métodos físico-químicos	29
2.1.3.3.1. Adsorção com carvão ativado	29
2.1.3.3.2. Coagulação-floculação	30
2.1.3.3.3. Ozonização	30
2.1.3.3.4. Oxidação eletroquímica	31
<b>2.2. Micro-organismos fotossintetizantes</b>	31
2.2.1. Cultivo de microalgas e cianobactérias	31
2.2.2. Cultivos de microalgas e cianobactérias em vinhaça	34
2.2.3. <i>Monoraphidium contortum</i>	37
2.2.4. <i>Synechocystis salina</i>	39
<b>3. OBJETIVOS</b>	41
<b>3.1. Objetivo geral</b>	41
<b>3.2. Objetivos específicos</b>	41
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	42
<b>4.1. Tratamento da vinhaça</b>	42
4.1.1. Obtenção da vinhaça	42
4.1.2. Clarificação	42
4.1.3. Tratamento por processo aeróbio	42
4.1.4. Adsorção com carvão ativado em pó	44
4.1.5. Técnicas analíticas	44
4.1.5.1. pH	44
4.1.5.2. Demanda química de oxigênio (DQO)	45
4.1.5.3. Nitrogênio total	45
4.1.5.4. Nitrato total	46
4.1.5.5. Nitrogênio amoniacal	46

4.1.5.6.	Fosfato total	46
4.1.5.7.	Descoloração da vinhaça	46
4.1.5.8.	Concentração expressa em massa seca	47
4.1.5.9.	Análise elementar quantitativa de elementos	47
<b>4.2.</b>	<b>Cultivos de micro-organismos fotossintetizantes em vinhaça</b>	<b>48</b>
4.2.1.	Seleção dos micro-organismos fotossintetizantes	48
4.2.1.1.	Micro-organismos e manutenção	49
4.2.1.2.	Meio de cultura vinhaça mineral (MVM)	49
4.2.1.3.	Cultivos em frascos de Erlenmeyer com meio MVM	49
4.2.2.	Cultivos de <i>M. contortum</i> e <i>S. salina</i> em frascos de Erlenmeyer com vinhaça proveniente do processo de cultivo aeróbio e do processo acoplado cultivo aeróbio-CAP.	50
4.2.2.1.	Micro-organismos e manutenção	50
4.2.2.2.	Preparo do inóculo	50
4.2.2.3.	Cultivo em Erlenmeyer	51
4.2.3.	Cultivos <i>M. contortum</i> e <i>S. salina</i> em biorreator tubular com vinhaça proveniente do processo de cultivo aeróbio e do processo acoplado cultivo aeróbio-CAP.	52
4.2.3.1.	Micro-organismo, condições de manutenção e preparo do inóculo.	52
4.2.3.2.	Fotobiorreator tubular	52
4.2.3.3.	Descrição do ensaio	53
4.2.4.	Técnicas analíticas	53
4.2.4.1.	Determinação do pH	53
4.2.4.2.	Concentração celular	53
4.2.4.3.	Análise da biomassa seca	54
4.2.4.3.1.	Lipídio total	54
4.2.4.3.2.	Proteína total	54
4.2.4.3.3.	Cinzas totais	54
4.2.4.3.4.	Carboidratos totais	55
4.2.5.	Cálculo da produtividade em células	55
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>5.1.</b>	<b>Tratamentos da vinhaça</b>	<b>56</b>
5.1.1.	Processo de clarificação	56
5.1.2.	Tratamento por processo de cultivo aeróbio	58
5.1.3.	Processo de adsorção com carvão ativado em pó (CAP)	63
<b>5.2.</b>	<b>Cultivo de micro-organismos fotossintetizantes em meio de vinhaça mineral</b>	<b>65</b>

<b>5.3. Cultivo de micro-organismos fotossintetizantes em vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e processo acoplado biodigestão aeróbica-CAP (carvão ativado em pó)</b>	66
5.3.1. Cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes em frascos de Erlenmeyer	67
5.3.1.1. Cultivo de <i>M. contortum</i> em frascos de Erlenmeyer	67
5.3.1.2. Cultivo de <i>S. salina</i> em frascos de Erlenmeyer	69
5.3.2. Cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes em fotobiorreator	71
5.3.2.1. Cultivo de <i>M. contortum</i> em fotobiorreator	71
5.3.2.2. Cultivo de <i>S. salina</i> em fotobiorreator	73
<b>5.4. Cultivo de <i>M. contortum</i> empregando vinhaça tratada com biodigestão aeróbica e carvão ativado em pó.</b>	75
<b>5.5. Cultivo de <i>S. salina</i> empregando vinhaça tratada com biodigestão aeróbica e carvão ativado em pó.</b>	77
<b>5.6. Composição centesimal das biomassas de <i>S. salina</i> e <i>M. contortum</i> obtidas em cultivos em fotobiorreator tubular empregando vinhaça tratada por processo aeróbio e tratamento acoplado processo aeróbica e carvão ativado em pó.</b>	79
<b>6. CONCLUSÕES</b>	82
<b>REFERÊNCIAS</b>	84

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria sucroalcooleira tem como produtos principais o álcool e o açúcar, mas, além dos produtos principais, alguns resíduos e/ou subprodutos são gerados. Entre eles podem ser citados o gás carbônico (CO<sub>2</sub>), o melão, a vinhaça, o bagaço, a fuligem proveniente das caldeiras e água de lavagem (ALVARENGA; QUEIROZ, 2009). O subproduto principal da indústria alcooleira, a vinhaça, também chamada de vinhoto é um resíduo gerado durante o processo de destilação do vinho obtido do processo de fermentação do caldo de cana; é um líquido marrom escuro com odor acentuado e elevada acidez (pH 3,5-5), altos teores de matéria orgânica e sais minerais, principalmente potássio, fósforo, cálcio, magnésio e sulfatos (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011).

Os efluentes que são gerados pelas indústrias do setor sucroalcooleiro são os principais responsáveis pelos impactos negativos ao meio ambiente, principalmente aos recursos hídricos, os efluentes líquidos considerados de maior importância são as águas de lavagem e a vinhaça, pelo elevado teor orgânico (Demanda Química de Oxigênio/Demanda Bioquímica de Oxigênio) e sais minerais (COELHO *et al.*, 2010).

No passado, foram descarregadas grandes quantidades de vinhaça em rios e lagos, ocasionando graves problemas de contaminação (SANTOS *et al.*, 1981; DEMATTÊ *et al.*, 2004). Atualmente, o uso mais comum da vinhaça é como fertilizante, sendo aspergida por meio de tubulações de irrigação, num processo chamado de fertirrigação, ou levada em caminhões para aplicação direta na lavoura (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Em média, 10-15 litros de vinhaça são gerados durante a preparação de cada litro de etanol, conforme o processo e equipamento da usina (MARIANO *et al.*, 2009). Desde então, simultaneamente com o aumento na produção de vinhaça, foram propostos usos alternativos, como a reciclagem de vinhaça em fermentação, concentração por evaporação, produção de levedura, produção de energia, bem como a já mencionada fertirrigação (COELHO *et al.*, 2010). A indústria alcooleira apresenta-se já bem estabelecida, mas o volume de vinhaça cresce de acordo com o volume de produção de etanol. Para mensuração da dimensão desse problema, na safra de cana-de-açúcar 2010/2011 no Brasil, 25 bilhões de litros de etanol foram produzidos, gerando em torno de 300 bilhões de litros de vinhaça. Na última safra (2018/2019), em que foram produzidos 33 bilhões de litros de etanol (UNICA, 2019) considerando uma média de 12 litros de vinhaça por cada litro de etanol o volume de vinhaça foi da ordem de 396 bilhões de litros.

A prática de aplicação da vinhaça nas áreas agrícolas, associadas ao manejo da plantação, poderá impactar consideravelmente a comunidade microbiana do solo devido às mudanças abruptas e transitórias na disponibilidade de nutrientes (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Deve-se levar em conta possível impacto ambiental, como o enriquecimento de sais no solo e também a lixiviação do nitrato e fosfato (PARNAUDEAU *et al.*, 2008).

As microalgas têm uma ampla capacidade para a remoção de nitrogênio e fósforo (BICH *et al.*, 1999). Em vista disso, podem ser empregadas para tratar diferentes classes de águas residuais. As vantagens de utilizar as microalgas para esta finalidade abrangem: redução de gastos de operação, possibilidade da reciclagem de nitrogênio e fósforo assimilável em biomassa de algas como biofertilizante e a descarga de efluentes oxigenados para o corpo hídrico. Além disso, o processo não requer carbono orgânico para a remoção de nitrogênio e fósforo, sendo atraente para o tratamento terciário de efluentes (ASLAN; KAPDAN, 2006). A biomassa pode ainda ser utilizada como suplemento na alimentação de animais, para produção de biocombustíveis e biofertilizantes ou para a obtenção de produtos como ácidos graxos insaturados, vitaminas e pigmentos (CHISTI, 2007). De fato, têm sido demonstrados cultivos de microalgas usando diferentes efluentes orgânicos para conseguir simultaneamente a produção de biomassa e o tratamento de águas residuais (ABREU *et al.*, 2012; JI *et al.*, 2013).

Um potencial de água residual para o cultivo de microalgas é a vinhaça, rica em compostos orgânicos, nitrogênio, fósforo e íons (ORTEGÓN *et al.*, 2016). Estudos acerca do uso de vinhaça de cana-de-açúcar para a produção de biomassa de microalgas e cianobactérias, foram bem sucedidos para algumas cepas como *Spirulina maxima* (DOS SANTOS *et al.*, 2016), *Desmodesmus subspicatus* (ALTENHOFEN *et al.*, 2017), as cepas de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* (SANTANA *et al.*, 2017) e *Micractinium sp.* ME05 (ENGIN *et al.*, 2018). Apesar disso, o uso deste efluente em altas concentrações pode inibir o crescimento. É bem sabido que nem todas as cepas podem crescer em condições adversas, como as encontradas neste resíduo. Esses achados destacam a importância da prospecção e seleção de cepas de microalgas robustas capazes de manter altas velocidades de crescimento em sistemas de cultivo baseados em águas residuais.

Estudos encontraram que a presença de substâncias com propriedades antioxidantes, formadas pela Reação de Maillard (melanoidinas), são frequentemente a causa de um crescimento ruim ou inexistente de microalgas e cianobactérias na vinhaça não tratada. Além disso, altas concentrações de potássio, como as encontradas na vinhaça, podem afetar o crescimento e a viabilidade de algumas cepas. Deste modo, o cultivo de microalgas e cianobactérias usando águas residuais é frequentemente alcançado pela degradação de

melanoidinas, clarificação e redução de sua carga de DBO e DQO através de pré-tratamento prévio do substrato (por exemplo: tratamento aeróbio e/ou digestão anaeróbica) (MOHANA *et al.*, 2009; BRASIL *et al.*, 2017). Usando essa estratégia, Marques *et al.* (2013) e, Candido e Lombardi (2018), relataram que o uso da vinhaça biodigerida para cultivar *Chlorella vulgaris* aumentou a produtividade a até 70 mg L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e as velocidades específicas de crescimento a 1,5-1,6 d<sup>-1</sup>, respectivamente. Olguín *et al.* (2015) aumentaram o crescimento de *Neochloris oleoabundans* usando meio com vinhaça biodigerida a 2 e 4% e o teor de lipídios totais foi incrementado usando vinhaça digerida a 6% suplementada com bicarbonato de sódio. No entanto, não foram achados estudos que avaliem o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em vinhaça tratada por processo aeróbio.

Adicionalmente, a adsorção em carvão ativado em pó (CAP) pode ser empregado como complemento ao tratamento biológico de efluentes, com a finalidade de remover substâncias causadoras de cor e odor, como a melanoidina (pigmento marrom escuro) presente na vinhaça. Estudos mostram que CAP é capaz de reduzir em até um 99 % a cor e turbidez da vinhaça e consegue remover 90 % a DQO (LIMA, 2013). Portanto, o acoplamento do CAP ao tratamento da vinhaça tratada pode ser promissor para melhorar o rendimento dos cultivos de micro-organismos fotossintetizantes.

Dentro desse contexto, este trabalho tem o objetivo de avaliar o aproveitamento de nutrientes como fósforo, nitrogênio e sais minerais derivados do tratamento aeróbio da vinhaça acoplado ou não com CAP, em cultivos de micro-organismos fotossintetizantes em fotobiorreator tubular. Com isso, espera-se contribuir para que haja menos problemas ambientais pela liberação destes nutrientes no meio ambiente, com produção de biomassa fotossintetizante de interesse industrial.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

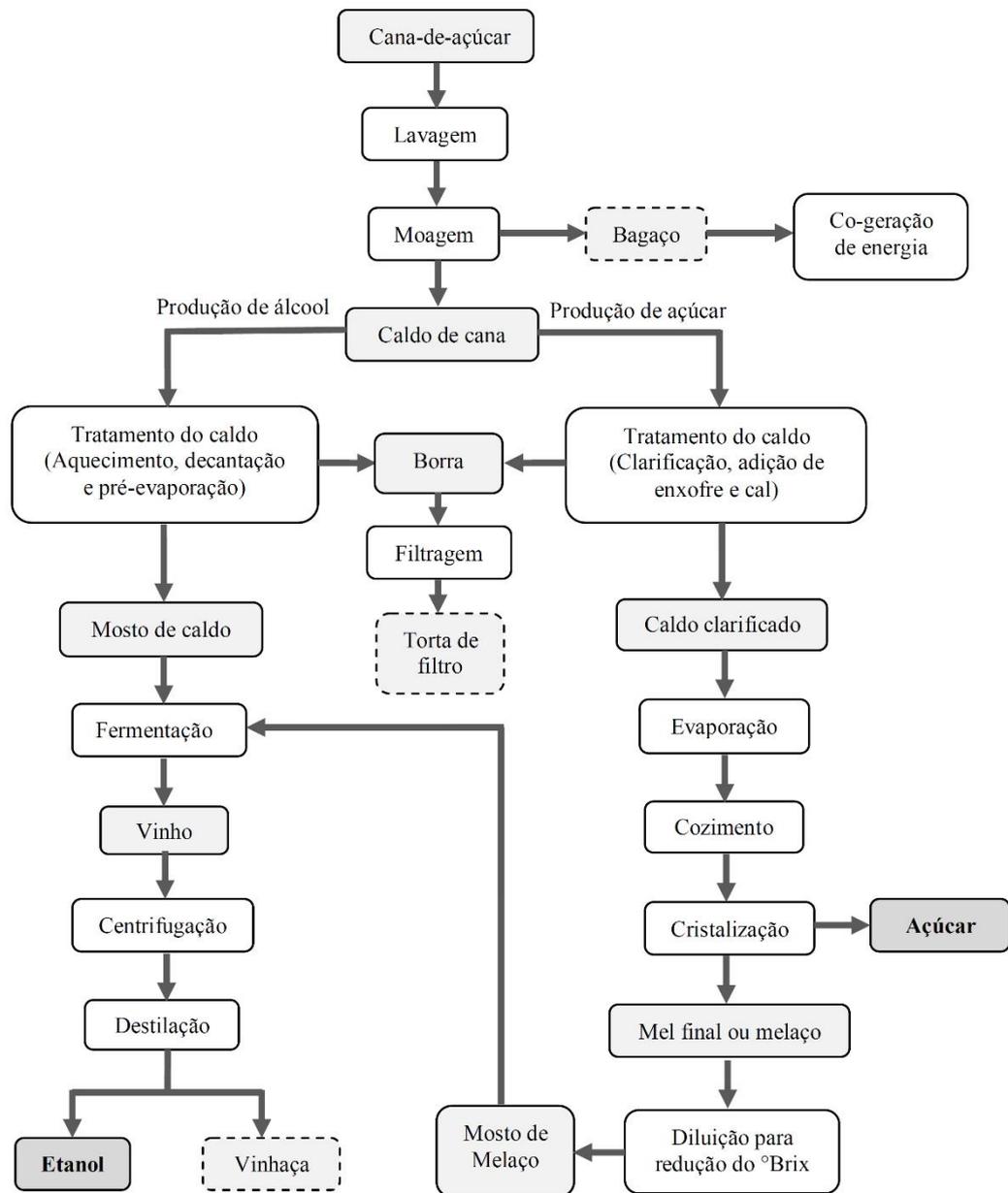
### 2.1. Vinhaça

O segundo maior produtor de bioetanol do mundo é o Brasil, como maior produtor está os Estados Unidos, que obtêm o etanol a partir do milho (LAIME, 2011). Por outro lado, o Brasil lidera a produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar, matéria-prima renovável de baixo custo e de alta eficiência energética. Não obstante, são geradas grandes quantidades de efluente no processo de produção de etanol, principalmente a vinhaça (ALBANEZ, 2015).

A vinhaça, também chamada de restilo ou vinhoto, é o principal subproduto das indústrias de etanol (CUNHA *et al.*, 2017). É gerada no processo de destilação do vinho proveniente do processo de fermentação do caldo e do melaço de cana de açúcar, conforme pode ser observado na Figura 1, ou de qualquer outro insumo que gere açúcar para a fermentação alcoólica, tais como beterraba, milho, trigo e mandioca (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013).

Conforme Cruz *et al.* (2008), gera-se de 10 a 15 litros de vinhaça para cada litro de álcool produzido, dependendo do processo e das condições tecnológicas da destilaria. Como comentado, considerando a última safra (2018/2019), em que foram produzidos 33 bilhões de litros de etanol (UNICA, 2019) considerando uma média de 12 litros de vinhaça por litro de etanol o volume de vinhaça foi da ordem de 396 bilhões de litros.

No passado, quantidades consideráveis de vinhaça foram descarregadas em rios e lagos, causando a destruição da fauna e da flora aquáticas e problemas de eutrofização, o que dificultava o aproveitamento dessas águas contaminadas para o abastecimento de água potável. Ademais, o escoamento da vinhaça em cursos d'água é responsável pelos maus odores causados pela decomposição dos compostos orgânicos e pode contribuir para o aumento de endemias como esquistossomose, amebíase e malária (LAIME, 2011; ONODERA *et al.*, 2013). Preocupada pelos impactos negativos causados pela vinhaça no meio ambiente, a Portaria do Ministério do Interior n. 323 de 29/11/1978, proibiu o escoamento direto ou indireto, deste efluente, em qualquer recurso hídrico, pelas indústrias de álcool instaladas no Brasil, a partir da safra 1979/ 1980 (DA SILVA *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Fluxograma da produção de etanol (de 1ª geração) e açúcar a partir da cana-de-açúcar, com a geração de vinhaça e outros subprodutos. Fonte: SANTOS, 2010.

### 2.1.1. Características da vinhaça

A variação na composição físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar depende de vários fatores como matéria-prima, das etapas do processo produtivo do etanol e do procedimento de destilação. Caracteriza-se por ser um efluente com baixo valor de pH, alta temperatura quando da saída das colunas de destilação, coloração marrom escura, altos valores de matéria orgânica na forma de ácidos orgânicos, seguido de elementos químicos tais como

potássio, cálcio, nitrogênio, magnésio, fósforo e valores elevados de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (MARQUES, 2006) (Tabela 1). Os principais componentes orgânicos da vinhaça de cana-de-açúcar são o oxalato, ácido acético, ácido láctico, glicerol, sacarose, acetato, glicose, frutose e citrato (DOELSCH *et al.*, 2009). A vinhaça de beterraba açucareira também contém glicerol e seu composto principal rico em nitrogênio a betaína (DECLoux; BORIES, 2002). Restos de celulose e hemicelulose e, alguns compostos fenólicos também podem estar presentes na vinhaça (BENKE *et al.*, 1998).

**Tabela 1.** Características da vinhaça resultante do mosto de melaço, de caldo de cana e mistura de ambos (misto). Fonte: MARQUES, 2006.

Parâmetro	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 – 5,0	3,7 – 4,6	4,4 – 4,6
Temperatura (°C)	80 – 100	80 – 100	80 – 100
DBO (mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> ) <sup>(1)</sup>	25000	6000 – 16500	19800
DQO (mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> ) <sup>(2)</sup>	65000	15000 – 33000	45000
Sólidos totais (mg L <sup>-1</sup> )	81500	23700	52700
Sólidos fixos (mg L <sup>-1</sup> )	21500	3700	12700
Sólidos voláteis (mg L <sup>-1</sup> )	60000	20000	40000
Fósforo (mg L <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	100 – 290	10 – 210	9 – 200
Nitrogênio (mg L <sup>-1</sup> N)	450 – 1610	150 – 700	480 – 710
Potássio (mg L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> O)	3740 – 7830	1200 – 2100	3340 – 4600
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	6400	600 – 760	3700 – 3730
Magnésio (mg L <sup>-1</sup> MgO)	420 – 1520	200 – 490	580 – 700
Cálcio (mg L <sup>-1</sup> CaO)	450 – 5180	130 – 1540	1330 – 4570
Relação C/N	16 – 16,27	19,7 – 21,07	16,4 – 16,43
Carbono (mg L <sup>-1</sup> C)	11200 – 22900	5700 – 13400	8700 – 12100
Matéria Orgânica (mg L <sup>-1</sup> )	63400	19500	3800
Subst. Redutoras (mg L <sup>-1</sup> )	9500	7900	8300

<sup>(1)</sup> Demanda bioquímica de oxigênio. <sup>(2)</sup> Demanda química de oxigênio.

### 2.1.2. Uso da vinhaça

Diversas alternativas para o uso da vinhaça foram sugeridas, tais como: ração animal, fabricação de tijolos, produção de proteínas (biomassa microbiana), produção de biogás (metano) através da digestão anaeróbica, concentração para seu armazenamento e transporte, e fertilização de solos (fertirrigação), sendo esta última a mais utilizada. No processo de fertirrigação, a vinhaça é distribuída por meio de tubulações ou sulcos de infiltração ou levada em caminhões para aplicação direta na lavoura (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O elevado teor de potássio presente em este efluente e os demais elementos como fósforo e nitrogênio são responsáveis pela sua utilização na fertirrigação da cultura de cana-de-açúcar. Segundo Rossetto *et al.* (2008), quando o suprimento de potássio é abundante no solo a cultura da cana-de-açúcar acumula grandes quantidades desse elemento, requerendo cautela pela implicação na composição mineral do cultivo e pode interferir no processo fisiológico de absorção de outros elementos como magnésio e cálcio (MARSCHNER, 2011).

Segundo Marques (2006), a vinhaça no solo atua como fertilizante, pois é rica em matéria orgânica e minerais, que melhora os atributos físico-químicos e biológicos do solo, aumentar a microbiota do solo e com isto a disponibilidade de compostos nitrogenados, melhora a qualidade geral de fertilidade e o poder de reter a humidade no solo e até aumentar a produtividade da cana. Como efeito da aplicação da vinhaça, a capacidade de troca catiônica do solo aumenta por meio da adição de grande quantidade de matéria orgânica contida no efluente, conferindo um aumento das cargas negativas, que atenuam a lixiviação de cátions (ORLANDO FILHO *et al.*, 1983).

Entretanto, o excesso de vinhaça pode tornar o solo alcalino, não disponibilizando nutrientes fundamentais às plantas, o que provoca um retardo da maturação, levando à uma redução no conteúdo de sacarose, comprometendo a qualidade da cana. Além disso, doses acima da recomendação podem reduzir a aeração do solo e desequilíbrio de nutrientes. Em condições favoráveis de oxirredução, pode haver acúmulo de nitrato no solo. Usar continuamente vinhaça numa mesma área leva ao acúmulo de potássio, o que, em decorrência da lixiviação de ânions, pode acarretar a contaminação do lençol freático (SEGATO *et al.*, 2006).

Orlando Filho *et al.* (1983) destacam a necessidade de cuidados na aplicação da vinhaça para evitar a salinização do solo, já que o alto teor de potássio contido no efluente induz o aumento na condutividade elétrica do solo. Goudar (2006) afirma que, para longos períodos de irrigação em solos com capacidade de drenagem limitada, poderá ocorrer uma considerável

acumulação de sais, bem como alterações nas propriedades físico-químicas e biológicas do solo, além de desequilíbrio iônico.

### 2.1.3. Tecnologias para o tratamento da vinhaça

Diferentes tecnologias têm sido exploradas para reduzir as propriedades contaminantes da vinhaça. O mais usado como primeiro passo no tratamento da vinhaça tem sido o tratamento anaeróbio porque tem se mostrado ser o mais eficaz na redução dos compostos contaminantes. O tratamento aeróbio e vários métodos físico químicos, como adsorção, oxidação eletroquímica, ozonização, coagulação-floculação também tem sido estudados, mas geralmente estes métodos são mais usados como pré e pós-tratamentos na remoção de cor e conteúdo orgânico remanescente (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011) ou são usados como a primeira e única etapa do tratamento quando a vinhaça é diluída (SREETHAWONG; CHAVADEJ, 2008).

Tanto o tratamento anaeróbio como aeróbio podem alcançar alta eficiência de remoção orgânica (Tabela 2). Em geral, os sistemas de tratamento aeróbio são apropriados para águas residuais de baixa concentrações de DQO (até 1000 mg L<sup>-1</sup>), enquanto os sistemas de tratamento anaeróbios são mais apropriados para águas residuais com altas concentrações de DQO biodegradável (maiores que 4000 mg L<sup>-1</sup>) (CHAN *et al.*, 2009).

Efluentes industriais excessivamente poluentes são processados de preferência em reator anaeróbio propício ao alto nível de DQO, bem como seu potencial para gerar energia e o baixo excesso de lodo. Apesar disso, em aplicações práticas, o tratamento anaeróbio sofre com a baixa velocidade de crescimento dos micro-organismos, uma baixa taxa de sedimentação, instabilidades do processo e a necessidade de pós-tratamento do efluente anaeróbio nocivo, que geralmente contém íon amônio e sulfeto de hidrogênio (HEIJNEN *et al.*, 1991). Na maioria das aplicações, apesar da eficiência do processo anaeróbio ser alta, a estabilização completa da matéria orgânica é impossível nesse processo devido à alta resistência orgânica das águas residuais. O efluente gerado no final do processo anaeróbio contém matéria orgânica solubilizada. Por outro lado, em comparação com os sistemas anaeróbios, os sistemas aeróbios alcançam uma remoção mais alta do material solúvel da matéria orgânica biodegradável e a biomassa produzida é geralmente bem floculada, resultando em menor concentração de sólidos em suspensão em efluentes (CHAN *et al.*, 2009). Como resultado, a qualidade do efluente de um sistema aeróbio é geralmente mais alta que o sistema anaeróbio.

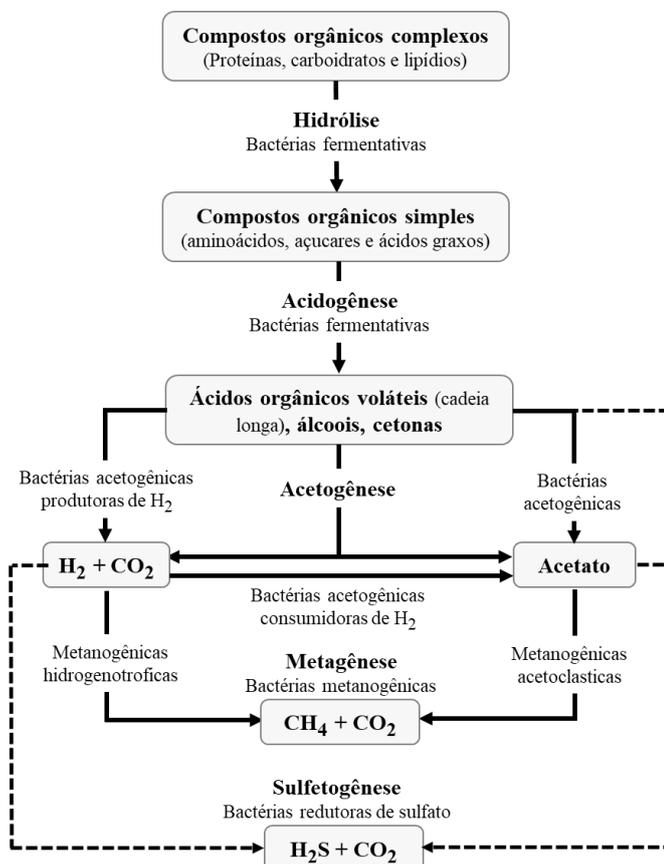
**Tabela 2.** Comparação de tratamento aeróbio e anaeróbio. Fonte CHAN *et al*, 2009.

<b>Característica</b>	<b>Aeróbio</b>	<b>Anaeróbio</b>
Eficiência de remoção orgânica	Alto	Alto
Qualidade de efluentes	Excelente	Moderado a ruim
Taxa de carregamento orgânico	Moderado	Alto
Produção de lodo	Alto	Baixo
Necessidade de nutrientes	Alto	Baixo
Requisito de alcalinidade	Baixo	Elevado para certos resíduos industriais
Necessidade de energia	Alto	Baixo a moderado
Sensibilidade à temperatura	Baixo	Alto
Tempo de inicialização	2-4 semanas	2 a 4 meses
Odor	Menor possibilidade de odores	Problemas potenciais de odor
Recuperação de bioenergia e nutrientes	Não	Sim
Modo de tratamento	Total (dependendo das características da matéria-prima)	Essencialmente pré-tratamento

#### 2.1.3.1. Tratamento anaeróbio

A digestão anaeróbia consiste na biodegradação de substratos orgânicos e ocasionalmente inorgânicos, através de um procedimento sequências de complexos processos metabólicos (Figura 2), na privação de oxigênio molecular. O resultado deste metabolismo é a conversão da carga orgânica em metano, dióxido de carbono, nitrogênio amoniacal e biomassa microbiana (BATSTONE; JENSEN, 2011). Este processo depende da atuação de pelo menos três tipos distintos de micro-organismos, como bactérias metanogênicas, acetogênicas e

fermentativas. Na presença de sulfito e sulfato, há ainda ação de bactérias sulforredutoras (MORAES *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Esquema da digestão anaeróbica (MORAES *et al.*, 2015)

Os dois principais produtos que são resultado da biodigestão da vinhaça são: o biogás e a própria vinhaça biodigerida. A vinhaça biodigerida é frequentemente utilizada na fertilização, enquanto que ao biogás, é usado principalmente na geração de energia, pela sua alta concentrações de metanos (SZYMANSKI *et al.*, 2010).

O tratamento da vinhaça por processos anaeróbico surgiu como uma opção de tratamento para este efluente, proporcionando até uma implicação econômica muito importante: pelo aproveitamento do gás metano como gerador de energia (CORAZZA, 1996). No entanto, o processo de digestão anaeróbico, somente tornou-se atrativo a partir do momento em que foram desenvolvidos os reatores com elevada performance, com menor tempo de retenção hidráulica, como os UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), este tipo de reator foi o que melhor se adaptou ao processo anaeróbico da vinhaça de cana-de-açúcar (VON SPERLING, 2005).

Na maioria dos casos, quando comparado ao tratamento aeróbio, o principal benefício da digestão anaeróbica da vinhaça é o menor consumo de energia. Além disso, a quantidade de lodo produzido é bem menor em virtude da menor carga microbiana, que não consegue sobreviver num sistema tão limitado; o biogás gerado tem grande possibilidade de ser aproveitado como fonte de energia e ocorre diminuição do teor orgânico deste efluente antes da sua aplicação no solo, e outros (CORTEZ *et al.* 2007; SALOMON, 2007). As principais inconveniências citadas por Cortez *et al.* (2007) são: o tempo de retenção é maior quando comparado com o processo aeróbio e ocorre produção de substâncias corrosivas e gases com desagradável odor.

#### 2.1.3.2. Tratamento aeróbio

O tratamento aeróbio é usado para remover compostos orgânicos (DBO ou DQO) e oxidar amônia em nitrato. A tecnologia de tratamento aeróbio de águas residuais mais comumente aplicada é o lodo ativado. Nesse processo, se fornece oxigênio para uma suspensão de micro-organismos (bactérias e protozoários) num tanque de aeração para formar o lodo biológico, que se mistura com o efluente para biodegradar o material orgânico. Através dos processos de biodegradação, o material orgânico no efluente é convertido então em biomassa biológica, dióxido de carbono e água (BRANCO, 1964; CHAN *et al.*, 2009).

Existem poucos estudos acerca do tratamento da vinhaça por processos aeróbios. Geralmente este sistema é usado como pós-tratamento ao anaeróbio ou físico-químico, devido ao fato de o processo anaeróbio-aeróbio mostrar-se ser uma opção viável quanto aos aspectos técnico e econômico. De acordo com Chernicharo (2006), a utilização de processos combinados anaeróbio-aeróbio oferece várias vantagens em comparação ao tratamento aeróbio convencional, tais como redução da capacidade de aeração necessária no processo aeróbio, pouca formação de lodo biológico e baixos custos técnicos e operacionais. Por exemplo, em processos combinados UASB/lodos ativados, o reator UASB pode receber a sangria de lodo decorrente do reator aeróbio, de modo que o excesso de lodo passa pelo processo de biodigestão, e portanto, a produção conjunta de lodo do sistema é descartada apenas do reator UASB, podendo ser enviado diretamente para desidratação e disposição final. No caso da nitrificação, como o processo anaeróbio reduz grande parte da DQO, no tratamento aeróbio o oxigênio dissolvido fica disponível para os micro-organismos nitrificantes facilitando o processo de nitrificação.

### 2.1.3.3. Métodos físico-químicos

Embora os tratamentos aeróbios e anaeróbios sejam adequados para a remoção de DQO, os tratamentos físico-químicos como adsorção, oxidação eletroquímica, ozonização, coagulação-floculação também foram avaliados, pois os efluentes das indústrias de etanol permanecem com cor marrom escura e contêm alguns compostos tóxicos para micro-organismos para o pós-tratamento biológico. De fato, os processos convencionais de tratamento anaeróbio-aeróbio podem degradar de 6 a 7% das melanoidinas (GONZALEZ et al., 1999).

#### 2.1.3.3.1. Adsorção com carvão ativado

O carvão ativado é amplamente utilizado como adsorvente de compostos orgânicos e inorgânicos que conferem odor, cor e gosto das águas de abastecimento e residuais. O complexo fenômeno da adsorção pode envolver interações químicas entre o soluto e os grupos químicos na superfície do carvão ativado, que por sua vez envolvem interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações dipolo-dipolo e, principalmente, forças de Van der Waals (FIGARO *et al.*, 2009 )

O carvão ativado tem se mostrado eficiente para remoção de muitos compostos, sendo demonstrada sua efetividade na remoção de microcistina. Falconer (1989) confirmou a eficácia do carvão ativado visando à remoção de neurotoxinas e hepatotoxinas, usando carvão ativado em pó (CAP) e carvão ativado granular (CAG), não obtendo diferença entre os dois tipos de ensaios.

Utilizado em operações unitárias complementares de instalações de tratamento de efluente, o carvão ativado pode atuar na remoção de compostos com odor e/ou coloração, como a melanoidina (pigmento marrom escuro) presente na vinhaça. Estudos mostram que CAP é capaz de reduzir em até um 99 % a cor e turbidez da vinhaça e consegue remover 90 % da DQO (LIMA, 2013). Portanto, o acoplamento do CAP ao tratamento da vinhaça tratada pode ser promissor para melhorar o rendimento dos cultivos de micro-organismos fotossintetizantes. Candido *et al.* (2015) demonstraram que filtração da vinhaça em funil com 56 g de argila esmectita (50 mL) e 13 g (50 mL) de carvão ativado é suficiente para reduzir a turbidez da vinhaça em 65% e é adequada para o cultivo de *C. vulgaris*, obtendo as maiores velocidades específicas de crescimento ( $0,563 - 0,526 \text{ dia}^{-1}$ ) em vinhaça clarificada diluído 30 e 40 %.

#### 2.1.3.3.2. Coagulação-floculação

No processo de coagulação, as partículas coloidais carregadas negativamente são agregadas em partículas maiores (flocos) através do uso de um coagulante de carga positiva, que neutraliza a carga das partículas coloidais, o que diminui a repulsão entre elas, formando agregados para que possam decantar. Geralmente,  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Al}^{+3}$ , elementos de elevada carga, desde que em concentrações e valores de pH adequados, proporcionam o surgimento de flocos (DI BERNARDO, 1993). Migo *et al.* (1993) estudaram a remoção de melanoidina da vinhaça, usando 4% v/v um floculante inorgânico, poli sulfato férrico. Os rendimentos de descoloração foram de 32, 87 e 94 % para vinhaça fresca, vinhaça da biodigestão e vinhaça proveniente do tanque, respectivamente. No entanto, um aumento na quantidade de agente floculante resultou em um aumento na turbidez e no conteúdo total de carbono orgânico. Lóio (2013) observou uma redução de 22% da cor e 78% da turbidez em vinhaça usando o polímero catiônico LAB TAE 409 (20 g L<sup>-1</sup>), e relatou que é possível o cultivo da microalga *C. vulgaris* em vinhaça tratada por coagulação-floculação.

#### 2.1.3.3.3. Ozonização

O ozônio é um oxidante forte, amplamente utilizado para a desinfecção da água. Uma molécula de ozônio é composta por três moléculas de oxigênio, é solúvel em água e está disponível para reação imediata com composto orgânico presente na água (STREETHAWONG E CHAVADEJ, 2008). O ozônio, como o reagente oxidante mais poderoso, é capaz de degradar efetivamente vários compostos fenólicos em compostos menos tóxicos. A radiação UV e o peróxido de hidrogênio aumentam a eficiência da ozonização pela formação de radicais livres, como os radicais hidroxila, que são muito reativos e oxidantes (NIAOUNAKIS E HALVADAKIS, 2006).

Streethawong e Chavadej (2008) buscaram aprimorar o processo de oxidação do ozônio usando óxido de ferro como catalisador heterogêneo em vinhaça diluída 20 vezes. Com ou sem o catalisador, o aumento no tempo de retenção hidráulica resultou em maior eficiência na redução de DQO e da cor, uma vez que aumenta o tempo de contato com o ozônio.

#### 2.1.3.3.4. Oxidação eletroquímica

Este processo utiliza elétrons como reagente principal, mas também requer a presença de eletrólitos de suporte. O processo de degradação eletroquímica de poluentes pode ser dividido em processo de oxidação direta e indireta. No processo de oxidação direta, os poluentes são adsorvidos pela superfície do ânodo no início e depois através da reação de transferência de elétrons da formação do radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), radical livre de oxidação forte, podendo mineralizar completamente os compostos orgânicos em  $\text{CO}_2$ . Na oxidação eletroquímica indireta, compostos com alta capacidade oxidante, como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$  e cloro são formados por via eletroquímica, e eles reagem com os poluentes, com destruição destes (PRASAD; SRIVASTAVA 2009).

VILAR et al. (2018) estudaram a degradação eletroquímica e biológica da vinhaça de cana-de-açúcar, usando *Pleurotus sajor-caju* seguido de oxidação eletroquímica usando como ânodo  $\text{Ti}/(\text{RuO}_2)_{0,7}(\text{IrO}_2)_{0,1}(\text{Sb}_2\text{O}_3)_{0,2}$ , obtendo uma remoção final de 100% na cor, 66% na demanda química de oxigênio e 61 % no valor de carbono orgânico total.

## 2.2. Micro-organismos fotossintetizantes

Os micro-organismos fotossintetizantes, especialmente as microalgas (eucarióticas) e cianobactérias (procarióticas), são de grande interesse por suas potenciais aplicações que vão desde o uso direto de biomassa (suplementos alimentares), produção de compostos de alto valor (vitaminas, pigmentos e ácidos graxos poli-insaturados) e aplicações ambientais (produção de biocombustíveis, mitigação de  $\text{CO}_2$  e tratamento de águas residuais) (MATA *et al.*, 2010; WIJFFELS *et al.*, 2013). A exploração comercial desses micro-organismos fotossintetizantes aumenta a necessidade de processos confiáveis, eficientes e econômicos, com uma qualidade de produto constante (KWON *et al.*, 2012).

### 2.2.1. Cultivo de microalgas e cianobactérias

Em geral, para o crescimento da biomassa, que contém de 40-50% de carbono, os micro-organismos fotossintetizantes dependem do suprimento suficiente de uma fonte de carbono e luz para realizar a fotossíntese. Eles podem ajustar ou mudar sua estrutura interna (por exemplo, aclimação fisiológica e bioquímica), podendo excretar uma variedade de compostos com a

finalidade de tornar os nutrientes disponíveis ou limitar o crescimento dos antagonistas (RICHMOND, 2013). Podem assumir muitos tipos de metabolismo (por exemplo, autotróficos, heterotróficos, mixotróficos e foto-heterotróficos) e são capazes de uma mudança metabólica como resposta a mudanças nas condições ambientais. Por exemplo, alguns organismos podem crescer (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004):

- Fotoautotroficamente, isto é, usando a luz como uma única fonte de energia que é convertida em energia química por meio de reações fotossintéticas;
- Heterotroficamente, que dizer, utilizando apenas compostos orgânicos como carbono e fonte de energia.
- Mixotroficamente, ou seja, realizam a fotossíntese como principal fonte de energia, embora tanto os compostos orgânicos quanto o CO<sub>2</sub> sejam utilizados no crescimento.

Há ainda o crescimento foto-heterotrófico, condição em que o aparato fotossintético fornece energia, mas não há uso de gás carbônico como fonte de carbono (WILKEN et al., 2014).

Sob condições mixotróficas, microalgas podem simultaneamente assimilar os substratos orgânicos e inorgânicos através dos concorrentes processos de fotossíntese e respiratórios, que são a soma do crescimento fotoautotrófico e heterotrófico (BHATNAGAR, *et al.*, 2011). *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* e *Arthrospira platensis* são exemplos de cepas que crescem em condições fotoautotróficas, heterotróficas, bem como em condições mixotróficas. Outras cepas, como *Selenastrum capricornutum* e *Scenedesmus acutus*, podem crescer fotoautotroficamente e heterotroficamente (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Existem vários fatores que influenciam no crescimento dos micro-organismos fotossintetizantes, podendo ser abióticos ou bióticos. Os primeiros incluem temperatura, tipo de luz e sua intensidade, valor de pH, tipos de nutrientes e suas concentrações, oxigênio dissolvido, gás carbônico, concentração de sais, produtos que apresentem toxicidade, entre outros. Com respeito a fatores bióticos, podem ser incluídos outros micro-organismos, sejam fotossintetizantes ou heterotróficos, como fungos, bactérias e até mesmo vírus. Há ainda fatores relacionados com a operação propriamente dita, como o cisalhamento ocasionado pela mistura, a taxa de diluição, a profundidade, a frequência da colheita e adição de bicarbonato (MATA *et al.*, 2010).

A intensidade da luz muito alta ou muito baixa pode causar uma fotoinibição ou fotolimitação do crescimento celular, respectivamente. No entanto, no cultivo mixotrófico, o crescimento celular não depende necessariamente da fotossíntese, dada a presença de

compostos orgânicos como fontes de carbono e energia. Portanto, a luz como fonte de energia pode não ser mais um fator indispensável para o crescimento. Conforme descrito por Andrade e Costa (2007), a baixa intensidade de luz deve ajudar a estimular o desenvolvimento do metabolismo mixotrófico. Dentre todos os fatores ambientais que afetam o cultivo mixotrófico, a qualidade e a intensidade da luz são os mais importantes. A maioria das cepas capazes de crescer mixotroficamente precisa de uma intensidade de luz não inferior a  $50 \mu\text{mol}$  de fóton  $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Esses fótons não podem ser usados para processos fotossintéticos, mas para ativar enzimas que catalisam reações químicas na assimilação de substratos (Chojnacka e Noworyta 2004).

A temperatura é o fator limitante mais importante, depois de luz, para a cultura de micro-organismos fotossintetizantes em ambos os sistemas, fechados e abertos. Muitas cepas podem facilmente tolerar temperaturas até  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  inferiores às ótimas, mas ultrapassando a temperatura ideal em apenas  $2$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  podem resultar na perda total da cultura. Além disso, podem ocorrer problemas de superaquecimento em sistemas de cultura fechado durante alguns dias quentes, onde a temperatura dentro do biorreator pode atingir  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Neste caso, os sistemas de refrigeração por evaporação de água podem ser usados economicamente para diminuir a temperatura para cerca de  $20\text{-}26 \text{ }^\circ\text{C}$  (BECKER, 1994).

Um fator de grande importância é a salinidade, que pode ser alterada pela evaporação de líquidos, podendo interferir tanto no crescimento celular como na composição da biomassa. Cada microalga e cianobactéria tem uma faixa de salinidade ótima diferente, sendo que a salinidade pode aumentar durante condições climáticas quentes devido à alta taxa de evaporação. Mudanças de salinidade afetam normalmente o fitoplâncton de três maneiras tal como o estresse osmótico, estresse iônico (sal) e mudanças nas relações iônicas das células como consequência da permeabilidade da membrana, que é seletiva. A maneira mais fácil para o controle de salinidade é por adição de água doce ou salgada, conforme necessário (MOHEIMANI, 2005).

A mistura é outro parâmetro de crescimento importante de micro-organismos fotossintetizantes, uma vez que homogeneiza a distribuição das células, o calor, os metabólitos, facilita a transferência de gases e promove a circulação rápida das células do escuro para a zona de luz do reator (BARBOSA, 2003). Por outro lado, altas velocidades do líquido e graus de turbulência (mistura mecânica ou mistura de bolhas de ar) podem prejudicar as células devido ao cisalhamento (ERIKSEN, 2008).

Os contaminantes biológicos mais comuns incluem microalgas indesejadas, fungos, bactérias e protozoários. Uma maneira de diminuir os contaminantes e melhorar o rendimento

é após a remoção do organismo indesejado submeter a cultura a uma mudança temporariamente extrema dos fatores ambientais, como temperatura, pH ou luz. Em reatores de cultura fechados o controle sobre os parâmetros da cultura e concentração celular que se pode atingir é maior. Efetivamente, o ambiente fechado protege a cultura da contaminação e torna viável o cultivo de algumas microalgas importantes (PENG *et al.*, 2016; TOULOUPAKIS *et al.*, 2016).

### 2.2.2. Cultivos de microalgas e cianobactérias em vinhaça

Cultivos de micro-organismos fotossintetizantes apresentam velocidades de crescimento mais elevadas, além de ocuparem menor área terrestre em comparação com as plantas superiores. No entanto, a produção de biomassa de microalgas e cianobactérias ainda não é economicamente viável devido aos altos custos de cultivo, colheita e processamento (QUINN; DAVIS, 2015). Reduções significativas de custos podem ser obtidas se o CO<sub>2</sub>, os nutrientes e a água para o cultivo de microalgas forem obtidos a baixo preço, sem afetar o sistema de produção (BRASIL *et al.*, 2016). Por conseguinte, o uso de vários tipos de resíduos derivados de processos industriais, bem como de águas residuais rurais e domésticas, foi proposto para o cultivo de microalgas como estratégia de redução de custo no cultivo de microalgas (KANG *et al.*, 2015).

Uma água residuária que pode ser uma fonte potencial de nutriente para o cultivo de microalgas e cianobactérias é a vinhaça de cana-de-açúcar, rica em compostos orgânicos, nitrogênio, fósforo e íons (por exemplo, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) (ORTEGÓN *et al.*, 2016). Embora este efluente é geralmente aplicado na fertirrigação de culturas de cana de açúcar, a sua aplicação consecutiva ocasiona alterações na composição do solo e reduz a produtividade das lavouras (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2015).

Estudos acerca do uso de vinhaça para a produção de biomassa de micro-organismos fotossintetizantes têm sido proposto anteriormente (Tabela 3). Esses estudos mostraram que o uso de vinhaça de cana-de-açúcar, foram bem-sucedidos para algumas cepas de microalgas e cianobactérias. No entanto, o uso deste efluente em altas concentrações pode inibir o crescimento. É bem sabido que nem todas as cepas podem crescer em condições adversas, como as encontradas neste resíduo (SANTANA *et al.*, 2017).

Em 1992, Kadioğlu e Algur relataram aumento do crescimento celular e no conteúdo de pigmentos fotossintéticos de *Chlamydomonas reinhardtii* em cultura usando meio TAP com baixas concentrações de vinhaça (1–5%). Depois, Barrocal *et al.* (2010) alcançaram produtividades de biomassa de 150 a 240 mg L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em culturas de *Spirulina maxima* usando

meio Schlösser contendo de 1 a 7 g L<sup>-1</sup> de vinhaça de beterraba. Por outro lado, Dos Santos *et al.* (2016) investigaram o cultivo de *S. maxima* em meio AO (Aiba e Ogawa), em condições autotróficas (sem vinhaça), heterotróficas e mixotróficas em meio suplementado com 0,1 e 1% de vinhaça de cana-de-açúcar. Ao final, as produtividades obtidas foram menores em condições mixotróficas (48 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), em comparação com os estudos previamente mencionados.

**Tabela 3.** Diferentes abordagens da vinhaça para o cultivo de micro-organismos fotossintéticos.

Micro-organismos fotossintetizante	Vinhaça	Desenho experimental	Resultados	Referencias
<i>S. máxima</i>	Vinhaça de beterraba	Cultivo com vinhaça (MSV) (1 a 7 g L <sup>-1</sup> ) e vinhaça diluída alcalinizada (MVA) (2 e 5 g L <sup>-1</sup> )	Produtividades de 150 a 240 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> em meio contendo até 5 g L <sup>-1</sup> de MSV e MVA.	Barrocal <i>et al.</i> (2010)
<i>C. vulgaris</i>	Vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida	Cultivo em vinhaça biodigerida em concentrações (100, 50 e 25%)	A maior produtividade (70 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) usando meio com 100% de vinhaça biodigerida	Marques <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus sp.</i>	Vinhaça de cana-de-açúcar	Cultivo em meio suplementado com vinhaça entre 0 e 40%.	É possível cultivar microalgas em concentrações de até 40%	Ramirez <i>et al.</i> (2014)
<i>S. platensis</i>	Vinhaça de beterraba	Cultivo em meio suplementado com vinhaça de beterraba (2 e 5 g L <sup>-1</sup> )	A concentração máxima de biomassa foi de 3,6 g L <sup>-1</sup> em meio com 2 g L <sup>-1</sup> de vinhaça.	Coca <i>et al.</i> (2015)
<i>N. oleoabundans</i>	Vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida	Cultivo em vinhaça biodigerida com concentrações (2, 4, 6 e 8%)	A máxima concentração celular foi obtida em meio adicionado de 1 g L <sup>-1</sup> de NaHCO <sub>3</sub> e 6% de vinhaça	Olguín <i>et al.</i> (2015)
<i>D. subspicatus</i>	Vinhaça de cana-de-açúcar	Cultivo em vinhaça a diferentes temperaturas (15 a 40 °C)	Máxima produtividade lipídica a 20 °C	Altenhofen da Silva <i>et al.</i> (2017)
<i>C. vulgaris</i>	Vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida	Cultivo em meio com vinhaça e vinhaça biodigerida com concentrações (10 a 100%)	A maior concentração celular foi obtida em 80% de vinhaça biodigerida e em 60% de vinhaça convencional.	Candido e Lombardi (2018)

<i>C. biconvexa</i> Embrapa LBA40 <i>Micractinium sp.</i> Embrapa LBA32	Vinhaça de cana-de-açúcar	Cultivo em vinhaça 100% clarificada e vinhaça diluída 50%	Produtividades médias de biomassa até 222 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> de massa seca	Santana <i>et al.</i> (2017)
<i>Micractinium sp.</i> ME05	Vinhaça de cana-de-açúcar	Crescimento heterotrófico e mixotrófico em concentrações de vinhaça (2, 5, 10 e 20%)	Concentrações de biomassa de 1,21 e 0,93 g. L <sup>-1</sup> obtidos nas concentrações de 5 e 10%, respectivamente	Engin <i>et al.</i> (2018)

Estudos mostram que os micro-organismos fotossintetizantes cultivados em meio mixotrófico apresentam maior porcentagem de crescimento e concentração final de biomassa, em comparação com o meio exclusivamente autotrófico. Como descrito por Marquez *et al.* (1993), foram obtidas concentrações de biomassa de 1,8 e 2,5 g L<sup>-1</sup> de *S. platensis* crescidas em cultura autotrófica e mixotrófica, respectivamente. Também Chen e Zhang (1997) obtiveram concentrações de biomassa de 2,0 e 2,4 g L<sup>-1</sup> para *S. platensis* em culturas autotróficas e mixotróficas. No entanto, também foi relatado que a cultura mixotrófica de microalgas pode ser inibida, inclusive quando a fonte de carbono é aplicada mesmo em baixa concentração. Por exemplo, Chen e Johns (1994) relataram que a microalga *C. reinhardtii* começou a ser inibida em uma concentração de acetato acima de 6,7 mmol L<sup>-1</sup>.

Vários estudos descobriram que a presença de substâncias com propriedades antioxidantes, formadas pela reação de Maillard (polímeros nitrogenados marrons e melanoidinas), são frequentemente a causa de um crescimento ruim ou inexistente de microalgas e cianobactérias na vinhaça não tratada. Além disso, altas concentrações de potássio, como as encontradas na vinhaça, podem afetar o crescimento e a viabilidade de algumas cepas. Portanto, o cultivo de microalgas e cianobactérias usando águas residuais é frequentemente alcançado pela degradação de melanoidinas, descoloração e redução de sua carga de DBO e DQO através de pré-tratamento prévio do substrato (por exemplo: tratamento aeróbio e / ou digestão anaeróbica) (Mohana *et al.* 2009; Brasil; *et al.* 2017). Usando essa estratégia, Marques *et al.* (2013) e Candido e Lombardi (2018), relataram que o uso de vinhaça digerida anaerobicamente para cultivar *C. vulgaris* aumentou a produtividade a até 70 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e as velocidades específicas de crescimento para até 1,5-1,6 d<sup>-1</sup>, respectivamente. Olguín *et al.* (2015), aumentaram o crescimento de *N. oleoabundans* usando meio com vinhaça digerida a 2 e 4% e lipídios totais usando vinhaça digerida a 6% suplementada com bicarbonato de sódio.

Ramirez *et al.* (2014) relataram que concentrações de vinhaça em até 40% no meio Guillard promovem o crescimento de *Scenedesmus sp.* Também observaram que concentrações mais altas de vinhaça exigiam maior intensidade de luz e temperatura para garantir o crescimento celular. Nesse estudo, esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de a alta concentração de vinhaça alterar a penetração da luz na cultura. Coca *et al.* (2015) investigaram a influência da intensidade da luz, do tempo de cultivo e da concentração de vinhaça de beterraba na produção de *S. platensis*. A maior produtividade de biomassa ( $122 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) foi obtida utilizando meio mineral suplementado com  $2 \text{ g L}^{-1}$  vinhaça de beterraba, cultivada por 25 dias sob  $72 \text{ } \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Por outro lado, Altenhofen da Silva *et al.* (2017) avaliaram a produtividade lipídica pela microalga *Desmodesmus subspicatus*, cultivada em vinhaça a diversas temperaturas (15 a  $40 \text{ }^\circ \text{C}$ ) e relataram que a maior produtividade lipídica foi atingida em crescimento a  $20 \text{ }^\circ \text{C}$ .

As condições adversas presentes neste efluente não favorecem o cultivo de algumas cepas de microalgas e cianobactérias. Daí a importância de rastrear e selecionar cepas de microalgas robustas capazes de manter altas velocidades de crescimento em sistemas de cultivo baseados em águas residuais. Diante disso, Santana *et al.* (2017) avaliaram a capacidade de crescimento de quarenta microalgas nativas na vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* diluída em 50% ou clarificada, utilizando 100% desta. Duas linhagens de microalgas apresentaram crescimento vigoroso, *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa LBA40 e *Micractinium sp.* Embrapa LBA32. *C. biconvexa* apresentou produtividades de biomassa de 222 e  $182 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  na vinhaça clarificada a 100% e na vinhaça *in natura* a 50%, respectivamente. *Micractinium sp.* apresentou produtividades de biomassa de 164 e  $178 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  na vinhaça clarificada a 100% e na vinhaça *in natura* a 50%, respectivamente. Recentemente, Engin *et al.* (2018) relataram que a cepa *Micractinium sp.* ME05 isolada da flora geotérmica da Anatólia Central foi cultivada com sucesso em condições mixotróficas em vinhaça e suas produtividades de biomassa mais elevadas foram  $160 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  em frasco de 500 mL e  $320 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  em biorreator de 5 L.

### 2.2.3. *Monoraphidium contortum*

*M. contortum* é um micro-organismo fotossintetizante do gênero de algas verdes, pertencente à família Selenastraceae, de acordo à classificação taxonômica apresentada na Tabela 4 (GUIRY; GUIRY, 2015). São células isoladas, fusiformes, sigmoides, que apresentam

tricomas helicoidais com 1 ou 1,5 voltas, afinando gradualmente em direção aos ápices, polos pontiagudos, cloroplasto único, parietal, sem pirenoide (Figura 3). As dimensões das células variam de 1,2-1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 19-25  $\mu\text{m}$  de comprimento, A divisão celular produz 2, 4 ou 8 endósporos (SANT'ANNA *et al.*, 2012).

**Tabela 4.** Classificação taxonômica de *Monoraphidium contortum*.

Domínio	Eucariota
Reino	Plantae
Filo	Chlorophyta
Classe	Chlorophyceae
Ordem	Sphaeropleales
Família	Selenastraceae
Gênero	<i>Monoraphidium</i>
Espécie	<i>Contortum</i>

Fonte: ALGAE BASE (2019)



**Figura 3.** *Monoraphidium contortum*. Fonte: a autora.

O gênero *Monoraphidium* sp., dentre as clorofíceas, está presente em meios com maiores concentração de fósforo, em águas mais rasas (REYNOLDS *et al.*, 2002). Em particular, *M. contortum* já foi associada a ambientes aquáticos denominados perifíton, em ambientes com maiores concentrações de fósforo no Lago das Garças (BARCELOS, 2003) e

no Lago do IAG (Instituto Astronômico e Geofísico), situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) da cidade de São Paulo (FERRAGUT, 2004).

Recentemente, as microalgas da família Selenastraceae surgiram como potenciais candidatas para a produção de biodiesel. Em particular as do gênero *Monoraphidium* tal como *M. contortum* (BOGEN et al., 2013) e *M. minutum* (PATIDAR et al., 2014). A microalga *M. contortum* é considerada uma candidata promissora para aplicações de biocombustíveis líquidos, combinando crescimento robusto com acumulação efetiva de lipídios neutros e perfil de ácidos graxos favorável, especialmente quando é cultivada em condições de carência de nitrogênio (BOGEN et al., 2013).

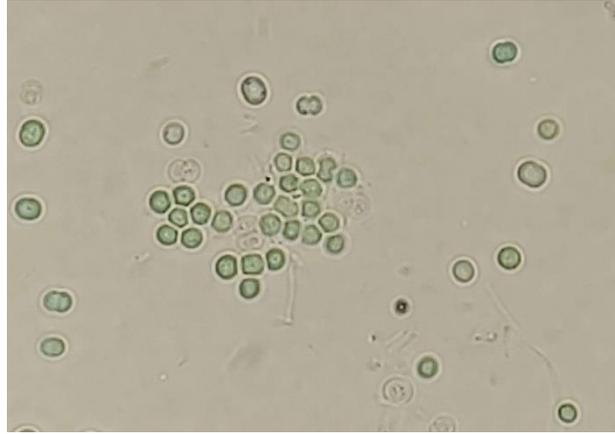
#### 2.2.4. *Synechocystis salina*

*Synechocystis salina* é um micro-organismo fotossintetizante da Divisão Cyanobacteria, pertencente à família Merismopediaceae, de acordo à classificação taxonômica apresentada na Tabela 5. É uma espécie salobra ou marinha, caracterizada por células esféricas, de conteúdo geralmente granuloso, verde-azulado, e diâmetro entre 3,3-4,3 µm, isoladas ou aos pares após a divisão celular, envoltas por mucilagem hialina, homogênea (Figura 4).

**Tabela 5.** Classificação taxonômica de *Synechocystis salina*.

Domínio	Procariota
Reino	Eubacteria
Filo	Cyanobacteria
Classe	Cyanophyceae
Ordem	Synechococcales
Família	Merismopediaceae
Gênero	<i>Synechocystis</i>
Espécie	<i>Salina</i>

Fonte: ALGAE BASE (2019)



**Figura 4.** *Synechocystis salina*. Fonte: a autora.

O gênero *Synechocystis* tem sido reconhecido como promissor para a produção de biodiesel devido a seu alto rendimento de biomassa e exigências de crescimento simples, sendo robusto, pois sobrevive em uma ampla gama de condições de temperatura, salinidade e pH, e é menos suscetível a espécies invasoras, tornando-a favorável para o cultivo em lagoas abertas de escala comercial (CAI *et al.*, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o crescimento de *Monoraphidium contortum* e *Synechocystis salina* em fotobiorreator tubular empregando-se nutrientes derivados de vinhaça tratada por processos biológicos e físico-químicos

#### 3.2. Objetivos específicos

- Realizar tratamentos da vinhaça por clarificação;
- Avaliar a eficiência de remoção de DQO pela clarificação;
- Realizar tratamentos da vinhaça usando processo de cultivo aeróbio;
- Avaliar a eficiência de remoção de DQO após o processo de cultivo aeróbio;
- Realizar tratamento físico químico com carvão ativado em pó (CAP) na vinhaça procedente do processo de cultivo aeróbio;
- Avaliar o processo de clarificação e remoção de DQO após o uso do CAP na vinhaça procedente do processo de cultivo aeróbio;
- Cultivar *M. contortum* e *S. salina* em frascos de Erlenmeyer com vinhaça procedente do processo de cultivo aeróbio e do processo acoplado cultivo aeróbio-CAP;
- Cultivar *M. contortum* e *S. salina* em biorreator tubular em processo descontínuo com vinhaça procedente do processo de cultivo aeróbio e do processo acoplado de cultivo aeróbio-CAP;
- Avaliar a eficiência de remoção de nutrientes após os cultivos de *M. contortum* e *S. salina* em vinhaça tratada;
- Analisar os parâmetros cinéticos e a composição de *M. contortum* e *S. salina* cultivadas na vinhaça tratada.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Tratamento da vinhaça

#### 4.1.1. Obtenção da vinhaça

A vinhaça mista (mistura de caldo e melaço) utilizada nestes ensaios foi gentilmente doada pela Usina Açúcar e Álcool Pederneiras do grupo Zambianco, localizada em Tietê, Estado de São Paulo, Brasil. Este resíduo foi coletado em galões de 60 L e mantido em câmara fria a 8 °C, sendo determinados os parâmetros físico-químicos de pH, DQO, nitrogênio total, nitrato, amônia e fosfato de acordo as técnicas analíticas descritas no item 4.1.5.

#### 4.1.2. Clarificação

O fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) foi utilizado como agente coagulante da vinhaça a ser tratada por processo aeróbio a fim de clarificar este efluente. Em cada operação de clarificação, foram adicionadas  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em recipiente de vidro contendo 13 L de vinhaça *in natura* com pH 4,36, em sistema agitado a 300 rpm. Após adição do coagulante, o valor de pH foi ajustado para  $7,5 \pm 2$  com NaOH a 40 %, mantendo-se a agitação por 10 min. Após esse tempo, a agitação foi interrompida para se completar a floculação e foi determinado o tempo de sedimentação. A partir do sobrenadante e do precipitado, foram determinados os valores de demanda química de oxigênio (DQO) e concentração expressa em massa seca (itens 4.1.5.2 e 4.1.5.8, respectivamente). Os elementos fósforo e potássio e a quantificação do carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) foram analisados no sedimento (item 4.1.5.9).

#### 4.1.3. Tratamento por processo aeróbio

Para o tratamento aeróbio da vinhaça foi usado um biorreator de 22 cm de diâmetro e 46 cm de altura (Figura 5), de capacidade nominal de 14 L, com eixo composto por três agitadores tipo turbina, com frequência de agitação de 400 rpm. Para o tratamento da vinhaça, foi adotado um processo semi-contínuo aeróbio, com volume de líquido de 12 L e a vazão específica de aeração foi de 0,2 VVM. O mosto para este processo foi proveniente do processo de coagulação-floculação na diluição 1:2. Os valores de pH foram ajustados a  $7,5 \pm 0,5$

diariamente com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1,0 M) e os sistemas foram operados durante 26 – 28 dias em condições mesófilas a uma temperatura  $25 \pm 2$  °C. O inóculo do biorreator aeróbio consistiu de cepas de origem comercial, em mistura presente em matriz orgânica, composta por *Bacillus subtilis*,  $2,73 \times 10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>; *Pseudomonas stutzeri*,  $6,46 \times 10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>; *Bacillus sp.*  $2,82 \times 10^8$  ufc.g<sup>-1</sup> e *Escherichia hermannii*  $3,25 \times 10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>, além dos micro-organismos provenientes da própria vinhaça. Foram feitos 2 lotes de processos semi-contínuos, em duplicata. Os biorreatores foram submetidos a fração de corte de 30% quando o valor de DQO ficava estável no meio de cultivo. Amostras foram recolhidas em dias alternados para análises físico-químicas de DQO, nitrogênio total, nitrato, amônia e fosfato na fração líquida dos cultivos, conforme metodologias descritas no item 4.1.5. Em cada corte realizado, o meio era centrifugado a 4500 rpm por 20 minutos para a separação das frações líquida e celular. Nos processos subsequentes, foram utilizadas as frações líquidas da vinhaça tratada biologicamente. O primeiro lote de vinhaça tratada biologicamente (processo semi-contínuo aeróbio de cultivo) foi destinado para o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes em frascos de Erlenmeyer. O segundo lote de vinhaça tratada biologicamente passou por um processo subsequente de clarificação com carvão ativado em pó (CAP) antes dos cultivos dos micro-organismos fotossintetizantes que ocorreram em fotobiorreator tubular.



**Figura 5.** Reator aeróbio. Fonte: A autora

#### 4.1.4. Adsorção com carvão ativado em pó

Os efluentes obtidos ao final do processo de cultivo aeróbio em cada ciclo, após centrifugação, foram tratados com carvão ativado em pó (CAP) para serem realizadas a descoloração e a diminuição de matéria orgânica deles. Foram realizados ensaios de *Jar Test* (Figura 6), variando a dosagem do CAP (0,5; 1; 5; 10; 20 e, 30 g L<sup>-1</sup>). Inicialmente, em 400 mL de vinhaça tratada biologicamente, foram adicionadas simultaneamente as dosagens de CAP correspondentes a cada ensaio e submetidos à agitação de 250 rpm por 60 min. Decorrido este tempo, o sistema de agitação foi desligado e em seguida as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm por 20 min. Foram determinados os parâmetros físico-químicos, DQO e descoloração da vinhaça (itens 4.1.5.2 e 4.1.5.7). A concentração máxima de CAP onde ainda foi linear o decaimento da coloração (absorbância) foi usada como base para o preparo do meio de cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes.



**Figura 6.** Ensaios em *Jar Test*. Fonte: a autora.

#### 4.1.5. Técnicas analíticas

##### 4.1.5.1. pH

O valor de pH foi medido em potenciômetro Metler Toledo 2100E, com uso de eletrodo que foi imerso diretamente na vinhaça.

#### 4.1.5.2. Demanda química de oxigênio (DQO)

A análise da DQO foi determinada pelo método colorimétrico DR2000 descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Em capela, a DQO foi determinada partindo-se de 2,5 mL das amostras diluídas a uma razão de 1:100 (v/v) e transferidas para frascos de vidro (diâmetro 16 x 100 mm), aos quais foram adicionados previamente 1,5 mL de solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$  20,43 g L<sup>-1</sup>) contendo sulfato de mercúrio ( $HgSO_4$  33,3 g L<sup>-1</sup>) para minimizar a interferência causada pelos cloretos, e posteriormente à amostra foram adicionados 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado contendo o catalisador sulfato de prata (5,5 g  $Ag_2SO_4/500$  mL  $H_2SO_4$ ). Após a adição dos reagentes, os tubos de reação foram tampados e levados para o bloco digestor a 150 °C por duas horas. As análises foram realizadas em duplicata e feito o branco com água destilada, sendo que o branco foi utilizado para zerar a absorbância no espectrofotômetro. Após a digestão, os tubos foram retirados do bloco e resfriados. Em seguida, agitaram-se os frascos e aguardou-se sua sedimentação. As leituras das amostras foram realizadas em um espectrofotômetro, na faixa de 600 nm (região de maior absorção do cromo III).

Para o cálculo da DQO, foi realizada uma curva de calibração, onde se utilizou como padrão o biftalato de potássio. A concentração de 1mg L<sup>-1</sup> deste composto, ao ser oxidada, corresponde a uma DQO de 1,176 mg O<sup>2</sup> L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.5.3. Nitrogênio total

O Nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal, que consiste em três etapas: na primeira, as amostras foram digeridas a 350 °C, com uso de  $H_2SO_4$  concentrado, com adição de catalisador metálico. Nessas condições, ocorre a oxidação completa da matéria orgânica, sendo o nitrogênio amoniacal fixado no sistema na forma de sulfato de amônio. Na segunda etapa, após destilação alcalina com NaOH, a amônia é coletada em uma solução saturada de ácido bórico e, por último, a concentração de nitrogênio é determinada por titulação da solução com HCl 0,020 N. Neste método está incluída a quantidade de amônia presente no meio, mas não a quantidade de nitrato.

#### 4.1.5.4. Nitrato total

Em 10 mL da amostra (triplicata) se adicionou 1 mL de ácido clorídrico 1N, após tampar e misturar bem, a concentração de nitrogênio foi avaliada utilizando-se um espectrofotômetro a uma longitude de onda inicial de 220 nm para obter a leitura do nitrato e posterior em 275 nm para se determinar as interferências de matéria orgânica dissolvida, o cálculo das concentrações consiste em subtrair duas vezes o valor da absorbância de 275 nm do valor da absorbância 220 nm, obtendo assim o valor real do nitrato ( $Abs\ 220 - 2Abs\ 275$ ) (APHA, 2000).

#### 4.1.5.5. Nitrogênio amoniacal

O método consiste na reação da amônia com cloro para formação da monocloramina, que reage com o fenol, formando o indofenol um complexo de coloração azul que absorve em 630 nm (KOROLEFF, 1983). Para isso, em 10 mL da amostra previamente filtrada, foram adicionados 1,0 mL de solução de citrato trissódico, 1,0 mL de solução fenólica e 1,0 mL de ácido dicloroisocianúrico (Trione). Após deixar as amostras no escuro por três horas, foram medidos os valores das absorbâncias dos padrões e das amostras a 630 nm.

#### 4.1.5.6. Fosfato total

O ortofosfato foi medido através do método colorimétrico do azul de molibdênio. Este método pressupõe, que em solução ácida, o ortofosfato reage com o molibdato de amônio e o tartarato de antimônio e potássio e, ácido ascórbico formando um ácido heteropolar-ácido fosfomolibdico (reagente misto), que é reduzido pelo ácido ascórbico a um complexo azul intenso (EATON *et al.*, 1995). Para determinar o ortofosfato, se precedeu da seguinte forma: a 10 mL da amostra da vinhaça filtrada em membrana de vidro (45  $\mu$ m de diâmetro), de porosidade de 0,7  $\mu$ m, adicionou-se 1,0 mL do reagente misto, após 20 minutos foram feitas as leituras de absorbância contra o menor branco a 882 nm.

#### 4.1.5.7. Descoloração da vinhaça

A atividade de descoloração da melanoidina pelo CAP foi avaliada medindo a diminuição da intensidade da cor em absorbância a 475 nm após as amostras serem previamente

centrifugadas a 4500 rpm por 20 min. e diluídas 10 vezes com tampão acetato 0,1 M (pH 6,0). (SIRIANUNTAPIBOON *et al.*, 1995) O rendimento de descoloração foi expresso como o grau de diminuição da absorbância a 475 nm em relação à absorbância inicial no mesmo comprimento de onda (Equação 1).

$$Descoloração (\%) = \frac{(Abs\ inicial - Abs\ final)}{Abs\ inicial} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.1.5.8. Concentração expressa em massa seca

Para a determinação da massa seca, alíquotas de 10 mL da vinhaça *in natura*, do sobrenadante e precipitado após processo de clarificação (item 4.1.2), foram colocadas em placa de Petri previamente seca e levadas a estufa de circulação de ar forçada a 60 °C por 24 h e secas, sendo novamente pesadas. O cálculo da massa foi realizado a partir da Equação 2.

$$MS = \frac{(M_{f2} - M_{f1})}{V_f} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: MS é a concentração expressa em massa seca da amostra (g L<sup>-1</sup>), M<sub>f1</sub> é a massa da placa seca (g), M<sub>f2</sub> é a massa da placa com massa seca (g) e V<sub>f</sub> é o volume usado (L).

#### 4.1.5.9. Análise elementar quantitativa de elementos

A massa seca do precipitado obtido após o processo de clarificação foi enviado à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a análise quantitativa dos elementos fósforo (P) e potássio (K) pela técnica ICP OES (espectrometria de emissão óptica com plasma). Esta Central Analítica também realizou a análise elementar de CHN (Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio) da massa seca do precipitado usando o equipamento Perkin Elmer - CHN 2400.

## 4.2. Cultivos de micro-organismos fotossintetizantes em vinhaça

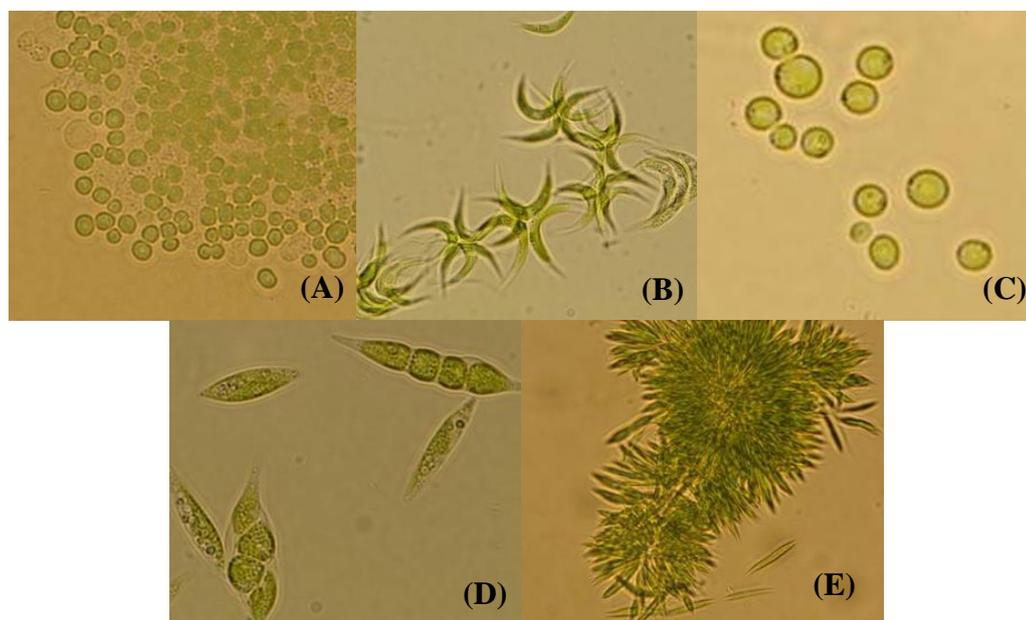
### 4.2.1. Seleção dos micro-organismos fotossintetizantes

#### 4.2.1.1. Micro-organismos e manutenção

Os micro-organismos fotossintetizantes utilizados para a realização dos cultivos foram:

- *S. salina* (J2-5A-i2) isolada do Rio Grajaúna - Estação Ecológica Juréia-Itatins;
- *Monoraphidium contortum* (CB3-b) isolada do Parque Cotia-Pará - Núcleo Itutinga-Pilões;
- *Chlorella* (CB2-C) isolada do Rio Pilões - Núcleo Itutinga-Pilões;
- *Elakatothrix* (CB2-b) isolada do Rio Pilões - Núcleo Itutinga-Pilões e
- *Monoraphidium contortum* (P3Fb-Re-b) isolada do Rio Paciência - Núcleo Picinguaba-Ubatuba (Figuras 7A, 7B, 7C, 7D e 7E).

Todas as cepas foram identificadas pelo Instituto de Botânica de São Paulo. As cepas isoladas foram mantidas em meio Bold padrão (UTEX, 2010) com  $\text{NaNO}_3$  como fonte de nitrogênio (Tabela 6).



**Figura 7.** (A) Cianobactéria *S. salina* (J2-5A-i2) (B) Microalga *Monoraphidium contortum* (CB3-b) (C) Microalga *Chlorella* (CB2-C) (D) Microalga *Elakatothrix* (CB2-b) e (E) Microalga *Monoraphidium contortum* (P3Fb-Re-b).

**Tabela 6.** Composição do Meio Bold padrão (UTEX, 2010) por litro de água destilada.

Componentes (%)	Volume (mL)
Nitrato de sódio (2,5)	10
Cloreto de cálcio dihidratado (0,25)	10
Sulfato de magnésio heptahidratado (0,75)	10
Fosfato de potássio dibásico (0,75)	10
Fosfato de potássio monobásico (1,75)	10
Cloreto de sódio (0,25)	10
*PIV solução de metais	6
**Mix de vitaminas	1

\* PIV solução de metais (em 100 mL de água destilada): Na<sub>2</sub>EDTA, 75 mg; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 9,7 mg; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 4,1 mg; ZnCl<sub>2</sub> 0,5 mg; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,2 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,4 mg.

\*\*Mix de Vitaminas (em 10 mL de água destilada): Cianocobalamina, 1,35 mg; Biotina, 11 mg; Tiamina, 0,25 mg.

#### 4.2.1.2. Meio de cultura vinhaça mineral (MVM)

Com base nas concentrações de compostos inorgânicos presentes na vinhaça (MARQUES, 2006), foi preparado um meio sintético, denominado meio de cultura vinhaça mineral (MVM), que é apresentado na Tabela 7.

#### 4.2.1.3. Cultivos em frascos de Erlenmeyer com meio MVM

Foram realizados ensaios em duplicata utilizando frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de vinhaça mineral (MVM), utilizando uma concentração celular inicial de 50 mg L<sup>-1</sup>, de cada micro-organismo fotossintetizante (item 4.2.1.1) na fase de crescimento exponencial. Os frascos foram mantidos sob temperatura e agitação constantes (25 ± 2 ° C e 100 rpm, respectivamente). A intensidade luminosa foi de 80 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (PÉREZ-MORA *et al.*, 2016) e o valor de pH inicial foi de 7,5 ± 0,3 (MAYO, 1997). O meio utilizado foi esterilizado previamente a 121 °C por 30 minutos.

**Tabela 7.** Composição do meio de cultura vinhaça mineral.

Composição da vinhaça		Meio vinhaça mineral (MVM)	
Compostos	Concentrações (mmol L <sup>-1</sup> )	Compostos	Concentrações (g L <sup>-1</sup> )
K	44,6	KNO <sub>3</sub>	5,05
N	50		
P	2,95	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,19
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16
Ca	27,5	CaCl	1,96
SO <sub>4</sub>	7,91	MgSO <sub>4</sub>	1,00
Mg	12,2		

#### 4.2.2. Cultivos de *M. contortum* e *S. salina* em frascos de Erlenmeyer com vinhaça proveniente do processo de cultivo aeróbio e do processo acoplado cultivo aeróbio-CAP.

##### 4.2.2.1. Micro-organismos e manutenção

Os micro-organismos fotossintetizantes utilizados para a realização dos cultivos em frascos de Erlenmeyer foram a cianobactéria *Synechocystis salina* (J2-5A-i2), CCMA-UFSCar 692 e a microalga *Monoraphidium contortum* (P3Fb-Re-b), CCMA-UFSCar 701. Foram mantidas em meio Bold padrão (UTEX, 2010) com NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio (Tabela 6).

##### 4.2.2.2. Preparo do inóculo

Para preparar os inóculos, em câmara de fluxo laminar de maneira asséptica, alíquotas de 10 mL a partir dos frascos de Erlenmeyer contendo os pré-inóculos das cepas *Synechocystis salina* e *Monoraphidium contortum* foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo cada um 250 mL de meio Bold. Depois de inoculados, os frascos de Erlenmeyer

foram acondicionados em incubadora a  $25 \pm 2$  °C com agitação orbital de 100 rpm, com intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (P\u00c9REZ-MORA *et al.*, 2016). As c\u00e9lulas foram mantidas em crescimento por 20 dias, e, ap\u00f3s esse tempo foram centrifugadas a 4500 rpm por 20 min. Ap\u00f3s a centrifuga\u00e7\u00e3o, o sedimento foi ressuspenso em 200 mL de meio Bold. Esta cultura, proveniente de crescimento exponencial, foi utilizada como in\u00f3culo para os ensaios contendo a vinha\u00e7a tratada, bem como cultivos padr\u00e3o, onde se utilizou o meio Bold.

#### 4.2.2.3. Cultivo em frascos de Erlenmeyer

Foram realizados ensaios em triplicata utilizando frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de vinha\u00e7a proveniente do processo de cultivo aer\u00f3bio, considerando as dilui\u00e7\u00f5es em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 vinha\u00e7a que sofreu o processo de clarifica\u00e7\u00e3o correspondentes a 2, 5 e 10 vezes para *S. salina* ou *M. contortum*. Para o processo acoplado de cultivo aer\u00f3bio-CAP, a vinha\u00e7a tratada foi utilizada na dilui\u00e7\u00e3o final de 2 e 5 vezes para *S. salina* e *M. contortum*, respectivamente. Como a dilui\u00e7\u00e3o indicada refere-se \u00e0 vinha\u00e7a que foi clarificada, quando esta foi submetida ao processo de cultivo aer\u00f3bio, foi dilu\u00edda 1:2, como comentado anteriormente. Assim, uma dilui\u00e7\u00e3o de 2 vezes significa que a pr\u00f3pria fra\u00e7\u00e3o l\u00edquida da vinha\u00e7a tratada por processo de cultivo aer\u00f3bio foi utilizada para o crescimento das microalgas. No caso das dilui\u00e7\u00f5es de 5 e 10 vezes, foram feitas dilui\u00e7\u00f5es complementares, utilizando \u00e1gua deionizada para essa finalidade. Todos os cultivos foram inoculados com concentra\u00e7\u00e3o celular inicial de  $1 \times 10^6$  c\u00e9lula  $\text{mL}^{-1}$ . Os meios utilizados foram esterilizados previamente a 121 °C por 30 minutos. Os micro-organismos fotossintetizantes tamb\u00e9m foram cultivados em meio padr\u00e3o Bold. Os frascos foram mantidos sob temperatura e agita\u00e7\u00e3o constantes de  $25 \pm 2$  °C e 100 rpm, respectivamente sendo a intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (P\u00c9REZ-MORA *et al.*, 2016). Estes meios de cultura foram ajustados a valores de pH de  $7,5 \pm 0,3$  (MAYO, 1997). Os experimentos foram finalizados quando se obteve a estabiliza\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o celular.

### 4.2.3. Cultivos *M. contortum* e *S. salina* em biorreator tubular com vinhaça proveniente do processo de cultivo aeróbio e do processo acoplado cultivo aeróbio-CAP

#### 4.2.3.1. Micro-organismo, condições de manutenção e preparo do inóculo

Os micro-organismos fotossintetizantes utilizados para a realização dos cultivos em fotobiorreator foram a cianobactéria *Synechocystis salina* (J2-5A-i2), CCMA-UFSCar 692 e a microalga *Monoraphidium contortum* (P3Fb-Re-b), CCMA-UFSCar 701. Foram mantidas em meio Bold padrão (UTEX, 2010) com  $\text{NaNO}_3$  como fonte de nitrogênio (Tabela 6). Os inóculos foram preparados de acordo com o item 4.2.2.2.

#### 4.2.3.2. Fotobiorreator tubular

Utilizou-se fotobiorreator tubular do tipo *air-lift* (Figura 8), que foi construído no Laboratório de Biotecnologia Microalgal do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. É constituído de tubos de vidro borossilicato transparentes de diâmetro interno de 10 mm, com inclinação de 2%, os quais são interligados por mangueiras de silicone. Na parte superior há um frasco degaseificador, agitado com eixo de frequência de agitação de 100 rpm por meio de uma turbina tipo Rushton (PÉREZ-MORA, 2019).



**Figura 8.** Fotobiorreator tubular do tipo *air-lift*.

#### 4.2.3.3. Descrição do ensaio

Uma suspensão de micro-organismos fotossintetizantes *M. contortum* ou *S. salina* foi adicionada ao biorreator tubular, na concentração inicial de  $1 \times 10^6$  célula  $\text{mL}^{-1}$ . O volume de trabalho foi de 3,7 L, tendo como meio de cultivo a vinhaça proveniente do processo cultivo aeróbio ou processo de cultivo aeróbio-CAP, diluída 2 vezes para o cultivo de *S. salina* e diluída 5 vezes para o cultivo de *M. contortum*. Os micro-organismos fotossintetizantes também foram cultivados em meio Bold como padrão. Os meios utilizados foram esterilizados previamente a  $121^\circ\text{C}$  por 30 minutos. A temperatura foi de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (MATSUWAKI; HARAYAMA; KATO, 2015), sendo a velocidade da cultura na tubulação de  $26,5 \text{ cm s}^{-1}$  e a intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (P\u00c9REZ-MORA *et al.*, 2016). Estes meios de cultura foram ajustados a valores de pH de  $7,5 \pm 0,3$  (MAYO, 1997), que foi poss\u00edvel pelo uso de um aparelho controlador de pH acoplado a uma v\u00e1lvula solenoide ligada a um cilindro de g\u00e1s carb\u00f4nico puro. A velocidade da cultura foi equivalente a  $26,5 \text{ cm s}^{-1}$  com uso de bomba de ar para o sistema de *air-lift*. O sistema contou tamb\u00e9m com 3 esferas de nylon, de modo que fosse evitada a ader\u00eancia das c\u00e9lulas nos tubos do fotobiorreator (P\u00c9REZ-MORA *et al.*, 2016). Os experimentos foram finalizados quando se obteve a estabiliza\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o celular.

#### 4.2.4. T\u00e9cnicas anal\u00edticas

##### 4.2.4.1. Determina\u00e7\u00e3o do valor de pH

Os valores de pH foram medidos com potenci\u00f4metro Metler Yoledo 2100E.

##### 4.2.4.2. Concentra\u00e7\u00e3o celular

Nos ensaios preliminares, onde houve a escolha dos micro-organismos fotossintetizantes para os cultivos em vinha\u00e7a tratada, a concentra\u00e7\u00e3o celular foi expressa em massa seca  $\text{L}^{-1}$ , com uso de uma curva de calibra\u00e7\u00e3o relacionando densidade \u00f3ptica e concentra\u00e7\u00e3o celular ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para cada esp\u00e9cie avaliada. Para a quantificar a concentra\u00e7\u00e3o celular, expressa em c\u00e9lulas  $\text{mL}^{-1}$ , utilizou-se c\u00e2mara de Neubauer.

#### 4.2.4.3. Análise da biomassa seca

Ao final dos cultivos a biomassa microalgal foi centrifugada, lavada com água deionizada, seca com ventilação a 65 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), macerada e submetida às técnicas analíticas descritas a seguir.

##### 4.2.4.3.1. Lipídio totais

Foi utilizada uma mistura de solvente apolar e polar para determinação da fração lipídica total (PELIZER *et al.*, 1999). Massa seca de 1,0 g de amostra foi colocada em extrator Soxhlet e foi mantida em refluxo com os solventes clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 v/v até o líquido extrator tornar-se límpido (PIORRECK, 1984; OLGUÍN *et al.*, 2001). A seguir, a mistura de solvente contendo a fração lipídica total foi recuperada em rota-evaporador. O teor lipídico da biomassa foi calculado pela relação entre a massa da fração lipídica total e a massa seca da biomassa utilizada no processo de extração.

##### 4.2.4.3.2. Proteína totais

Para a determinação do teor de proteínas nas biomassas dos micro-organismos fotossintetizantes, utilizou-se o método de Kjeldhal, utilizando-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio em proteínas (AOAC, 1984). Massa de  $20 \pm 0,5$  mg das amostras desengorduradas, resultantes da determinação de lipídios, foram submetidas a digestão a 350 °C, na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e o catalisador (sulfato de prata e sulfato de cobre). Neste processo, a biomassa, o nitrogênio orgânico da biomassa é convertido em amônia, que é mantida no sistema na forma de sulfato de amônio. Este material que passou pelo processo de digestão ácida é, em seguir, alcalinizado e aquecido em destilador com arraste a vapor, sendo a amônia recebida em solução saturada de ácido bórico. Este é deslocado em titulação com solução de ácido clorídrico, que é um ácido forte, permitindo, assim determinar a quantidade de nitrogênio na biomassa.

##### 4.2.4.3.3. Cinzas totais

O conteúdo de cinzas na biomassa seca foi determinado após a combustão final da biomassa em mufla, aprox. 0,1 g da biomassa desengordurada foi colada no cadinho seco e

tarado. Em seguida as amostras foram levadas à mufla, aumentando a temperatura até 600 °C, as temperaturas usadas foram 200 °C por 30 min; 400 °C por 60 min e 600 °C por 90 min, tempo suficiente para eliminar todo o carvão, após este tempo os cadinhos foram levados ao dessecador e pesado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.4.3.4. Carboidratos totais

Sabendo-se os teores de proteínas, lipídios e cinzas na biomassa, foi possível, por diferença, calcular o conteúdo de carboidratos totais nas biomassas dos micro-organismos fotossintetizantes.

#### 4.2.5. Cálculo da produtividade em células

A produtividade em células ( $P_x$ ), expressa em miligramas de células por litro por dia, foi determinada para todos os ensaios realizados em frascos de Erlenmeyer na fase de escolha das cepas que seriam usadas para os cultivos com vinhaça tratada. Neste caso, este parâmetro cinético foi calculado pela relação em concentração celular formada (expressa em  $\text{mg L}^{-1}$ ) e tempo total de cultivo (Equação 3).

$$P_x = \frac{(X_m - X_i)}{T_c} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde  $X_m$  é a concentração celular máxima ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $X_i$  é a concentração celular inicial ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e  $T_c$  é o tempo de cultivo (d).

Nos cultivos onde se utilizou vinhaça tratada como meio nutriente, para medir concentração celular foi utilizada a contagem de células, de modo que a concentração foi expressa em células  $\text{mL}^{-1}$ , sendo, nestes casos, a produtividade em células expressa em células  $\text{mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Tratamentos da vinhaça

#### 5.1.1. Processo de clarificação

Os processos de clarificação são utilizados quando se deseja remover partículas em suspensão de meios líquidos. São empregados em indústrias de bebidas para remover partículas que levam à turbidez. Também no processo de fabricação de açúcar, o caldo de cana-de-açúcar passa por processo de calagem e sulfitação para remoção de partículas em suspensão (LIMA, 2012). No caso de tratamento de águas residuárias, embora a clarificação seja um processo simples, tenha uma ampla opção de insumos químicos para este uso e apresenta baixo custo, há necessidade de monitoramento físico-químico do efluente (pH, por exemplo) e maior geração de volume de lodo, o que leva à necessidade desse gerenciamento e correspondente custo da operação (CRINI; LICHTFOUSE, 2019). Desse modo, quando se trabalha com águas residuárias nem sempre a clarificação é utilizada, sendo que os materiais orgânicos em suspensão são destinados para o tratamento biológico do efluente, seja este anaeróbio ou aeróbio. No caso da vinhaça, um resíduo da indústria sucro-alcooleira, de um modo geral, em sua biodigestão não tem sido considerada a etapa de clarificação, o que pode ser decorrente da baixa carga de material orgânico suspenso, que é menor que 10 % da carga orgânica total (GRANATO, 2003). Tendo em vista que o processo de escolha para o tratamento biológico da vinhaça tem sido a biodigestão (MORAES *et al.*, 2015), e considerando que neste processo o próprio material em suspensão pode levar à produção de energia na forma de metano, de fato, seria mais apropriado este procedimento. No entanto, se há a intenção de usar esse material posteriormente em cultivo aeróbio e subsequente uso em processo onde não é desejada a presença de materiais particulados, como é o caso do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, a etapa de clarificação é importante. Dentre os agentes flocculantes, considerando que o sedimento poderia ter uso proposto como fertilizante, neste trabalho optou-se pelo uso de fosfato monossódico, pois seria, em parte, carregado para o sedimento da vinhaça tratada. Adicionalmente, a fração deste sal que permanecesse em solução contribuiria para o crescimento das bactérias que fariam a depuração do material orgânico dissolvido presente na vinhaça e também para o processo subsequente, que seria o cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes. Com a adição de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de fosfato monossódico a ser tratada por processo aeróbio, em temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguida da correção do pH 4,3 da vinhaça *in natura* para 7,5

$\pm 2$  com NaOH a 40 %, sob agitação de 300 rpm por 10 min, aconteceu a formação de flocos constituídos principalmente pela matéria orgânica presente na vinhaça, seguida da precipitação imediata, assim que o agitador foi desligado. O tempo total de precipitação foi de 8 horas. Foi utilizado um volume de 13 L, em um recipiente de 22 cm de diâmetro e 46 cm de altura (Figura 9), sendo que após esse tempo o volume de sobrenadante foi de aproximadamente 60%. Embora o tratamento adotado para a clarificação tenha sido o especificado acima, há possibilidade de novos tratamentos, em diferentes condições de temperatura, tipo e concentração do agente floculante, bem como formas de separação do sobrenadante e sedimentado da vinhaça tratada. Provavelmente, a coagulação aconteceu pela carga positiva do sódio que desestabilizou o material coloidal suspenso (geralmente negativa) e a precipitação pela insolubilização do material pelo aumento do pH com hidróxido de sódio. De fato, Suzin *et al.* (2013) reportaram que é possível a precipitação do fósforo insolúvel em efluente nitrificante utilizando NaOH (soda cáustica), com uma remoção até 84 %.



**Figura 9.** Vinhaça *in natura* antes da coagulação-floculação (A) e após precipitação (B).

Os resultados referentes a DQO e concentração expressa em massa seca do sobrenadante e do sedimento, bem como a análise dos elementos fósforo, potássio, carbono, hidrogênio e nitrogênio do sedimento são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados referentes à caracterização físico-química da vinhaça obtida do processo coagulação-floculação.

<b>Vinhaça</b>	<b>DQO</b> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	<b>Conc. em</b> <b>massa seca</b> (mg L <sup>-1</sup> )	<b>P</b> (g P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> L <sup>-1</sup> )	<b>K</b> (g K <sub>2</sub> O L <sup>-1</sup> )	<b>C</b> (g L <sup>-1</sup> )	<b>H</b> (g L <sup>-1</sup> )	<b>N</b> (g L <sup>-1</sup> )
<i>In natura</i>	26205	35470	-	-	-	-	-
Sobrenadante	20776	30013	-	-	-	-	-
Precipitado	32506	47963	5,0	9,0	11,6	1,8	0,63

- não analisado.

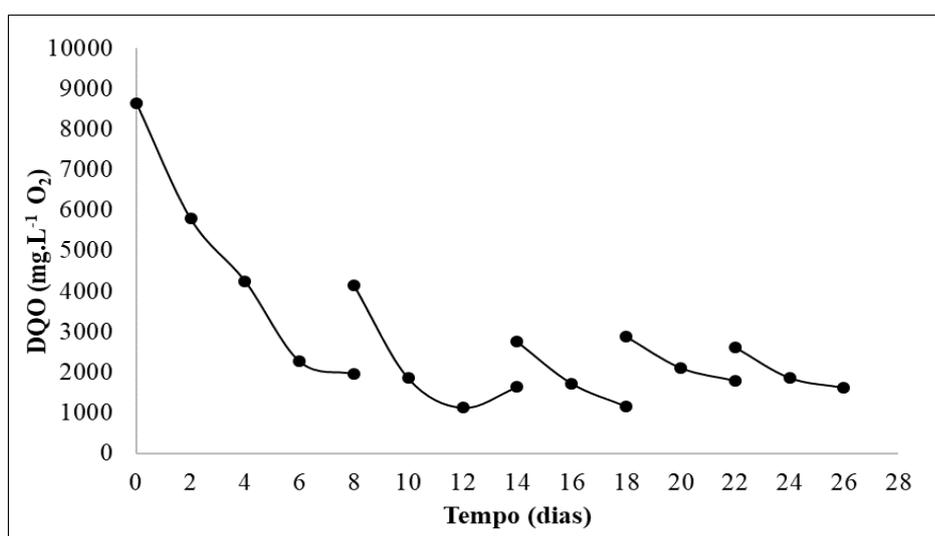
É possível notar por meio destes resultados (Tabela 8) que o valor de DQO foi menor no sobrenadante 20776 mg L<sup>-1</sup>, resultado da precipitação da matéria orgânica. Sabendo-se que a vinhaça *in natura* possui uma DQO de 26204 mg L<sup>-1</sup>, a remoção foi de 20 % aproximadamente. O valor de DQO do precipitado (32506 mg L<sup>-1</sup>) maior que na vinhaça *in natura* era esperado devido ao adensamento da matéria orgânica. Os resultados da concentração expressa em massa seca estão em concordância com os resultados de DQO, com o menor valor desta variável sendo encontrada no sobrenadante (30013 mg L<sup>-1</sup>). Este resultado mostra que o processo de clarificação da vinhaça remove em tempo relativamente curto boa parte da matéria orgânica se comparada com processos biológicos, que são mais demorados. A retirada de material em suspensão também favorece as próximas etapas de tratamento e/ou uso da vinhaça, que é o cultivo aeróbio, bem como o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes. Tendo em vista as concentrações de nitrogênio (0,48 – 0,71 gN L<sup>-1</sup>), fósforo (0,009 – 0,2 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> L<sup>-1</sup>) e potássio (3,3 – 4,6 g K<sub>2</sub>O L<sup>-1</sup>) em vinhaça mista (MARQUES, 2006), os resultados apresentados na Tabela 8 mostram um substancial aumento nas quantidades de potássio e fósforo, mostrando que o sedimento poderia ser utilizado como matéria prima para produção de fertilizantes.

### 5.1.2. Tratamento por processo de cultivo aeróbio

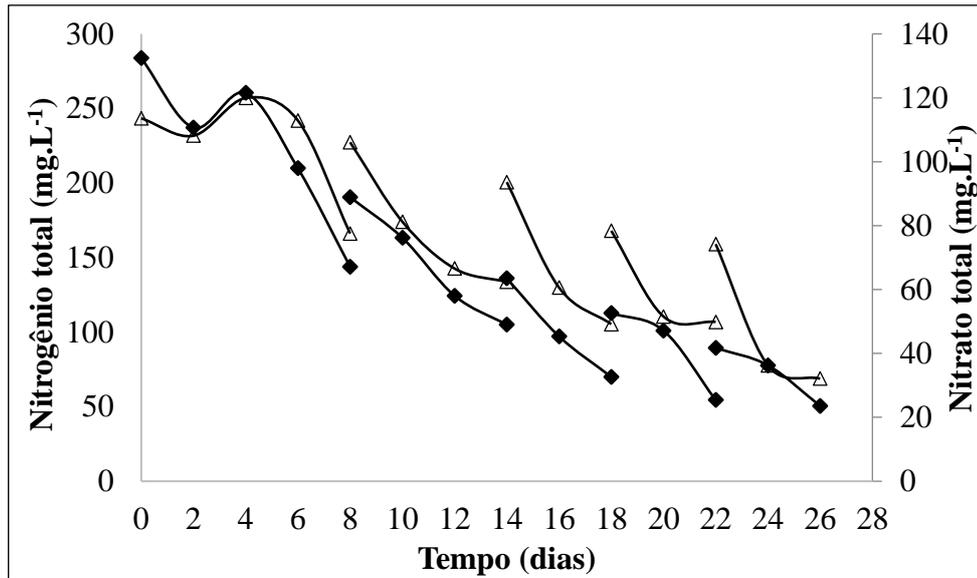
Os sobrenadantes procedentes do processo de clarificação da vinhaça foram tratados por processo semi-contínuo de cultivo aeróbio a fim de reduzir a DQO a valores que permitissem o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes. Para isso, foram realizados 2 conjuntos de experimentos, cada um deles em duplicata. No primeiro conjunto de experimentos, os meios

residuais do cultivo foram destinados ao cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, com ou sem diluição, como explicado em Materiais e Métodos. No segundo conjunto de experimentos, os meios residuais, antes de serem destinados para o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, foram tratados com carvão ativado em pó (item 5.1.3) para serem utilizados para o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes.

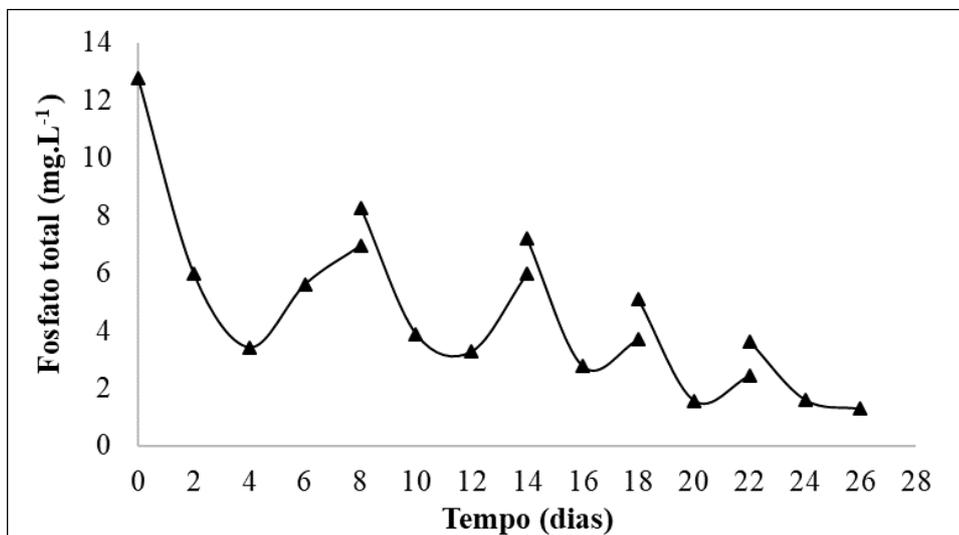
Dentre os tipos de processo de cultivo possíveis, adotou-se o processo semi-contínuo, por facilitar a operacionalização, uma vez que ao final de cada ciclo de cultivo as células que permanecem no reator servem de inóculo para o novo ciclo. Adicionalmente, esse procedimento pode favorecer à adaptação das células no meio de cultivo (BRESAOLA *et al.*, 2019), o que é particularmente importante em processos com uso de matérias-primas de mais difícil metabolização, que é o caso da vinhaça. A vinhaça clarificada foi diluída 1:2 antes de ser utilizada como substrato nos cultivos, pois apresenta alta salinidade, o que poderia prejudicar o metabolismo bacteriano. De fato, a concentração de sólidos fixos na vinhaça *in natura* foi de  $14,3 \text{ g L}^{-1}$ . Os resultados obtidos do acompanhamento dos processos semi-contínuos aeróbios referentes à DQO, nitrogênio total, nitrato e fosfato do primeiro lote estão apresentados nas Figuras 10 a 12 para o primeiro conjunto de experimentos. Os resultados do segundo conjunto de experimentos estão apresentados nas Figuras 13 a 15.



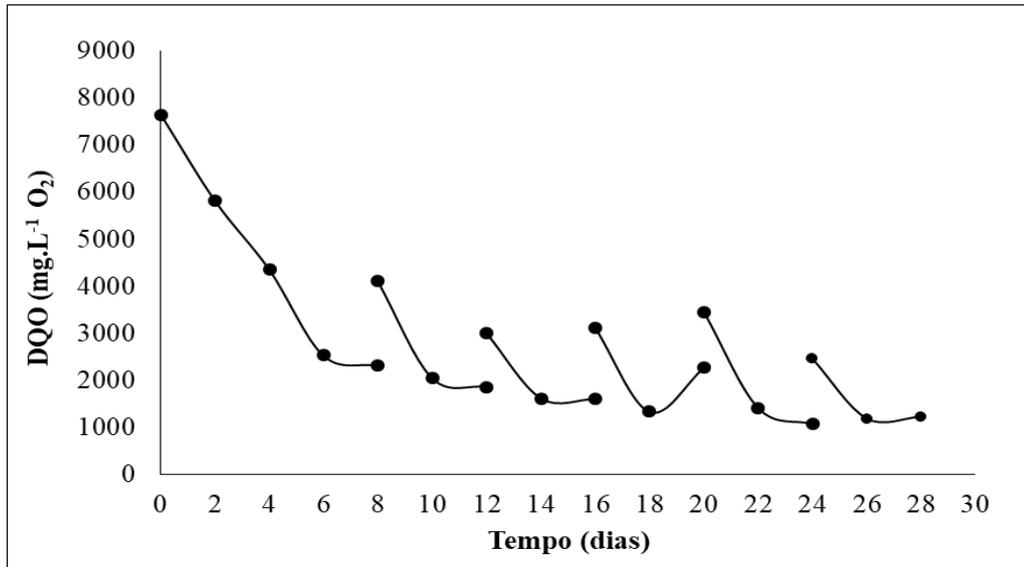
**Figura 10.** Demanda química de oxigênio (DQO) em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do primeiro conjunto de experimentos.



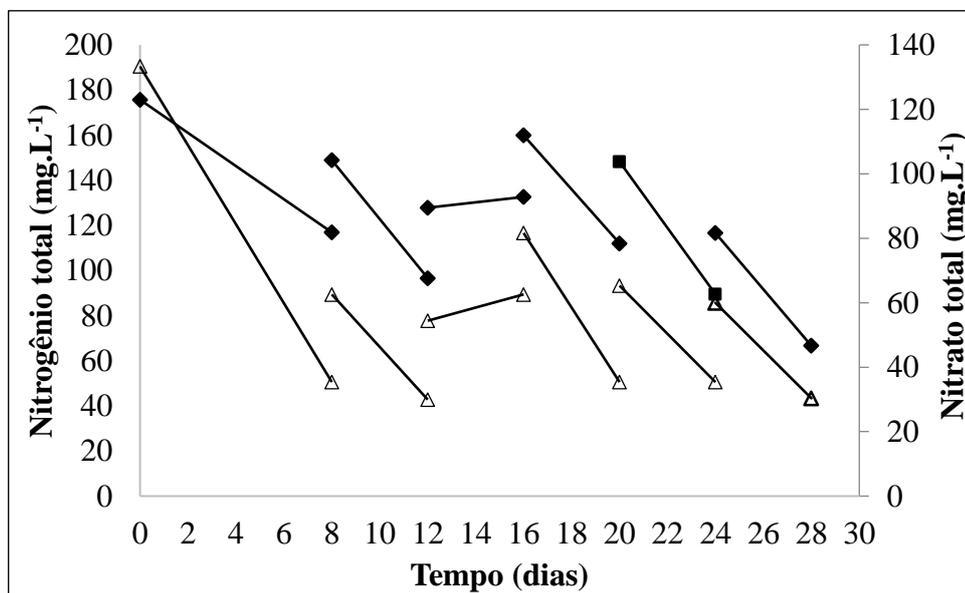
**Figura 11.** Nitrogênio total (◆) e nitrato total (△) em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do primeiro conjunto de experimentos.



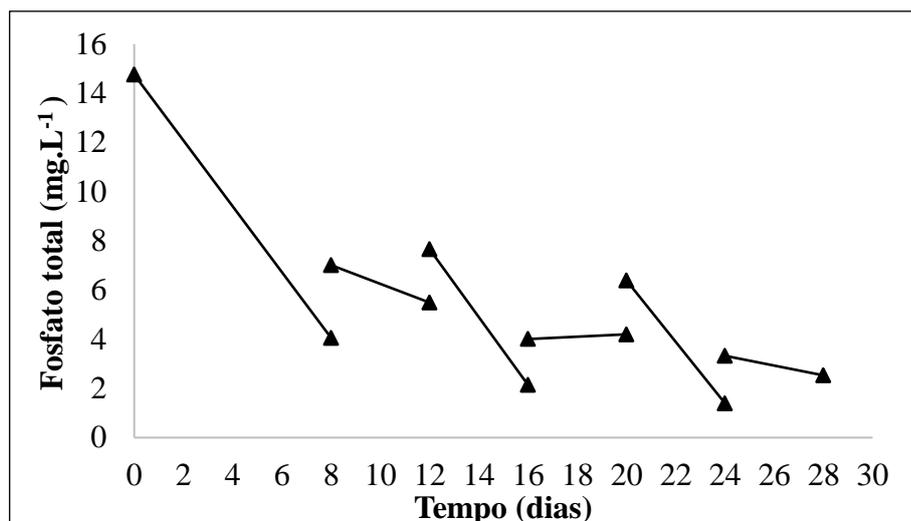
**Figura 12.** Fosfato total em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do primeiro conjunto de experimentos.



**Figura 13.** Demanda química de oxigênio (DQO) em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do segundo conjunto de experimentos.



**Figura 14.** Nitrogênio total ( $\Delta$ ) e nitrato total ( $\blacksquare$ ) em função do tempo do cultivo semi-contínuo aeróbio com vinhaça clarificada como meio de cultivo do segundo conjunto de experimentos.



**Figura 15.** Fosfato total em função do tempo, do tratamento semi-contínuo da vinhaça no segundo lote por processo aeróbio.

As Figuras 10 e 13, referentes aos resultados de DQO da vinhaça ao longo do processo, mostram que houve uma remoção significativa da matéria orgânica tanto para o primeiro e segundo conjunto de experimentos, com valores de 1630 e 1214 mg L<sup>-1</sup>, nos dias 26 e 28, respectivamente, correspondendo a um valor médio de 1422 mg L<sup>-1</sup>. Considerando que a vinhaça clarificada diluída 2 vezes, de um modo geral, apresentou valores de DQO acima de 7000 mg L<sup>-1</sup>, quando dos ciclos do processo semi-contínuo, foi possível remover 30% do volume a cada 4 dias. Esses valores finais de DQO correspondem a vinhaça diluída 2 vezes, considerando o fator de diluição, a vinhaça sem diluição chegaria a um valor de 2844 mg L<sup>-1</sup>. Embora seja comum que efluentes com altos níveis de DQO sejam tratados por processo anaeróbio, o processo aeróbio mostrou alta capacidade de remoção, com possibilidade de obtenção de células que poderiam ser usadas para outras aplicações, como depuração de águas residuais ou para aplicação em lavouras (CARDOZO; ARAÚJO, 2011). Analisando as Figuras 11 e 14, bem como as Figuras 12 e 15, observa-se também ocorreu redução dos nutrientes nitrogenados e fósforo, respectivamente. A cada vez que se fez o corte, com consequente colocação de vinhaça clarificada (diluída 2 vezes), houve, como esperado, um aumento dos níveis tanto de DQO como de nutrientes. No primeiro conjunto de experimentos, foram realizados 4 cortes, enquanto que no segundo conjunto de experimentos foram realizados 5 cortes, que ocorreram sem intercorrências, demonstrando que o processo semi-contínuo tem potencial para a depuração de vinhaça por processo aeróbio.

### 5.1.3. Processo de adsorção com carvão ativado em pó (CAP)

A presença de melanoidina é responsável pela coloração marrom na vinhaça e pode ser um fator limitante para o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes, pois estes necessitam de luz para seu crescimento. A fim de reduzir esta limitação, a vinhaça proveniente do processo semi-contínuo aeróbio correspondente ao segundo conjunto de experimentos foi tratada com diferentes concentrações de CAP (0,5; 1; 5; 10; 20 e, 30 g L<sup>-1</sup>) visando à descoloração e redução de matéria orgânica residual do tratamento biológico.

As médias de resultados referentes à caracterização físico-química desses ensaios, concernente à porcentagem de descoloração e remoção de matéria orgânica em DQO estão apresentados na Tabela 9, sendo que na Figura 16 podem ser evidenciados os tubos com frações líquidas de cada tratamento empregado. O tubo indicado com o termo “biológico” refere-se ao efluente do processo semi-contínuo aeróbio, após sua centrifugação para remoção da fração celular. É evidente a queda da absorbância com o aumento da concentração de CAP empregado, evidenciado pelo aumento da descoloração com o incremento da concentração de CAP empregada (Tabela 9). No entanto, nesta mesma tabela pode ser notado que com o aumento da concentração de carvão ativado em pó de 20 para 30 g L<sup>-1</sup> não houve um aumento significativo da porcentagem de remoção de pigmentos. Na Figura 17 são apresentados os valores de absorbância a 475 nm em função da concentração de CAP.

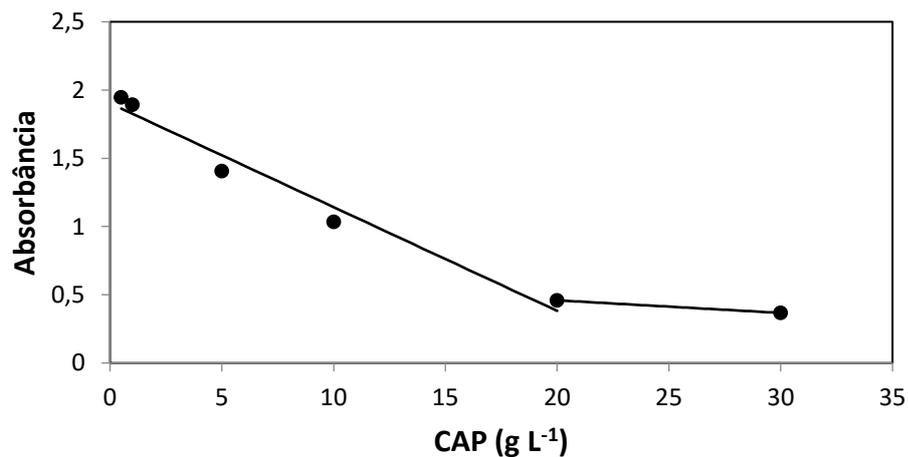
**Tabela 9.** Resultados referentes à caracterização físico-química da vinhaça obtida do processo de adsorção com CAP.

CAP (g L <sup>-1</sup> )	D <sub>475</sub> * (%)	DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )
0,5	12,6	2420,6
1,0	15,0	2386,3
5,0	36,8	2364,9
10,0	53,5	1597,5
20,0	79,4	1108,7
30,0	83,5	924,4

\* Descoloração



**Figura 16.** Vinhaças provenientes de cultivo semi-contínuo aeróbio que foram submetidas a tratamento com diferentes concentrações de CAP. O tubo denominado “Biológico” não sofreu o tratamento com CAP.



**Figura 17.** Absorbância a 475 nm de vinhaças provenientes de cultivo semi-contínuo aeróbio que foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de CAP. No trecho de 0,5 a 20 g L<sup>-1</sup> de CAP, houve uma relação linear ( $\text{Absorbância} = -0,076 \cdot \text{CAP} + 1,902$ ;  $R^2 = 0,9728$ )

A observação da Figura 17 deixa mais claro o fenômeno observado na Tabela 9. Com a utilização de concentração de CAP de até 20 g L<sup>-1</sup> houve um decaimento da absorbância indicando que até esta concentração este composto foi limitante na remoção de pigmento, deixando de ser limitante com maiores concentrações. Dessa forma, a concentração de CAP

escolhida para tratar a vinhaça proveniente dos cultivos aeróbios para os cultivos dos micro-organismos fotossintetizantes foi de 20 g L<sup>-1</sup>.

## 5.2. Cultivo de micro-organismos fotossintetizantes em meio de vinhaça mineral

A vinhaça é um efluente rico em compostos orgânicos, assim como em compostos inorgânicos como potássio, nitrogênio, cálcio, sulfatos, fósforo e magnésio, que em determinadas concentrações podem favorecer ou inibir o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes quando ela é aproveitada para esta finalidade.

A maioria dos estudos acerca do uso de vinhaça para o cultivo de microalgas e cianobactérias têm por objetivo avaliar o crescimento em função da carga orgânica presente no meio. Deve ser ressaltado que a vinhaça também é rica em compostos inorgânicos o que torna o meio muito salino, não podendo ser descartado o efeito salino nos cultivos de micro-organismos fotossintetizantes, pois suas várias espécies apresentam distintas necessidades e resistências a salinidade de meios de cultivo. Assim, tendo em vista que o crescimento de vários micro-organismos fotossintetizantes é dependente de fatores nutricionais e ambientais, foi importante avaliar o crescimento no meio mineral com características semelhantes à vinhaça sem a presença de matéria orgânica. Foram avaliadas cepas de microalgas e uma cianobactéria isoladas de ambientes de mangue do Estado de São Paulo. Os valores de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ) e pH final, são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ) e valor de pH final, obtidos dos cultivos de micro-organismos fotossintetizantes, realizados por processo descontínuo em frascos de Erlenmeyer usando o meio de vinhaça mineral (MVM).

Micro-organismo	pH final	$X_m$ (mg L <sup>-1</sup> )	$P_x$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
<i>M. contortum</i> (CB3-b)	7,2	641	66,5
<i>S. salina</i> (J2-5A-i2)	7,2	434	45,7
<i>Chlorella</i> (CB2-C)	7,1	399	41,8
<i>Elakatothrix</i> (CB2-b)	7,2	229	22,4
<i>M. contortum</i> (P3Fb-Re-b)	7,3	636	67,4

Os cultivos foram iniciados com valores de pH de 6,8 a 7,2. No entanto, ao longo do cultivo, o pH não sofreu uma grande variação em cada um dos ensaios, chegando a valores de pH finais de pH 7,1 a 7,4 (Tabela 10). Segundo Shiraiwa *et al.* (1993), o aumento do pH é consequência da conversão externa do ânion  $\text{HCO}_3^-$  presente no bicarbonato, em  $\text{CO}_2$ , mais hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) durante a fotossíntese pelas células com alta afinidade pela captação do  $\text{CO}_2$ . Conseqüentemente, o consumo desta fonte de carbono durante o crescimento celular levaria a aumento do valor de pH. Esse pequeno aumento de pH ocorrido nos experimentos se devem provavelmente à incorporação de  $\text{CO}_2$  no meio de cultivo pela agitação dos cultivos durante o período de crescimento celular e efeito tamponante do fosfato.

Após 10 dias de cultivo, foram atingidas concentrações celulares máximas que variaram entre 229 a 641  $\text{mg L}^{-1}$ . As duas cepas de *M. contortum* (CB3-b) e (P3Fb-Re-b) apresentaram resultados muito similares, o que seria esperado, por serem a mesma espécie, com as maiores produtividades (valores da ordem de 70  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Os menores crescimentos foram observados em cultivos com *Elakatothrix* (CB2-b) e *Chlorella* (CB2-C), com produtividades em células de 22,4 e 41,8  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , respectivamente. Isso indica que a salinidade presente no MVM inibiu o crescimento destes dois micro-organismos ao longo do cultivo. A única cepa de cianobactéria avaliada (*S. salina* J2-5A-i2) apresentou produtividade de 45,7  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , somente menor que as obtidas para *M. contortum*. Dessa forma, foram escolhidas as cepas da cianobactéria *Synechocystis salina* (J2-5A-i2), CCMA-UFSCar 692 e a microalga *Monoraphidium contortum* (P3Fb-Re-b), CCMA-UFSCar 701 para a avaliação do crescimento nos meios a partir de vinhaça tratada por processos físico-químicos e biológico.

### **5.3. Cultivo de micro-organismos fotossintetizantes em vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e processo acoplado biodigestão aeróbica-CAP (carvão ativado em pó)**

Conforme descrito anteriormente, após biodigestão aeróbica da vinhaça (diluída em água deionizada), o meio residual resultante foi utilizado para cultivos das cepas *Monoraphidium contortum* e *Synechocystis salina*. Foram escolhidos dois gêneros de micro-organismos fotossintetizantes, sendo uma microalga (*M. contortum*) e uma cianobactéria (*S. salina*), pois é conhecido que microalgas e cianobactérias, embora possam crescer, de um modo geral, nos mesmos ambientes na natureza, apresentam prevalências diferente nos distintos ambientes. Particularmente, *M. contortum*, promissora para a obtenção de lipídios com

aplicações de biocombustíveis, combinando crescimento favorável com acumulação eficaz de ácidos graxos, especialmente quando é cultivada em condições de carência de nitrogênio (BOGEN *et al.*, 2013). e *S. salina*, crescem bem em ambientes com alta salinidade e exigências de crescimento simples (CAI *et al.*, 2013).

Preliminarmente, foram feitos cultivos das microalgas em frascos de Erlenmeyer, com diferentes diluições da vinhaça que sofreu o tratamento biológico aeróbio. Deve ser lembrado aqui que no caso do cultivo aeróbio das bactérias na vinhaça que foi clarificada previamente com fosfato monobásico já ocorreu uma diluição de duas vezes desta, sendo caracterizada neste trabalho com vinhaça diluída 2 vezes. Ou seja, neste caso, a vinhaça proveniente do biorreator não sofreu nenhum tratamento adicional para ser utilizada para o crescimento dos micro-organismos fotossintetizantes. A partir desta vinhaça, também foram preparadas, por diluição, as vinhaças que foram denominadas vinhaça diluída 5 vezes e vinhaça diluída 10 vezes. Como não houve o uso de vinhaça não tratada neste trabalho em nenhuma circunstância, foi adotada esta nomenclatura para facilitar o desenvolvimento do texto. Adicionalmente, avaliou-se o uso de carvão ativado em pó (CAP) como etapa posterior à biodigestão aeróbica, com intuito de clarificação do meio.

A partir dos cultivos em frascos de Erlenmeyer desses micro-organismos fotossintetizantes nas vinhaças tratadas biologicamente e diluídas, foram obtidas as correspondentes melhores condições de cultivo, as quais foram avaliadas em fotobiorreatores tubulares.

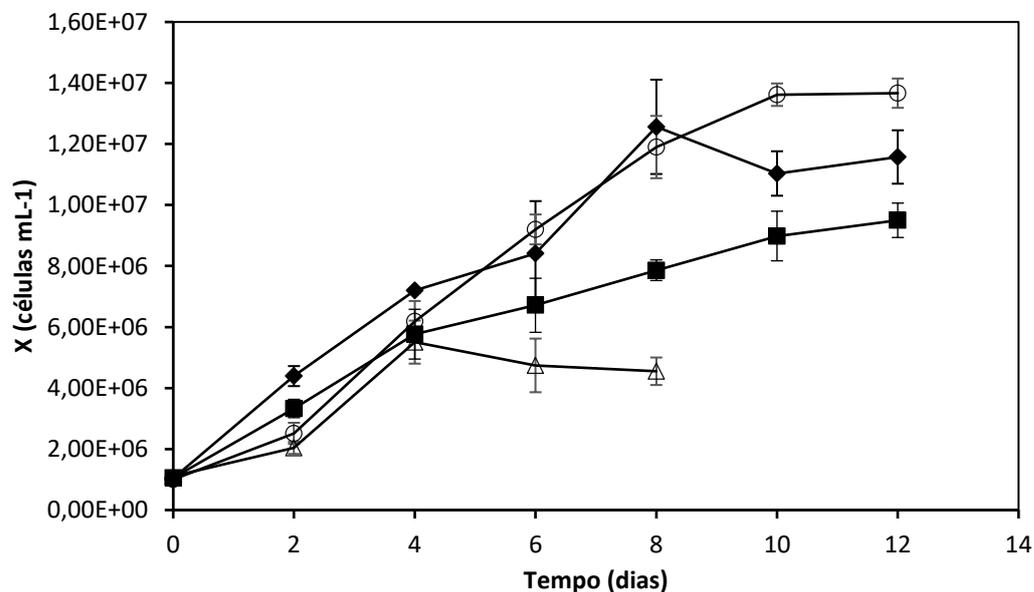
### **5.3.1 Cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes em frascos de Erlenmeyer**

#### **5.3.1.1. Cultivo de *M. contortum* em frascos de Erlenmeyer**

As curvas de crescimento de *M. contortum* mostram que as diferentes diluições finais, aplicadas à vinhaça tratada, influenciaram o crescimento da microalga e a concentração celular máxima, o que deve ser atribuído não só às diferenças nas concentrações de nutrientes, mas também à salinidade. De fato, o cultivo com diluição final de 5 vezes propiciou a obtenção de concentração celular máxima de  $1,36 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  em 10 dias, concentração muito próxima à do cultivo padrão, em meio Bold, que foi de  $1,26 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , obtida em 8 dias (Figura 18, Tabela 11). A redução nos valores de concentração celular máxima bem como nos valores

de produtividade em células (Tabela 11) podem ser atribuídas à maior salinidade (diluição 2 vezes) ou depleção de nutrientes, sobretudo de fonte de fósforo (diluição 10 vezes).

Na Tabela 11, pode-se verificar que a concentração de fosfato é muito menor que aquela encontrada no meio Bold, o que provavelmente levou à carência deste nutriente, sobretudo na diluição 10 vezes. Apesar da deficiência deste nutriente, o sucesso do cultivo com uso da vinhaça na diluição de 5 vezes pode ser atribuído ao metabolismo mixotrófico da microalga, havendo consumo da matéria orgânica presente no meio. Como é possível observar na Tabela 11, a demanda química de oxigênio (DQO) apresentou valores de 622,20 e 477,30 mg L<sup>-1</sup> no dia inicial e no último dia do cultivo, respectivamente.



**Figura 18.** Cultivo de *M. contortum* em frascos de Erlenmeyer com meio Bold (◆) e vinhaças tratadas por biodigestão aeróbica diluídas 2 vezes (△), diluídas 5 vezes (○) e diluídas 10 vezes (■). X: concentração celular.

O valores de DQO indicam a presença de compostos orgânicos, que podem favorecer o crescimento de microalgas apresentando-se como moléculas no qual o carbono já está na forma reduzida, poupando-se energia das células dos processos fotoautotróficos, relacionados à assimilação de carbono inorgânico (na forma de CO<sub>2</sub>) para produção das biomoléculas intracelulares (RADAKOVITS *et al.*, 2010). Bhatnagar *et al.* (2011), relataram sobre o benefício da adição de fonte de carbôno em águas residuárias para crescimento de *Chlorella minutissima*, sugerindo-se a adição de até 10.000 mg L<sup>-2</sup>.

**Tabela 11.** Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO<sub>i</sub>) e final (DQO<sub>f</sub>) obtidos nos cultivos de *M. contortum* em frascos de Erlenmeyer.

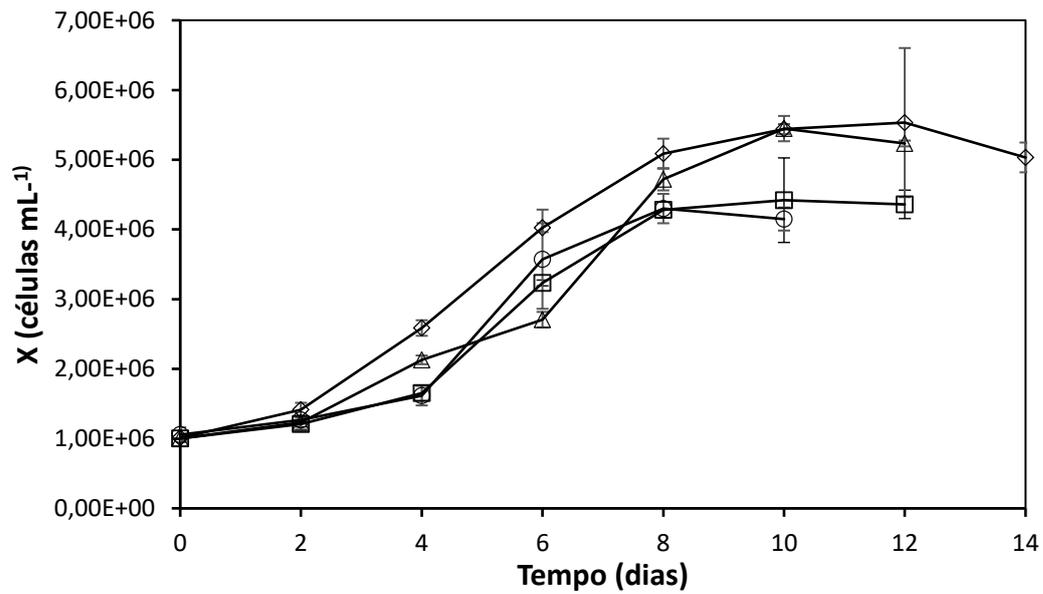
Meio	$X_m$ (cel.mL <sup>-1</sup> )	$P_x$ (cel.mL <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	$[NO_3]_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[NO_3]_f$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[PO_4]_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[PO_4]_f$ (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>i</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>f</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Bold	1,26x10 <sup>7</sup>	1,45 x10 <sup>6</sup>	90,56	6,07	80,90	41,30	***	***
Vinhaça dil. 2x	5,51x10 <sup>6</sup>	1,13 x10 <sup>6</sup>	112,00	87,74	1,66	1,10	1434,40	1393,20
Vinhaça dil. 5x	1,36 x10 <sup>7</sup>	1,26 x10 <sup>6</sup>	93,30	76,24	0,82	0,60	622,20	447,30
Vinhaça dil. 10x	8,98 x10 <sup>6</sup>	7,98 x10 <sup>5</sup>	43,78	35,48	0,21	0,10	346,10	265,50

\*\*\*: valores abaixo do nível detectável pela metodologia analítica empregada.

Considerando estes resultados, a diluição de 5 vezes foi empregada para cultivo da microalga em fotobiorreator, bem como para cultivo (em frascos de Erlenmeyer ou em fotobiorreator) empregando vinhaça tratada com carvão ativado em pó.

### 5.3.1.2. Cultivo de *S. salina* em frascos de Erlenmeyer

Os cultivos de *S. salina* em frascos de Erlenmeyer também foram possíveis em vinhaça tratada por biodigestão aeróbica. Neste caso, porém, a diluição de 2 vezes foi que apresentou o melhor resultado, equivalendo ao crescimento apresentado no cultivo padrão, empregando meio Bold (Figura 19, Tabela 12). Não só a concentração celular máxima ( $X_m$ ) como a produtividade em células ( $P_x$ ) foram similares entre estas duas condições experimentais, uma vez que o tempo para de cultivo foi o mesmo (10 dias). Sendo assim, o fator que provavelmente apresentou efeito inibitório sobre a microalga *Monoraphidium contortum*, seja salinidade, DQO ou algum composto inibitório (como a melanoidina, por exemplo), não apresentando o mesmo efeito sobre a cianobactéria *Synecocistis salina*.



**Figura 19.** Cultivo de *S. salina* em frascos de Erlenmeyer com meio Bold (◇) e vinhaças tratadas por biodigestão aeróbica diluídas 2 vezes (△), diluídas 5 vezes (○) e diluídas 10 vezes (□). X: concentração celular.

Novamente, apesar da baixa concentração de fosfato (Tabela 12), sobretudo na vinhaça com maior diluição, houve crescimento satisfatório da cianobactéria, em comparação com o meio padrão Bold, provavelmente devido à presença de matéria orgânica que favoreceu o metabolismo mixotrófico da cianobactéria. Como pode ser observado também na Tabela 12, no cultivo com vinhaça diluída 2 vezes, a DQO foi de 1434,40 e 1295,50 mg L<sup>-1</sup> no início e final do cultivo, respectivamente.

**Tabela 12.** Valores médios de concentração celular máxima (Xm), produtividade em células (Px), concentração de nitrato total inicial ([NO<sub>3</sub>]i) e final ([NO<sub>3</sub>]f), concentração de fosfato total inicial ([PO<sub>4</sub>]i) e final ([PO<sub>4</sub>]f), e demanda química de oxigênio inicial (DQOi) e final (DQOf) obtidos nos cultivos de *S. salina* em Frascos de Erlenmeyer.

Meio	Xm (cel.mL <sup>-1</sup> )	Px (cel.mL <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	[NO <sub>3</sub> ]i (mg L <sup>-1</sup> )	[NO <sub>3</sub> ]f (mg L <sup>-1</sup> )	[PO <sub>4</sub> ]i (mg L <sup>-1</sup> )	[PO <sub>4</sub> ]f (mg L <sup>-1</sup> )	DQOi (mg L <sup>-1</sup> )	DQOf (mg L <sup>-1</sup> )
Bold	5,44 x10 <sup>6</sup>	4,44 x10 <sup>5</sup>	90,56	3,07	80,90	41,64	***	***
Vinhaça dil. 2x	5,40 x10 <sup>6</sup>	4,40 x10 <sup>5</sup>	112,00	95,90	1,66	1,04	1434,40	1295,50
Vinhaça dil. 5x	4,15 x10 <sup>6</sup>	3,94 x10 <sup>5</sup>	93,30	87,39	0,82	0,54	622,20	627,30
Vinhaça dil. 10x	4,30 x10 <sup>6</sup>	4,13 x10 <sup>5</sup>	43,78	29,38	0,21	0,09	346,10	227,70

\*\*\*: valores abaixo do nível detectável pela metodologia analítica empregada.

Dessa forma, a diluição de 2 vezes foi empregada para cultivo da cianobacteria em fotobiorreator, bem como para cultivo (em frascos de Erlenmeyer ou em fotobiorreator) empregando vinhaça tratada carvão ativado em pó.

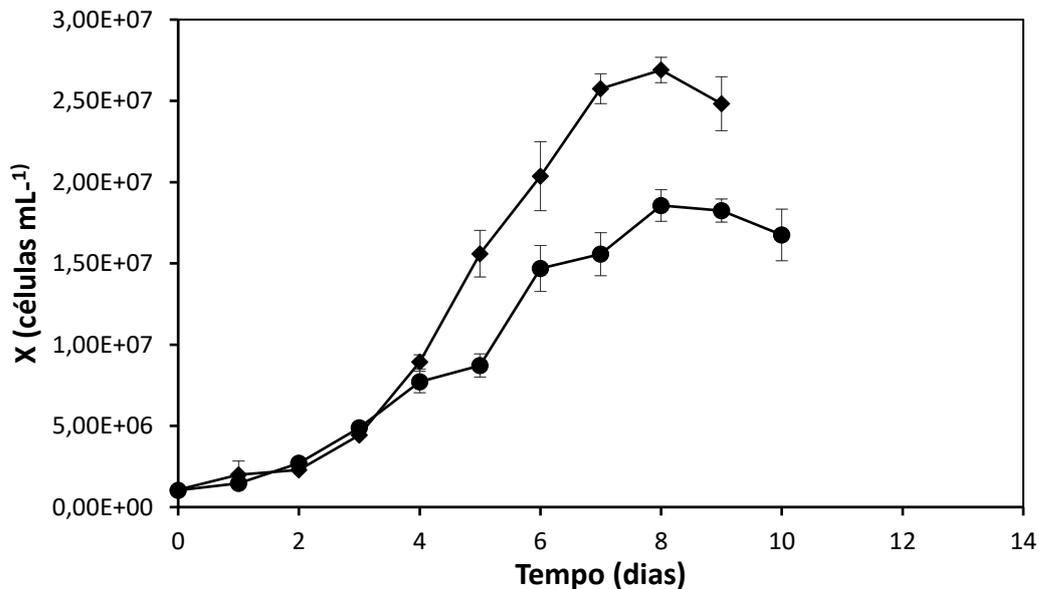
### 5.3.2. Cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes em fotobiorreator

#### 5.3.2.1. Cultivo de *M. contortum* em fotobiorreator

Neste trabalho empregou-se um fotobiorreator tubular, recentemente construído, em que um frasco degasseificador (na parte superior do reator) foi acoplado por meio de um eixo provido de uma turbina Rushton a um motor para agitação do meio. Para garantir a suspensão das células, sem que haja formação de biofilme nas paredes dos tubos, utilizaram-se esferas de nylon que promovem uma varredura, descolando eventuais células que se aderem ao vidro (Perez-Mora et al, 2016). Dessa forma, optou-se pela turbina tipo Rushton por esta promover um fluxo radial do fluído, fazendo com que as esferas de nylon do sistema sejam deslocadas para as laterais do frasco e garantindo sua descida para a tubulação do fotobiorreator.

Conforme anteriormente descrito, *M. contortum* foi cultivada em fotobiorreator empregando vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com diluição final de 5 vezes. E como previsto, o crescimento da microalga foi superior ao crescimento observado nos frascos de Erlenmeyer (Figura 19 e na Tabela 13). Isso se deve às melhores condições físico-químicas,

propícias para o crescimento fotoautotrófico da microalga no fotobiorreator, relacionadas à mistura, disponibilidade de luz, bem como à manutenção do pH em torno de valor ótimo (7 ~ 7,5). Aqui, ressalta-se que não há controle do pH em cultivo em frascos de Erlenmeyer, sendo que os valores chegaram a 9,2 e 9,8 ao final do cultivo.



**Figura 20.** Cultivo de *M. contortum* em fotobiorreator com meio Bold (◆) e vinhaça tratada por biodigestão aeróbica diluída 5 vezes (●). X: concentração celular.

No cultivo de *M. contortum* em fotobiorreator, porém, percebeu-se que o crescimento em vinhaça tratada foi inferior àquele apresentado em cultivo padrão, empregando meio Bold. Neste caso, pode-se assumir que apesar das melhores condições apresentadas pelo fotobiorreator para a realização do crescimento fotoautotrófico da microalga, bem como da presença de matéria orgânica (representada pelos valores de DQO), a carência da fonte de fósforo foi um fator preponderante para a limitação do crescimento, ainda que superior ao crescimento apresentado em frascos de Erlenmeyer para o mesmo meio empregado (Tabela 13 e 11)

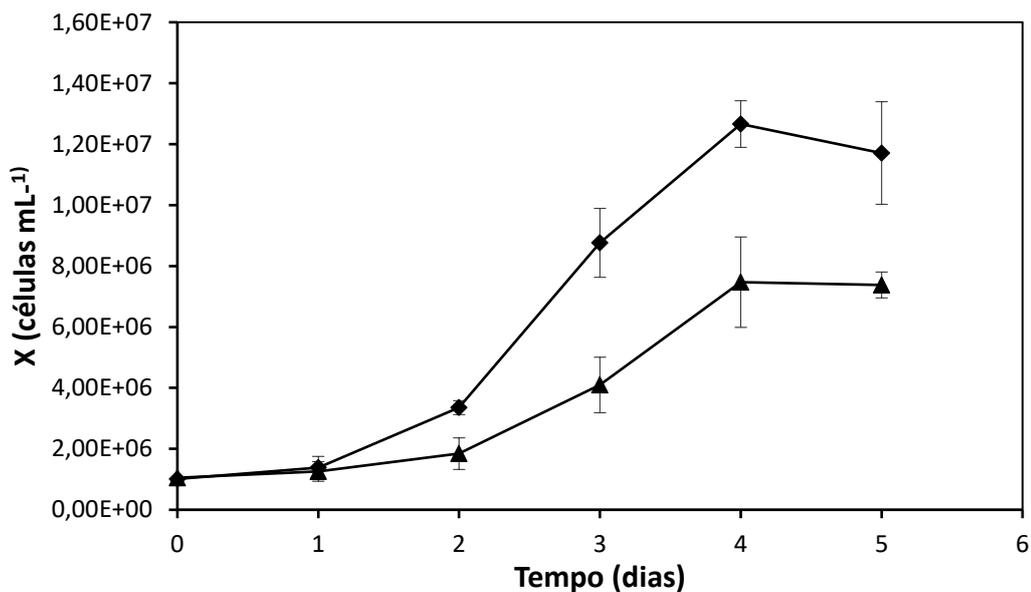
**Tabela 13.** Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO<sub>i</sub>) e final (DQO<sub>f</sub>) obtidos nos cultivos de *M. contortum* em fotobiorreatores.

Meio	$X_m$ (cel.mL <sup>-1</sup> )	$P_x$ (cel.mL <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	$[NO_3]_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[NO_3]_f$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[PO_4]_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[PO_4]_f$ (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>i</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>f</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Bold	2,69 x10 <sup>7</sup>	3,24 x10 <sup>6</sup>	90,56	2,50	80,90	34,9	***	21,10
Vinhaça dil. 5x	1,86x10 <sup>7</sup>	2,20 x10 <sup>6</sup>	84,6	24,60	0,84	0,3	611,9	590,4

\*\*\*: valores abaixo do nível detectável pela metodologia analítica empregada.

### 5.3.2.2. Cultivo de *S. salina* em fotobiorreator

Assim como observado no cultivo de *M. contortum*, a cianobactéria *S. salina* também apresentou, como esperado, um maior crescimento no fotobiorreator tubular, em relação aos cultivos em frascos de Erlenmeyer, ainda que tenha apresentado uma concentração celular máxima inferior àquela apresentada pela microalga *M. contortum*, seja no meio Bold, seja na vinhaça tratada. As concentrações celulares máximas foram de 1,27x10<sup>7</sup> e 7,47 x10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> para cultivo em meio Bold e Vinhaça tratada e diluída 2 vezes, respectivamente. Além disso, considerando que o cultivo teve uma menor duração (4 dias), a produtividade em células foi muito maior em relação aos cultivos em frascos de Erlenmeyer (8 a 10 dias), como se pode observar nas Tabelas 12 e 14.



**Figura 21.** Cultivo de *S. salina* em fotobiorreator com meio Bold (◆) e vinhaça tratada por biodigestão aeróbica diluída 2 vezes (▲). X: concentração celular.

Ressalta-se também que, assim como aconteceu com *M. contortum*, a concentração celular máxima de *S. salina* foi menor em vinhaça diluída, em comparação com o crescimento em meio Bold. Neste caso, como é possível observar na Tabela 14, embora a diluição tenha sido de 2 vezes, a concentração final do fosfato foi inferior ao nível de detecção da metodologia empregada, que é de 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 14.** Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO<sub>i</sub>) e final (DQO<sub>f</sub>) obtidos nos cultivos de *S. salina* em fotobiorreatores.

Meio	$X_m$ (cel.mL <sup>-1</sup> )	$P_x$ (cel.mL <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	$[NO_3]_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[NO_3]_f$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[PO_4]_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[PO_4]_f$ (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>i</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>f</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Bold	1,27x10 <sup>7</sup>	2,93 x10 <sup>6</sup>	90,56	***	80,90	38,90	***	26,20
Vinhaça dil. 2x	7,47 x10 <sup>6</sup>	1,62 x10 <sup>6</sup>	101,00	22,7	2,40	***	1452,40	847,70

\*\*\*: valores abaixo do nível detectável pela metodologia analítica empregada.

Os fotobiorreatores tubulares aqui empregados, como outros fotobiorreatores fechados, são promissores para produção de biomassa de microalgas pois favorecem a multiplicação celular devido à melhor distribuição de luz (aumento da relação área/volume), além de permitir uma mistura adequada do meio e possuir um eficiente sistema de adição de CO<sub>2</sub> para manutenção de pH e reposição de fonte inorgânica de carbono. Outra vantagem deste sistema está relacionada a menor perda de nutrientes voláteis (pela existência de condensadores), menor probabilidade de contaminação e menor perda de líquido por evaporação (Carvalho *et al.*, 2014).

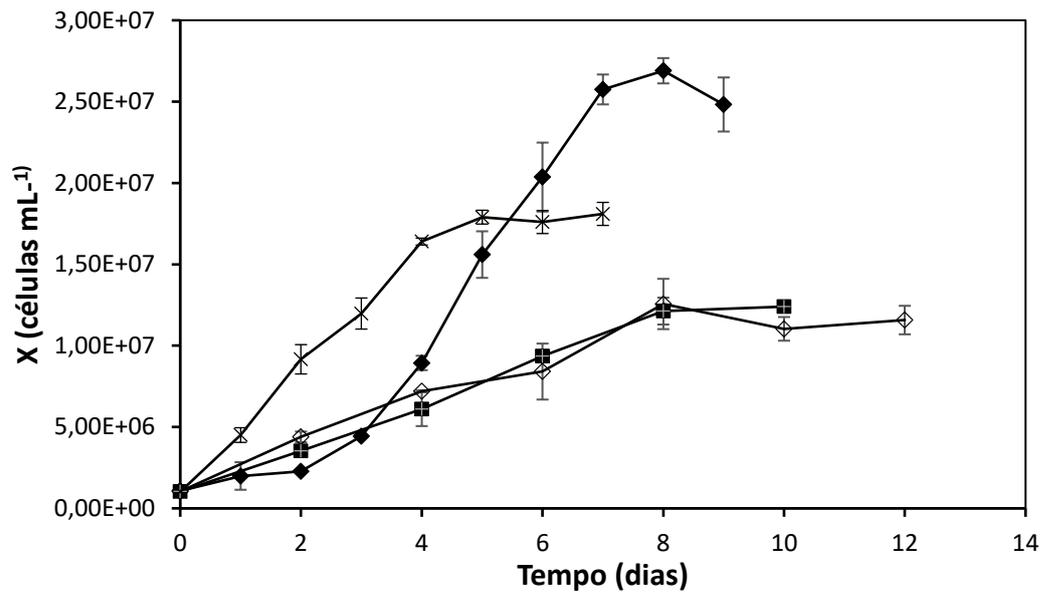
Ressalta-se também que, embora no presente estudo tenha-se utilizado CO<sub>2</sub> de cilindro como fonte de carbono inorgânico e para manutenção de valores ótimos de pH, o cultivo de microalgas em vinhaça biodigerida poderia ser acoplado, nas usinas, à própria fermentação alcoólica ou à queima de bagaço de cana de açúcar, empregando as altas quantidades de CO<sub>2</sub> liberados por estes processos (Carvalho *et al* 2009, PATENTE CO<sub>2</sub>). O aproveitamento destas fontes de CO<sub>2</sub> contribuiria não só para reduzir a emissão desse gás à atmosfera, intensificando o processo de efeito estufa, como também para reduzir o custo de tratamento terciário do efluente e produção da biomassa de microalga.

Neste estudo, o controle de pH, através da adição de gás carbônico (com auxílio de válvula solenoide e controlador de pH), contribuiu para o suprimento do carbono incorporado nas células.

#### **5.4. Cultivo de *M. contortum* empregando vinhaça tratada com biodigestão aeróbica e carvão ativado em pó (CAP).**

Como anteriormente descrito, o meio de cultivo, preparado com vinhaça tratada por biodigestão aeróbia, apresentou uma alta turbidez. Sendo assim, para uma clarificação do meio, permitindo maior disponibilidade de luz para os micro-organismos fotossintetizantes, bem como para reduzir possíveis compostos inibidores do crescimento, realizou-se uma etapa adicional de tratamento da vinhaça, empregando-se carvão ativado em pó (CAP).

Na Figura 22 e na Tabela 15 é possível observar que o tratamento adicional com carvão ativado em pó não propiciou aumento na concentração celular máxima. Dessa forma, em frascos de Erlenmeyer, a concentração celular máxima obtida com vinhaça tratada e diluída 5 vezes foi similar àquela obtida empregando-se meio Bold.



**Figura 22.** Cultivo de *M. contortum* empregando meio Bold em frascos de Erlenmeyer (◇) e em fotobiorreatores (◆), e vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com carvão ativado em pó (20 g L<sup>-1</sup>), diluída 5 vezes, em frascos de Erlenmeyer (+) e em fotobiorreatores (×). X: concentração celular.

No fotobiorreator tubular, por sua vez, a concentração celular máxima foi menor que em meio empregando vinhaça, em relação ao meio Bold. No entanto, percebe-se que o tratamento com CAP, e consequente maior disponibilidade de luz, associado à presença de matéria orgânica (vide valores de DQO na Tabela 15) propiciou uma maior velocidade de crescimento da microalga *M. contortum*, o que se assume pela maior inclinação na curva de crescimento (Figura 22). Isso fez com que a concentração celular máxima fosse atingida em um menor tempo (5 dias) em relação ao cultivo empregando vinhaça sem tratamento com CAP (8 dias, Figura 20). Isso resultou em uma maior produtividade em células quando se empregou vinhaça tratada com CAP ( $P_x = 3,38 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, Tabela 15) em comparação ao cultivo com vinhaça sem tratamento com CAP ( $P_x = 2,20 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, Tabela 13).

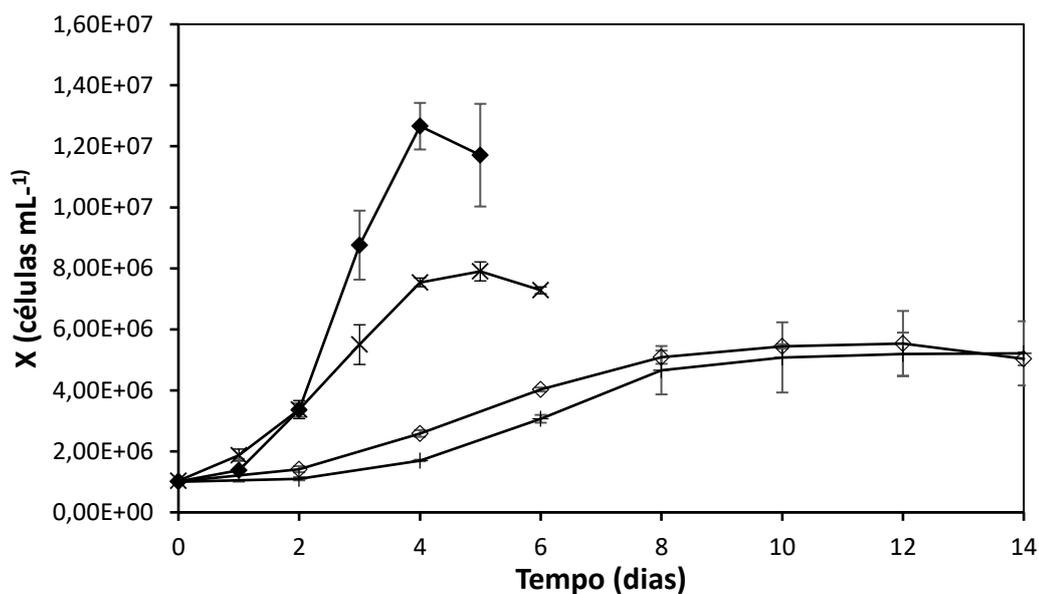
**Tabela 15.** Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[NO_3]_i$ ) e final ( $[NO_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[PO_4]_i$ ) e final ( $[PO_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial (DQO<sub>i</sub>) e final (DQO<sub>f</sub>) obtidos nos cultivos de *M. contortum* empregando vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com carvão ativado em pó (20 g L<sup>-1</sup>), diluída 5 vezes.

	$X_m$ (cel.mL <sup>-1</sup> )	$P_x$ (cel.mL <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	$[NO_3]_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[NO_3]_f$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[PO_4]_i$ (mg L <sup>-1</sup> )	$[PO_4]_f$ (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>i</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>f</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Frasco de Erlenmeyer	1,21x10 <sup>6</sup>	2,63 x10 <sup>4</sup>	33,48	***	0,70	***	310,90	220,90
Fotobiorreator tubular	1,79x10 <sup>7</sup>	3,38 x10 <sup>6</sup>	31,08	***	0,80	***	365,8	306,60

\*\*\*: valores abaixo do nível detectável pela metodologia analítica empregada.

### 5.5. Cultivo de *S. salina* empregando vinhaça tratada com biodigestão aeróbica e carvão ativado em pó (CAP).

No cultivo de *S. salina*, o emprego de CAP como tratamento adicional para clarificação da vinhaça, após biodigestão aeróbica, não exerceu nenhuma influência no crescimento da cianobactéria. Percebe-se, pela Figura 23 e pela Tabela 16, que a concentração celular máxima em frascos de Erlenmeyer foi similar ao crescimento em meio Bold e, adicionalmente, a concentração celular máxima observada em fotobiorreator tubular é similar ao crescimento em vinhaça com a mesma diluição sem tratamento com CAP (Figura 21 e Tabela 14)



**Figura 23.** Cultivo de *S. salina* empregando meio Bold em frascos de Erlenmeyer ( $\diamond$ ) e em fotobiorreatores ( $\blacklozenge$ ), e vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com carvão ativado em pó ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), diluída 2 vezes, em frascos de Erlenmeyer ( $+$ ) e em fotobiorreatores ( $\times$ ). X: concentração celular.

Tabela 16. Valores médios de concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ), concentração de nitrato total inicial ( $[\text{NO}_3]_i$ ) e final ( $[\text{NO}_3]_f$ ), concentração de fosfato total inicial ( $[\text{PO}_4]_i$ ) e final ( $[\text{PO}_4]_f$ ), e demanda química de oxigênio inicial ( $\text{DQO}_i$ ) e final ( $\text{DQO}_f$ ) obtidos nos cultivos de *S. salina* empregando vinhaça tratada por biodigestão aeróbica e com carvão ativado em pó ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), diluída 2 vezes.

	$X_m$ ( $\text{cel.mL}^{-1}$ )	$P_x$ ( $\text{cel.mL}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	$[\text{NO}_3]_i$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$[\text{NO}_3]_f$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$[\text{PO}_4]_i$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$[\text{PO}_4]_f$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\text{DQO}_i$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\text{DQO}_f$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Frasco de Erlenmeyer	$5,08 \times 10^6$	$4,08 \times 10^5$	62,89	53,48	1,12	0,05	922,50	691,00
Fotobiorreator tubular	$7,54 \times 10^6$	$1,06 \times 10^6$	49,08	14,97	1,50	0,2	1048,5	1133,40

Como comentado anteriormente, o uso de CAP em etapa adicional para clarificação da vinhaça resultou na redução das concentrações de nutrientes (nitrato e fosfato) bem como da

DQO. Na Tabela 16, verifica-se que a carência da fonte de fósforo foi um fator preponderante para cessar o crescimento celular da cianobactéria *S. salina*. Na Tabela 15, porém, observa-se que, no cultivo da microalga *M. contortum*, não só a fonte de fósforo, mas também a fonte de nitrogênio, ao final do cultivo, está abaixo do limite de detecção dos métodos aqui empregados. Isso sugere que, futuros trabalhos, com suplementação destas fontes de nutriente, propiciaria um sucesso ainda maior na obtenção de biomassa destes micro-organismos. Ressalta-se porém sobre a importância de se efetuar uma suplementação sem que haja concentrações residuais consideráveis ao final do cultivo, uma vez que este cultivo visa também o tratamento terciário do efluente, de forma a se evitar a ocorrência de eutrofização, no caso de liberação dessas águas residuárias em corpos hídricos como rios e lagos.

#### **5.6. Composição proximal das biomassas de *S. salina* e *M. contortum* obtidas em cultivos em fotobiorreator tubular empregando vinhaça tratada por processo aeróbio e tratamento acoplado processo aeróbica e carvão ativado em pó.**

Os resultados obtidos da composição proximal da biomassa seca de *S. salinam* e *M. contortum* após os cultivos em fotobiorretor tubular empregando a vinhaça procedente do processo aeróbio com e sem diluir e a vinhaça procedente do processo de clarificação com 20 g L<sup>-1</sup>carvão ativado em pó (CAP) com e sem diluição, para cada micro-organismos de acordo ao desenho experimental apresentado na Tabela 17, junto aos valores médios de conteúdos de lipídios, proteínas, cinzas e carboidratos.

**Tabela 17.** Valores médios de conteúdos de lipídios, proteínas, cinzas e carboidratos obtidos nos cultivos de *S. salina* e *M. contortum* em fotobiorreator tubular empregando vinhaça tratada por biodigestão aeróbica diluído 2 vezes (V. dil 2x) e diluído 5 vezes (V. dil 5x), e tratamento acoplado biodigestão aeróbica e carvão ativado em pó (20 g L<sup>-1</sup>), diluída 2 vezes (CAP + V. dil 2x) e diluído 5 vezes (CAP + V. dil 5x) na devida ordem.

Micro-organismo	Desenho experimental	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Carboidratos (%)
<i>S. salina</i>	Meio Bold	8,5 ± 0,80	25,5 ± 0,77	9,9 ± 0,03	55,9
	V. dil 2x	11,0 ± 2,71	23,2 ± 0,58	8,1 ± 0,02	57,6
	CAP + V. dil 2x	11,3 ± 0,33	23,2 ± 0,75	8,9 ± 0,05	56,4
<i>M. contortum</i>	Meio Bold	40,6 ± 0,52	14,3 ± 0,34	9,6 ± 0,01	35,3
	V. dil 5x	35,7 ± 0,73	15,1 ± 0,48	8,4 ± 0,01	40,7
	CAP + V. dil 5x	33,4 ± 0,59	19,3 ± 1,22	8,6 ± 0,05	38,6

Microalgas e cianobactérias diferem na composição dos ácidos graxos, os lipídios das microalgas são ricos em ácidos graxos polienóicos (poli-insaturados), além disso, as cianobactérias, geralmente carecem de esteróis. Não só na composição dos ácidos graxos diferem as microalgas das cianobactérias, mas também na proporção do conteúdo lipídico. As quantidades desses lipídios microalgais variam de acordo com a espécie, condições de crescimento e fatores ambientais. Foi relatado que o conteúdo lipídico em microalgas variou de 20 a 50% do peso seco, incluindo os gêneros *Chlorella*, *Neochloris*, *Dunaliella* e *Nannochloris* e o conteúdo lipídico para cianobactérias não supera o 20 % do peso seco em algumas espécies como *Spirulina* (MATA *et al.*, 2010).

O teor de lipídios para cultivos de *S. salina* e *M. contortum* apresentados na Tabela 17, estão dentro dos valores normais reportados para estas classes de micro-organismos, com valores médios de 8,5 a 11,3 % para *S. salina* e 33,4 a 40,5 % *M. contortum* independente da condição do cultivo, sendo maior para os cultivos da microalga *M. contortum*. No entanto, foi observado que o conteúdo de lipídios para *S. salina* dos cultivos usando vinhaça tratada diluída 2 vezes, independente do uso do CAP foi relativamente superior ao meio padrão (meio Bold).

Quanto ao conteúdo de proteínas obtido (Tabela 17), foi maior para os cultivos de *S. salina* em vinhaça tratada diluída 2 vezes com ou sem o uso do CAP em comparação aos cultivos de *M. contortum*, mas não foi superior o dos cultivos de *S. salina* realizados no meio padrão, chegando a valores de 25,5 %. Referente aos resultados dos cultivos de *M. contortum*

com vinhaça trada diluída 5 vezes, foram bem maiores nos cultivos com vinhaça acoplada ao CAP, chegando a valores de 19,3 %. Comparando as duas espécies observou-se que o conteúdo de proteínas é maior em cianobactérias, como reportado em estudos com *Arthrospira platensis* cultivada em meio de reuso previamente tratado com CAP (30 mg L<sup>-1</sup>) e cloreto férrico (6 mg L<sup>-1</sup>) obtiveram 54 % de teores de proteínas (MEJIA-DA-SILVA *et al.*, 2018).

Considerando os valores de cinzas da biomassa de *S. salina* e *M. contortum* para os cultivos em vinhaça diluída 2 e 5 vezes com e sem o uso de 20 mg L<sup>-1</sup> CAP (Tabela 17), apresentaram valores na faixa 8,1 – 9,9 %. Pode-se concluir que o conteúdo de cinzas não foi dependente das condições do cultivo e da classe de micro-organismo cultivado.

Quanto aos valores de carboidratos nas diferentes condições experimentais é evidente que os valores são relativamente altos em cada condição (Tabela 17) numa faixa de 35,3 – 57,6 %. Estando um pouco acima do reportado para as microalgas e cianobactérias que apresentam em média valores de 23 e 30% de carboidrato em peso seco, respectivamente (FINKEL *et al.*, 2016).

## 6. CONCLUSÕES

A avaliação de diferentes tratamentos físico-químicos e tratamento biológico de vinhaça de cana-de-açúcar permitiu o cultivo da microalga *Monoraphidium contortum* e da cianobactéria *Synechocystis salina*, evidenciando que este resíduo da indústria sucro-alcooleira, desde que adequadamente tratado, pode ser matéria prima para o meio de cultivo de micro-organismos fotossintetizantes.

A clarificação com uso de fosfato monobásico de potássio a  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  permitiu a remoção de partículas suspensas da vinhaça *in natura*, com redução de aproximadamente 20 % de demanda química de oxigênio (DQO) do sobrenadante da vinhaça que sofreu o processo de clarificação em relação à vinhaça *in natura*.

O processo de cultivo semi-contínuo aeróbio com bactérias (tratamento biológico) levou a uma diminuição de DQO da vinhaça clarificada diluída 2 vezes, com valores finais de DQO que chegaram a valores inferiores a  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ . O processo de cultivo se manteve estável por até 5 ciclos, com diminuições também dos níveis de outros nutrientes, como nitrogênio e fósforo.

O tratamento da vinhaça proveniente do cultivo semi-contínuo aeróbio com carvão ativado em pó (CAP) levou a remoção de pigmentos de até 83,5 %, com concentração de CAP de  $30,0 \text{ g L}^{-1}$ , embora a melhor condição de tratamento tenha sido a de  $20 \text{ g L}^{-1}$ , com remoção de 79,4% de pigmentos, por ser a maior concentração de CAP na qual ainda foi linear o decaimento de absorbância da vinhaça que sofreu o tratamento físico-químico.

Em ensaios em frascos de Erlenmeyer, os micro-organismos fotossintetizantes *Monoraphidium contortum* e *Synechocystis salina* cresceram no meio proveniente do tratamento biológico, nas três diluições empregadas em relação à vinhaça clarificada: 2 vezes, 5 vezes e 10 vezes. No entanto, a cepa de *M. contortum* cresceu mais na diluição de 5 vezes, com concentração celular máxima ( $X_m$ ) de  $1,36 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , enquanto que a cepa de *S. salina* cresceu mais na diluição de 2 vezes, com  $X_m$  igual a  $5,45 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Em ambos os casos de maior crescimento dos micro-organismos fotossintetizantes, o crescimento foi maior que em meio padrão Bold.

Em cultivos em fotobiorreator tubular, o crescimento de ambos os micro-organismos fotossintetizantes nos meios de cultivo provenientes do tratamento biológico nas correspondentes condições ideais de diluição foram superiores aos cultivos em frascos de

Erlenmeyer, porém menores que os cultivos realizados em meio padrão Bold. Os valores de  $X_m$  em meio Bold foram de  $2,69 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  e  $1,27 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para *M. contortum* e *S. salina*, respectivamente.

O tratamento com carvão ativado (CAP) dos meios provenientes do tratamento biológico permitiu o crescimento de *M. contortum* em fotobiorreator tubular nos instantes iniciais com velocidade de crescimento superiores ao meio padrão Bold, sem qualquer fase de adaptação. No entanto, o cultivo com o meio tratado parou de crescer antes, sugerindo uma limitação de nutriente. Os valores de concentração celular máxima foram muito próximos dos cultivos onde não houve o tratamento com CAP, sendo de  $1,79 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

O crescimento de *S. salina* em fotobiorreator tubular em meio tratado com CAP não diferiu daquele onde não foi empregado este tratamento, com valor de  $X_m$  igual a  $7,90 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Para *M. contortum*, os teores de proteínas e lipídios nos cultivos em fotobiorreatores tubulares em meios que tiveram vinhaças tratadas como meios de cultivo foram de 15,1-19,3% e 33,4-35,7%, respectivamente.

Para *S. salina*, os teores de proteínas e lipídios nos cultivos em fotobiorreatores tubulares em meios que tiveram vinhaças tratadas como meios de cultivo foram de 23,2% e 11,0-11,3%, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource technology**, v. 118, p. 61-66, 2012.
- ALBANEZ, R. Codigestão de vinhaça e melaço em biorreator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada visando a produção de hidrogênio. **Tese de Doutorado**. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.
- ALGAE BASE. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. acesso em: 22 Sep. 2019.
- ALTENHOFEN DA SILVA, M.; BARBOSA, G. H.; BRITO CODATO, C.; ARJONILLA DE MATTOS, L. F.; GASPAR BASTOS, R.; KIECKBUSCH, T. G. Heterotrophic growth of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* in ethanol distillation wastewater (vinasse) and lipid extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n 3, p. 573-579, 2017.
- ALVARENGA, R. P.; QUEIROZ, T. R. 2009. Produção mais limpa e aspectos ambientais na indústria sucroalcooleira. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**. Disponível em: <<http://www.advancesincleanerproduction.net>>. Acesso em: 28 Jan. 2015.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 130-134, 2007.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 14 ed. Arlington: AOAC, 1984. 1141 p.
- APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 18th ed. Washington, D. C., 1998.
- ASLAN, S; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, n. 1, p. 64-70, 2006.
- BARBOSA, M. J. G. V. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation. Tese de Doutorado em Ciências. Wageningen University, 2003.
- BARCELOS, E.M. Avaliação do perifíton como sensor da oligotrofização experimental em reservatório eutrófico (Lago das Garças, São Paulo). **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.
- BARROCAL, V. M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New biotechnology**, v. 27, n 6, p. 851-856, 2010.
- BATSTONE, D. J.; JENSEN, P. D. Anaerobic Processes. The University of Queensland, Brisbane, QLD, **Elsevier B.V.**, Australia, 2011.
- BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press**, 1994.
- BENKE, M. B.; MERMUT, A. R.; CHATSON, B. Carbon-13 CP/MAS NMR and DR-FTIR spectroscopic studies of sugarcane distillery waste. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 78, n. 1, p. 227-236, 1998.

- BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K. C. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3425-3431, 2011.
- BICH, N. N.; YAZIZ, M. I.; BAKTI, N. A. K. Combination of *Chlorella vulgaris* and *Eichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. **Water Research**, v. 33, n. 10, p. 2357-2362, 1999.
- BOGEN, C.; KLASSEN, V.; WICHMANN, J.; LA RUSSA, M.; DOEBBE, A.; GRUNDMANN, M.; ...; MUSSGNUG, J. H. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. **Bioresource Technology**, n. 133, p. 622-626, 2013.
- BRANCO, S. M. Biologia do Tratamento de Esgotos. **Revista DAE**, v. 25, n. 55, p. 99-115, 1964.
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 2017.
- BRESAOLA, M.D.; MOROCHO-JÁCOME, A.L.; MATSUDO, M.C.; CARVALHO, J.C.M. Semi-continuous process as a promising technique in *Ankistrodesmus braunii* cultivation in photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 2197-2205, 2019.
- CAI, T., GE, X.; PARK, S. Y.; LI, Y. Comparison of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Nannochloropsis salina* for lipid production using artificial seawater and nutrients from anaerobic digestion effluent. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 255-260, 2013.
- CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. ; LIMA, M. I. S. . Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça filtrada. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, v. 35, p. 55-62, 2015.
- CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal Res**, v. 30 p.79–85, 2018.
- CARDOZO, R.B.; ARAÚJO, F.F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p.1283–1288, 2011.
- CHAN, Y. J.; CHONG, M. F.; LAW, C. L.; HASSELL, D. G. A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- CHEN, F.; JOHNS, M. R. Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. **Process biochemistry**, v. 29, n. 4, p. 245-252, 1994.
- CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 3, p. 221-224, 1997.
- CHERNICHARO, C. A. L. Post-treatment options for the anaerobic treatment of domestic wastewater. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v, 5, n. 1, p. 73-92, 2006.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae, **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.

- CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina sp.* growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 461-465, 2004.
- 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, p. 2752-61, 2013.
- COCA, M.; BARROCAL, V. M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2015.
- COELHO, S. T.; LORA, B. A.; GUARDABASSI, P. M. Aspectos ambientais da cadeia do etanol de cana-de-açúcar no estado de São Paulo. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para a produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010.
- CORAZZA, R. I. Reflexões sobre o papel das políticas ambientais e de ciência e tecnologia na modelagem de opções produtivas ‘mais limpas’ numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre o problema da disposição da vinhaça. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- CORTEZ, L. A. B.; SILVA, A.; LUCAS JUNIOR, J. D.; JORDAN, R.; CASTRO, L. D. Biodigestão de efluentes. Biomassa para energia. Campinas: **Editora da UNICAMP**, cap. 15, p. 493-529, 2007.
- CRINI, G.; LICHTFOUSE, E. Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, p. 145-155, 2019.
- CRUZ, J. I. D.; PORTUGAL, R. D. S.; LUCENDO, M.; ELIS, V. R.; FACHIN, S. J. D. S.; USTRA, A. T.; 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.
- CUNHA, L. C. S.; LIMA, A. V. A.; BARBOSA, M. A. S.; DE MORAIS, S. A. L.; DE AQUINO, F. J. T.; CHANG, R.; DO NASCIMENTO, E. A. Volatile Compounds Obtained by the Hydrodistillation of Sugarcane Vinasse, a Residue from Ethanol Production. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, 2017.
- DA 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 e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.
- DECLoux, M.; BORIES, A. Stillage treatment in the French alcohol fermentation industry. **International Sugar Journal**, v. 104, p. 509-518, 2002.
- DEMATTE, J. A. M.; GAMA, M. A. P.; COOPER, M.; ARAÚJO, J. C.; NANNI, M. R.; FIORIO, P. R. Effect of fermentation residue on the spectral reflectance properties of soils. **Geoderma**, v. 120, n. 3, p. 187-200, 2004.
- DI BERNARDO, L. **Métodos e Técnicas de Tratamento de Água**, 1a ed., ABES: Rio de Janeiro, 1993.
- DIAS, M.O.S.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P.E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C.E.V.; BONOMI, A.; LEAL, M.R.L.V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, 2015.

- DOELSCH, E.; MASON, A.; CAZEVIEILLE, P.; CONDOM, N. Spectroscopic characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. **Waste Management**, v. 29, n. 6, p. 1929-1935, 2009.
- DOS SANTOS, R. R.; ARAÚJO, O. D. Q. F.; DE MEDEIROS, J. L.; CHALOUB, R. M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38-48, 2016.
- EATON A. D.; CLESCERI L.S.; GREENBERG A. E. Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association**, Washington DC 1995.
- ENGIN, I. K.; CEKMECELIOGLU, D.; YÜCEL, A. M.; OKTEM H. A. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium sp.* ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. **Bioresour Technol**, v. 251 p. 128–134, 2018.
- ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v. 30 n. 9, p. 1525-1536, 2008.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235-1250, 2011.
- FALCONER, I. R. Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes, and rivers. **Toxicity Assessment**, v. 4, n. 2, p. 175-184, 1989.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 198, 2010.
- FERRAGUT, C. Respostas das algas perifíticas e planctônicas à manipulação de nutrientes (N e P) em reservatório urbano (Lago do IAG, São Paulo). **Tese de doutorado**, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.
- FIGARO, S.; AVRIL, J. P.; BROUERS, F.; OUENSANGA, A.; GASPARD, S. Adsorption studies of molasse's wastewaters on activated carbon: Modelling with a new fractal kinetic equation and evaluation of kinetic models. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2-3, p. 649-656, 2009.
- FINKEL, Z. V.; FOLLOWS, M. J.; LIEFER, J. D.; BROWN, C. M.; BENNER, I.; IRWIN, A. J. Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155977, 2016.
- GONZALEZ, B.G.; PENA, M. M.; GARCIA, M. T.; URUENA, M. A. Decolorization of molasses effluents by coagulation-flocculation process. **Zuckerindustrie**. v. 124, n. 5, p. 406-410, 1999.
- GOUDAR, M. S. Potassium dynamics in spent wash irrigated vertisol. **Tese de Doutorado**. University of Agricultural Sciences, Dharwad, 2006.
- GRANATO, E.F. **Geração de energia através da biodigestão anaeróbica de vinhaça**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista. Bauru, 2003.
- GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2015. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acesso em: 24 julho 2017.

- HEIJNEN, J. J.; MULDER, A.; WELTEVREDE, R.; HOLS, J.; VAN LEEUWEN, H. L. J. M. Large scale anaerobic-aerobic treatment of complex industrial waste water using biofilm reactors. **Water Science and Technology**, v. 23, n. 7-9, p. 1427-1436, 1991.
- JI, M. K.; ABOU-SHANAB, R. A.; KIM, S. H.; SALAMA, E. S.; LEE, S. H., KABRA, A. N.; JEON, B. H. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 142-148, 2013.
- KADIOĞLU, A.; ALGUR, Ö. F. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution. **Bioresource technology**, v. 42, n. 1, p. 1-5, 1992.
- KANG, Z.; KIM, B. H.; RAMANAN, R.; CHOI, J. E.; YANG, J. W.; OH, H. M.; KIM, H. S. A cost analysis of microalgal biomass and biodiesel production in open raceways treating municipal wastewater and under optimum light wavelength. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 25, n. 1, p. 109-118, 2015.
- KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: K. Grasshoff, M. Ehrhardt. and F. Kremling (Editors), Methods of Seawater Analysis. **Verlag Chemie, Weinheim**, 2da ed., p. 150-157, 1983.
- KWON, J. H.; RÖGNER, M.; REXROTH, S. Direct approach for bioprocess optimization in a continuous flat-bed photobioreactor system. **Journal of Biotechnology**, v. 162 n. 1, p. 156-162, 2012.
- LAIME, E. M. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, 2011.
- LIMA, H. H. de S. Tratamento físico-químico da vinhaça por coagulação e adsorção em carvão ativado do bagaço da cana de açúcar. 2013. 84 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Urbana e Ambiental) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- LIMA, R.B. **Processo de clarificação do caldo de cana-de-açúcar aplicando elétrons acelerados**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares. São Paulo, 2012.
- LÓIO, D.A. **Tratamento físico-químico de vinhaça por coagulação, floculação e sedimentação e seu aproveitamento no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris***. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. 2013.
- MARIANO, A. P.; CRIVELARO, S. H. R.; ANGELIS, D. D. F. D.; BONOTTO, D. M. The use of vinasse as an amendment to ex-situ bioremediation of soil and groundwater contaminated with diesel oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1043-1055, 2009.
- MARQUES, M. O. Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. **Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: Livro Ceres**, p. 369-375, 2006.
- MARQUES, S. S. I.; NASCIMENTO, I. A.; DE ALMEIDA, P. F.; CHINALIA, F. A. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 8, 1933-1943, 2013.

- MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 5, p. 408-410, 1993.
- MARSCHNER, H. Marschner's mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, 2011.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.
- MATSUWAKI, I.; HARAYAMA, S.; KATO, M. Assessment of the biological invasion risks associated with a massive outdoor cultivation of the green alga, *Pseudochorocystis ellipsoidea*. **Algal Research**, v. 9, p. 1-7, 2015.
- MAYO, A.W. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. **Water Environment Research**, v. 69, p. 64-72, 1997.
- MEJIA-DA-SILVA, L. D. C.; MATSUDO, M. C.; MOROCHO-JACOME, A. L.; DE CARVALHO, J. C. M. Application of Physicochemical Treatment Allows Reutilization of *Arthrospira platensis* Exhausted Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 1, p. 40-53, 2018.
- MIGO, V. P.; MATSUMURA, M.; DEL ROSARIO, E. J.; KATAOKA, H. Decolorization of molasses wastewater using an inorganic flocculant. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 6, p. 438-442, 1993.
- MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. **J Hazard Mater**, v. 163, p. 12-25, 2009.
- MOHEIMANI, N. R. The culture of coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation. **Tese de Doutorado**. Murdoch University, 2005.
- 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.
- NIAOUNAKIS, M.; HALVADAKIS, C. P. Characterization of olive processing waste. **Waste Management Series**, p. 23-64, 2006.
- 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.
- OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; HERNÁNDEZ, E. ANGULO, O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. growth on pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.
- OLIVEIRA, B. G.; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200, p. 77-84, 2013.
- ONODERA, T.; SASE, S.; CHOEISAI, P.; YOOCHATCHAVAL, W.; SUMINO, H.; YAMAGUCHI, T.; ...; SYUTSUBO, K. Development of a treatment system for molasses wastewater: the effects of cation inhibition on the anaerobic degradation process. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 295-302, 2013.

- ORLANDO FILHO, J.; ZAMBELLO JR, E.; AGUJARU, R. Efeito da aplicação prolongada da vinhaça nas propriedades químicas dos solos com cana-de-açúcar: estudo exploratório. **Stab, Piracicaba**, v. 1, p. 28-33, 1983.
- ORTEGÓN, G. P.; ARBOLEDA, F. M.; CANDELA, L.; TAMOH, K.; VALDES-ABELLAN, J. Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 410-419, 2016.
- PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CAZEVIEILLE, P.; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1553-1562, 2008.
- PATIDAR, S. K.; MITRA, M.; GEORGE, B.; SOUNDARYA, R.; MISHRA, S. Potential of *Monoraphidium minutum* for carbon sequestration and lipid production in response to varying growth mode. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 32-40, 2014.
- PELIZER, L. H.; SASSANO, C. E.; CARVALHO, J. C.M.; SATO, S.; GIOIELLI, L. A.; MORAIS, I.O. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, v.32, n.1, p.37-40, 1999.
- PENG, L.; ZHANG, Z.; CHENG, P.; WANG, Z.; LAN, C. Q. Cultivation of *Neochloris oleoabundans* in bubble column photobioreactor with or without localized deoxygenation. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 255-263, 2016.
- PÉREZ-MORA, L. S.; MATSUDO, M. C.; CEZARE-GOMES, E. A.; CARVALHO, J. An investigation into producing *Botryococcus braunii* in a tubular photobioreactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 12, p. 3053-3060, 2016.
- PÉREZ-MORA, L.S. Uso de micro-organismos fotossintetizantes para remoção de nutrientes residuais de águas provenientes de tratamento aeróbio de esgoto. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2019.
- PIORRECK, M.; HINNERK, K.; POHL, B.; POHL, P. Biomass production, total protein chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207 - 216, 1984.
- PRASAD, R. K.; SRIVASTAVA, S. N. Electrochemical degradation of distillery spent wash using catalytic anode: Factorial design of experiments. **Chemical Engineering Journal**, v. 146, n. 1, p. 22-29, 2009.
- QUINN, J. C.; DAVIS, R. The potentials and challenges of algae based biofuels: a review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 444-452, 2015.
- RADAKOVITS, R.; JINKERSON, R. E.; DARZINS, A.; POSEWITZ, M. C. RANDOR *et al.* Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 4, p. 486-501, 2010.
- 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.
- REYNOLDS, C.S.; HUSZAR, V., KRUK, C.; NASELLI-FLORES, L.; MELO, S. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of Plankton Research**. v. 24, p. 417-428, 2002.

- RICHMOND A. Biological principles of mass cultivation of photoautotrophic microalgae. In: Richmond A, Hu Q, editors. Handbook microalgal culture: **Biotechnol and Applied Phycology**. Oxford: Wiley Blackwell. p. 171–204, 2013.
- ROSSETTO, R.; DIAS, F. L. F.; VITTI, A. C. Fertilidade do solo, nutrição e adubação. Campinas, **Instituto Agronômico**, p. 221-238, 2008.
- SALOMON, K. R. Avaliação Técnico-Econômica e Ambiental da Utilização do Biogás Proveniente da Biodigestão da Vinhaça em Tecnologias para Geração de Eletricidade, Itajubá, 2007. 219 f. **Tese de Doutorado**. Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá. Itajubá-MG, 2007.
- SANTANA, H.; CEREJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; ...; SIQUEIRA, F. G. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2017.
- SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A.; AZEVEDO, M. T. P.; MELCHER, S. S.; WERNER, V. R.; MALONE, C. F. S.; ...; SANTOS, K. R. S. Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. Publicação eletrônica, **Instituto de Botânica**, Núcleo de Pesquisa em Ficologia. Disponível em: [www.ibot.sp.gov.br](http://www.ibot.sp.gov.br). Sao Paulo, 2012.
- SANT'ANNA, S.A.C.; FERNANDES, M.F.; IVO, W.M.P. M.; COSTA, J.L.S. Evaluation of Soil Quality Indicators in Sugarcane Management in Sandy Loam Soil. **Pedosphere**, v. 19, p. 312-322, 2009.
- SANTOS, G. A.; ROSSIELLO, R. O.; FERNANDES, M. S.; O'GRADY, P. C. Efeitos da vinhaça sobre o pH do solo, a germinação e o acúmulo de potássio em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 489-493, 1981.
- SANTOS, L. S. Digestão anaeróbia da vinhaça e determinação de parâmetros para gerenciamento do processo em tempo real. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2010.
- SEGATO, S. V., Pinto, A. D. S., JENDIROBA, E., & Nóbrega, J. D. Atualização em produção de cana-de-açúcar. **Piracicaba: CP**, v. 2, p. 415, 2006.
- SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. **Plant Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 649-657, 1993.
- SIRIANUNTAPIBOON, S.; SIHANONTH, P.; SOMCHAI, P.; ATTHASAMPUNNA, P.; HAYASHIDA, S. An adsorption mechanism for melanoidin decolorization by *Rhizoctonia sp.*, Bioscience, **Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1185–1189, 1995.
- SREETHAWONG, T.; CHAVADEJ, S. Color removal of distillery wastewater by ozonation in the absence and presence of immobilized iron oxide catalyst. **Journal of Hazardous Materials**, v. 155, n. 3, p. 486-493, 2008.
- SUZIN, L.; TAVERNARI, F. D. C.; KUNZ, A.; BORTOLI, M.; SCUSSIATO, L. A. Precipitação de fósforo em efluente nitrificante utilizando soda cáustica. In Embrapa Suínos e Aves-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (JINC), 7, 2013, Concórdia. Anais. Brasília, DF: Embrapa, p. 33-34, 2013.
- SZYMANSKI M. S. E.; BALBINOT, R.; NAGEL W. N. Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono—estudo de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, 2010.

- TOULOUPAKIS, E.; CICCHI, B.; BENAVIDES, A. M. S.; TORZILLO, G. Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1333-1341, 2016.
- UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Cresce utilização de vinhaça de cana para gerar energia e como fertilizante**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/>> . 27 de abril de 2012. Acesso em: 4 de janeiro de 2017.
- UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Histórico de Produção e Moagem**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 01 de agosto de 2019.
- UTEX. The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. Disponível em: <<http://www.utex.org/>>. Acesso em 11 de maio de 2015.
- VILAR, D. S.; CARVALHO, G. O.; PUPO, M. M.; AGUIAR, M. M.; TORRES, N. H.; AMÉRICO, J. H.;... FERREIRA, L. F. Vinasse degradation using *Pleurotus sajor-caju* in a combined biological–Electrochemical oxidation treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 192, p. 287-296, 2018.
- VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. **Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2005.
- WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 405-413, 2013.
- WILKEN, S.; SCHUURMANS, J.M.; MATTHIJS, H.C.P. Do mixotrophs grow as photoheterotrophs? Photophysiological acclimation of the chrysophyte *Ochromonas danica* after feeding. **New Phytologist**, v.204, p. 882–889, 2014.