



Remoção de nutrientes de vinhaça por *Klebsormidium flaccidum* e produção de biomassa com potencial econômico

Ronald Tarazona Delgado ^{a*}, Mayara dos Santos Guarieiro ^{a,b}, Frederico Pacheco Militão ^{a,b}, Valéria de Oliveira Fernandes ^{a,b}

^a Universidade Federal do Rio Grande, Brasil

^b Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil

* Autor correspondente (ronald.mtd@hotmail.com)

INFO

Keywords
effluent
microalgae
remediation
sustainability

Palavras-chaves
efluente
microalga
remediação
sustentabilidade

ABSTRACT

Nutrient removal from vinasse by Klebsormidium flaccidum and biomass production with economic potential

Ethanol is a sustainable alternative for mobility due to low carbon emissions. In Brazil, sugarcane ethanol production generates a large amount of vinasse, and its primary use in fertirrigation causes negative environmental impacts. This study aims to cultivate the microalga *Klebsormidium flaccidum* using vinasse as a source of nutrients while simultaneously producing biomass of economic value. Three treatments with concentrations of 10%, 20%, and 30% of diluted vinasse were tested, designated as T1, T2, and T3, respectively. A culture using Bold Basal Medium was considered as control. Although the treatments resulted in lower cell densities compared to the control, there was an increase in dry mass (DM) due to nutrient availability. Photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and carotenoids) were lower in the treatments, but proteins (T2 and T3: 8.72 ± 0.11% DM) increased with the addition of vinasse. Carbohydrates were more abundant in the lower concentration of vinasse (T1: 66.39% DM), while the highest lipid content among the treatments was recorded in T1 (5.74% DM). Among the fatty acids, the presence of myristic acid (T3: 164.4 µg g⁻¹ DM) and palmitic acid (T2: 176.4 µg g⁻¹ DM) was highlighted. *K. flaccidum* demonstrated high efficiency in removing total nitrogen and NH₄⁺ (> 90%) in treatments T2 and T3. The highest removals of total phosphorus, its ionic form PO₄³⁻, and potassium also occurred in these treatments. Our results highlight the potential of *K. flaccidum* in nutrient removal from agricultural wastewater, promoting sustainable economy.

RESUMO

O etanol é uma alternativa sustentável para a mobilidade devido à baixa emissão de carbono. No Brasil, a produção de etanol da cana-de-açúcar gera grande quantidade de vinhaça, e o seu principal uso na fertirrigação causa impactos ambientais negativos. Este estudo visa cultivar a microalga *Klebsormidium flaccidum* usando vinhaça como fonte de nutrientes e simultaneamente produzir biomassa de valor econômico. Foram testados três tratamentos com concentrações de 10%, 20% e 30% de vinhaça diluída, recebendo as denominações T1, T2 e T3, respectivamente. Um cultivo utilizando meio Basal de Bold foi considerado como controle. Embora os tratamentos tenham resultado em densidades celulares inferiores ao controle, houve aumento na massa seca (MS) devido à disponibilidade de nutrientes. Os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e carotenoides) foram inferiores nos tratamentos, mas as proteínas aumentaram com a adição da vinhaça (T2 e T3: 8,72 ± 0,11% MS). Os carboidratos foram mais abundantes na concentração menor de vinhaça (T1: 66,39% MS), enquanto que o maior teor de lipídeos entre os tratamentos foi registrado em T1 (5,74% MS). Dentre os ácidos graxos, destacou-se a presença elevada do ácido mirístico (T3: 164,4 µg g⁻¹ MS) e ácido palmítico (T2: 176,4 µg g⁻¹ MS). *K. flaccidum* demonstrou uma alta eficiência de remoção de N-total e NH₄⁺ (> 90%) nos tratamentos T2 e T3. As maiores remoções de P-total, sua forma iônica PO₄³⁻, e K também aconteceram nesses tratamentos. Nossos resultados ressaltam o potencial de *K. flaccidum* na remoção de nutrientes de águas residuais agrícolas, promovendo uma economia sustentável.



INTRODUÇÃO

Frente aos desafios das mudanças climáticas, o etanol se mostra como uma das alternativas ecotecnológicas para a construção de uma nova era de mobilidade sustentável, visto que é o biocombustível com a menor emissão de carbono (Conceição et al., 2023). Os Estados Unidos lideram como o maior produtor mundial de etanol, tendo alcançado uma produção de mais de 15 bilhões de galões em 2023. Em segundo lugar está o Brasil, com uma produção de mais de 8 bilhões de galões. Juntos, respondem por cerca de 80% da produção global de etanol. No entanto, é importante ressaltar que a maioria do etanol produzido nos Estados Unidos é derivada do milho, enquanto o Brasil concentra sua produção principalmente na cana-de-açúcar (RFA, 2024).

O subproduto líquido resultante do processamento da cana-de-açúcar é a vinhaça, um composto ácido, de coloração marrom escura, fétida e com alto conteúdo orgânico constituído por diferentes compostos derivados do nitrogênio, fósforo e potássio (Fuess et al., 2018). Em média, são gerados de 10 a 15 L de vinhaça no preparo de cada litro de etanol, dependendo do equipamento da destilaria (Christofoletti et al., 2013).

Devido ao grande volume de vinhaça produzida, tratamentos e usos alternativos foram desenvolvidos, como sua aplicação na fertirrigação, fermentação e produção de levedura, produção de ração animal e a incineração para recuperação de potássio (Ramirez et al., 2014). Dentre as alternativas, a fertirrigação, técnica que consiste na aplicação da vinhaça bruta no solo por meio da irrigação, representa a opção mais utilizada no Brasil e no mundo, pois exige baixo investimento inicial, custos de manutenção reduzidos, rápida aplicação, não necessita de tecnologias complexas e contribui para o aumento do rendimento da colheita (Fuess et al., 2018).

Contudo, devido às características da vinhaça, sua utilização excessiva pode causar alterações nas propriedades físico-químicas de solos, rios, lagos e na biota em geral (Christofoletti et al., 2013). Dessa forma, a utilização da vinhaça como fertilizante deve respeitar a capacidade de retenção de água do solo, e sua aplicação deve ser feita de maneira criteriosa para cada tipo de solo receptor (Silva et al., 2007). Nesse contexto, novas alternativas de tratamento e utilização da vinhaça devem ser avaliadas com o intuito de contribuir com a mitigação dos impactos ambientais. Devido à presença elevada de nutrientes e como medida de solução prática, sustentável e econômica, diversos autores têm proposto a utilização da vinhaça como meio alternativo de cultivo de microalgas (Santana et al., 2017; Siqueira et al., 2022; Conceição et al., 2023).

As microalgas compõem um grupo diversificado de organismos fotossintetizantes, uni ou multicelulares, capazes de formar colônias e filamentos. Elas possuem capacidade fisiológica e adaptativa que permite ampla distribuição, encontrando-se em ambientes de água doce, marinhos e terrestres (Karsten et al., 2016). Devido a sua plasticidade metabólica, as microalgas apresentam rápido crescimento, elevada eficiência fotossintética e alta taxa de assimilação de CO₂ mesmo quando cultivadas em laboratório e, uma vez que não necessitam de terra arável para o seu cultivo, contribuem com a mitigação dos impactos ambientais causados pela expansão agrícola (Liu et al., 2020).

Além disso, a biomassa produzida pode fornecer uma variedade de biomoléculas de alto valor como pigmentos, proteínas, lipídeos e carboidratos (Tawfik et al., 2022). O cultivo de microalgas não representa unicamente uma alternativa sustentável de remoção de compostos químicos nocivos de efluentes, mas também a possibilidade de aplicação comercial de sua biomassa em inúmeras áreas, tais como indústria alimentícia, de produtos farmacêuticos, cosméticos, biocombustíveis, entre outros (Spolaore et al., 2006; Sathasivam et al., 2019).

Dentre a ampla diversidade de microalgas, as algas filamentosas de água doce se destacam por apresentarem vantagens significativas no tratamento de águas residuais. Essas vantagens incluem facilidade de colheita da biomassa, devido ao seu tamanho, bem como sua maior resistência à predação (Liu et al., 2016). Espécies dos gêneros *Spirogyra*, *Oedogonium*, *Cladophora* e *Klebsormidium* foram estabelecidas como espécies potenciais para aplicações de tratamento de águas residuais (Liu et al., 2020).

A espécie *Klebsormidium flaccidum* habita ambientes terrestres e aquáticos, e está constituída por filamentos multicelulares e não ramificados, formado por células cilíndricas, ovoides e um tanto alongadas, com cloroplasto lamelar, denso e parietal, cobrindo parcial ou quase completamente a célula (Hori et al., 2014; Karsten et al., 2016; Montoya et al., 2019). Liu et al. (2016) reportam que a biomassa produzida por essa espécie durante o tratamento de águas residuais representa um recurso de grande potencial, uma vez que seus filamentos são compostos por macromoléculas com alto valor nutritivo e calórico, além de desempenharem a função de remoção de compostos potencialmente tóxicos ao ambiente.

Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial da vinhaça como fonte alternativa de nutrientes para o cultivo da microalga *K. flaccidum*, visando à produção de uma biomassa constituída por biomoléculas de importância econômica.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa e condições de cultivo

A cepa *Klebsormidium flaccidum* L011A foi obtida do banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais da Universidade Federal do Espírito Santo. A cepa foi cultivada utilizando meio Basal de Bold (Stein, 1973), com pH ajustado para 7,0 usando uma solução de HCl 0,01 N, e esterilizado por autoclavagem (121 °C, 30 min). Os cultivos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C), intensidade luminosa ($47,25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) obtida por meio de lâmpadas fluorescentes 40 W do tipo *daylight*, fotoperíodo (12:12 h, claro: escuro) e aeração contínua utilizando compressor de ar à vazão de $3,5 \text{ L min}^{-1}$. Os cultivos tipo batelada foram realizados em erlenmeyers de 5 L, contendo 4,5 L do meio de cultura e 0,5 L do inóculo ($2 \pm 0,01 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$), por um período de 21 dias e posteriormente liofilizados.

Coleta e caracterização da vinhaça

O efluente foi doado pela usina Lasa - Linhares Agroindustrial S/A, ES. Posteriormente, o resíduo foi passado por uma peneira com poro de 0,8 mm para remoção de materiais grandes como restos vegetais e partículas de solo. A caracterização físico-química do efluente bruto e do efluente após cultivo da alga foram feitas no início e ao final do experimento. Foram analisadas as variáveis pH, condutividade elétrica, turbidez, nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, fósforo total, ortofosfato, demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) conforme APHA (2012). Os elementos potássio, magnésio e sódio foram determinados utilizando um espectrômetro de absorção atômica (Analytik Jena, ZEEnit 700), operado no modo de atomização em chama, equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo, e nos comprimentos de onda 766,5, 285,2 e 589 nm, respectivamente. Foi utilizada como fonte de energia uma lâmpada de catodo oco (Analytik Jena, HCL) para cada elemento, e ar comprimido como gás oxidante a uma vazão de 550 L h^{-1} (Lyra et al., 2010).

Para o cálculo do percentual de eficiência de remoção (ER%) dos principais compostos analisados (nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, fósforo total, ortofostato e potássio), utilizou-se a seguinte equação: $\text{ER}\% = (\text{Ci} - \text{Cf}) / \text{Ci} \times 100$, sendo que Ci = Concentração inicial do nutriente no meio de cultivo, antes da inoculação; e Cf = Concentração final do nutriente no meio de cultivo, após a remoção da biomassa algal.

Delineamento experimental

Foram ensaiados três tratamentos com concentrações de 10%, 20% e 30% de vinhaça diluída em água destilada para a formulação de meios de cultura de *K. flaccidum* para avaliar e comparar seu crescimento, composição bioquímica e remoção de nutrientes. Os tratamentos receberam as denominações T1, T2 e T3, respectivamente. Um cultivo utilizando meio Basal de Bold foi considerado como controle.

Avaliação do crescimento

A densidade celular (cel mL^{-1}) foi determinada por contagem direta com hemocítmetro de Fuchs-Rosenthal, utilizando-se microscópio óptico (Olympus, CX41), 400 aumentos (ocular 10X, objetiva 40X), a cada dois dias durante o período de cultivo. A partir dos valores de densidade celular, foram elaboradas as curvas e parâmetros da cinética de crescimento segundo Fogg e Thake (1987): Taxa de crescimento populacional (K), onde $K = \ln(N_2 / N_1) / (t_2 - t_1)$, sendo que N_1 e N_2 = número de células nos tempos t_1 e t_2 (início e fim do cultivo, respectivamente); tempo de duplicação (G), onde $G = \ln(2) / K$; e rendimento máximo (R), onde $R = R_1 - R_0$, sendo que R_1 = número máximo de cel mL^{-1} e R_0 = número inicial de cel mL^{-1} .

A determinação da massa seca foi realizada por gravimetria a cada quatro dias filtrando alíquotas de 20 mL através de microfiltros de fibra de vidro (Macherey-Nagel, GF-1 47 mm), seguido de secagem em estufa a 60 °C até atingirem peso constante.

Análises bioquímicas

A clorofila *a* e os carotenoides foram extraídos com acetona 90% a frio, e suas concentrações foram medidas espectrofotometricamente (Thermo Scientific, Aquamate Plus UV-Vis), seguindo os protocolos estabelecidos por Jeffrey e Humphrey (1975) e Strickland e Parsons (1972), respectivamente. As concentrações dos pigmentos foram avaliadas a cada quatro dias.

As proteínas hidrossolúveis foram determinadas pelo método de Lowry et al. (1951), com base em uma curva padrão de albumina sérica bovina. A concentração de carboidratos solúveis foi determinada seguindo o método descrito por Kochert (1978), utilizando uma curva padrão de glicose anidra. Os lipídeos totais foram extraídos e analisados de acordo com Bligh e Dyer (1959). As análises de proteínas, carboidratos e lipídios foram avaliadas apenas ao final do experimento e apresentadas como porcentagem da massa seca (% MS).

A determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) procedentes da biomassa li-

ofilizada foram determinados através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos ésteres metílicos. Inicialmente, a biomassa foi transesterificada seguindo a metodologia proposta por Delgado et al. (2021). Os FAME foram dissolvidos em 10 µL de acetonitrila e analisados em um sistema de cromatografia (Shimadzu, CBM-20A). Uma fase móvel binária consistindo em (A) solução de ácido trifluoroacético e água destilada (0,1:99,9, v/v) e (B) acetonitrila foi filtrada usando um sistema ao vácuo através de filtros de membrana de 0,45 µm e degaseificada em um banho de ultrassom. O sistema HPLC foi programado para operar sob condições controladas de temperatura da coluna (37 °C), comprimento de onda de detecção (210 nm) e vazão (0,25 mL min⁻¹). Os ácidos graxos foram analisados comparando o tempo de retenção dos picos correspondentes com uma mistura padrão conhecida de FAME adicionada a cada amostra. O software LCSolutions v. 2.1 foi utilizado para aquisição e análise dos dados.

Análise estatística

Os tratamentos e controle foram realizados em triplicata (n = 3). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com o software SigmaPlot v. 14.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da vinhaça

Tabela 1 - Caracterização físico-química da vinhaça

Parâmetros	
pH	3,45
Condutividade Elétrica	2580 µS cm ⁻¹
Demanda química de oxigênio (DQO)	16603 mg L ⁻¹
Demanda biológica de oxigênio (DBO)	9464 mg L ⁻¹
Nitrogênio Total	498 mg L ⁻¹
Nitrogênio Amoniacal	466 mg L ⁻¹
Fósforo Total	26 mg L ⁻¹
Ortofosfato	20 mg L ⁻¹
Potássio	1006 mg L ⁻¹
Magnésio	120 mg L ⁻¹
Sódio	32 mg L ⁻¹
Turbidez	4.210 NTU

Embora o efluente utilizado neste trabalho demonstre possuir alto conteúdo de nutrientes necessários para compor um meio de cultura alternativo para microalgas, é importante ressaltar que, dependendo da variedade de cana-de-açúcar processada,

A vinhaça utilizada em nosso estudo caracterizou-se como ácida, turva, com valores elevados de potássio, nitrogênio, condutividade elétrica, DQO e DBO (Tabela 1). Essas descrições físico-químicas são semelhantes ao relatado na literatura para esse tipo de efluente (Santana et al., 2017; Candido et al., 2021).

Potássio foi o elemento com maior concentração na vinhaça (1006 mg L⁻¹). Este elemento tem papel fundamental na regulação osmótica, manutenção do pH intracelular e na conformação e estabilidade de proteínas (Grobelaar, 2013). O magnésio, cuja importância está associada aos pigmentos fotossintéticos, e o sódio, nutriente essencial na ativação enzimática (Markou et al., 2014), foram também elementos presentes na composição da vinhaça em concentrações consideráveis.

Outra característica da constituição química da vinhaça foi a elevada concentração de nitrogênio amoniacal (466 mg L⁻¹), sendo esta a principal fração do nitrogênio total. Tal característica é favorável para seu uso como meio de cultura, devido a esta ser a principal forma assimilável pelos microrganismos fotossintéticos, requerendo menor custo energético quando comparada a outras fontes de nitrogênio (Beuckels et al., 2015). Em relação aos teores de fósforo, a vinhaça também apresentou valores elevados, sendo o ortofosfato (20 mg L⁻¹) sua principal fração. Assim como o nitrogênio, o fósforo é essencial para o metabolismo celular, sendo necessário para a formação de ácidos nucleicos e transferência de energia (Markou et al., 2014).

do período da colheita e do processo industrial utilizado na produção de etanol, a composição química da vinhaça pode variar (Candido e Lombardi, 2018).

Mais um critério necessário a considerar é a aplicação da vinhaça diluída. A utilização pura desse

efluente como meio de cultura enfrenta diversas dificuldades como a possível presença de compostos fenólicos ou metais pesados que podem ser prejudiciais para o crescimento e desenvolvimento microalgal (Marques et al., 2013). O pH ácido da vinhaça devido à presença de ácidos orgânicos também pode afetar negativamente o crescimento das microalgas que requerem condições alcalinas ou neutras para prosperar. Além disso, a alta turbidez dificultaria a incidência da luz necessária para a atividade fotossintética (Santos et al., 2016). Portanto, a diluição da vinhaça é crucial para mitigar esses problemas, garantindo assim um meio de cultura adequado para o cultivo desses microrganismos de

forma eficiente e sustentável.

Crescimento e produção de massa seca de *Klebsormidium flaccidum*

O crescimento de *K. flaccidum* foi avaliado inicialmente pela determinação da densidade celular em função do tempo. Conforme mostrado nas curvas de crescimento (Figura 1), os diferentes tratamentos utilizando vinhaça como fonte de nutrientes (T1, T2 e T3) apresentaram um número de células inferior ($1,27 \pm 0,2 \times 10^6$ cel mL⁻¹) em relação ao controle ($8,04 \times 10^6$ cel mL⁻¹).

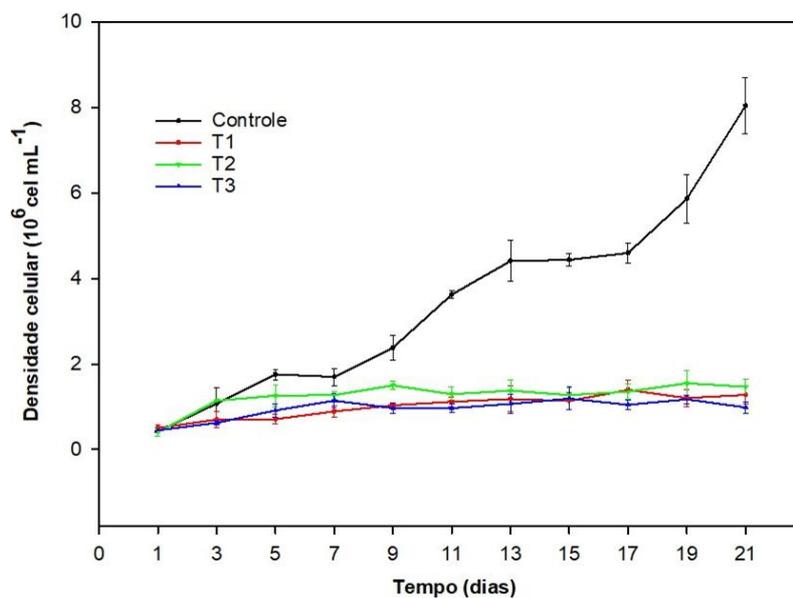


Figura 1 - Curvas de crescimento de *Klebsormidium flaccidum* no meio Basal de Bold (controle) e tratamentos com diferentes concentrações de vinhaça diluída (T1= 10%, T2= 20%, T3= 30%).

Os valores da cinética de crescimento de *K. flaccidum* estão representados na Tabela 2. Como esperado, conforme à densidade celular ao longo do período de cultivo, a taxa de crescimento mais elevada foi encontrada no controle ($0,15$ d⁻¹). Consequentemente, seu tempo de duplicação celular foi

menor (4,62 dias). Dentre os tratamentos, T1 e T2 proporcionaram uma maior taxa de crescimento e menor tempo de duplicação. O maior valor de rendimento máximo foi alcançado também pelo controle ($7,62 \times 10^6$ cel mL⁻¹), seguido por T2 ($1,14 \times 10^6$ cel mL⁻¹).

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de crescimento (K= taxa de crescimento, G= tempo de duplicação, R= rendimento máximo) de *Klebsormidium flaccidum* no meio Basal de Bold (controle) e tratamentos com diferentes concentrações de vinhaça diluída (T1= 10%, T2= 20%, T3= 30%).

	K (d ⁻¹)	G (dias)	R (cel mL ⁻¹)
Controle	0,15 ^a	4,62 ^c	7 620 209 ^a
T1	0,06 ^b	11,55 ^b	888 883 ^c
T2	0,05 ^b	13,86 ^b	1 143 403 ^b
T3	0,04 ^c	17,33 ^a	738 429 ^d

Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nossos resultados indicam que apesar da utilização de um efluente rico em nutrientes como

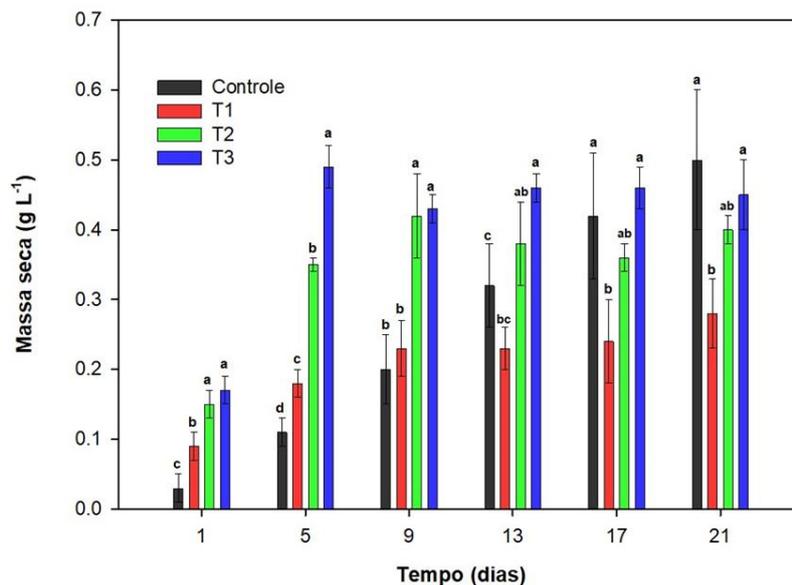
a vinhaça, outras características estão exercendo um fator limitante no desenvolvimento

populacional microalgal. O crescimento das algas é afetado por uma série de fatores e, devido a sua capacidade fotossintética, a quantidade e a qualidade de luz disponível afeta diretamente à densidade celular (Wang et al., 2015). A densidade celular registrada nos tratamentos pode ter relação com a coloração marrom escura apresentada pela vinhaça bruta, atribuída principalmente à presença da melanoidina que minimiza a penetração de luz, interferindo em processos celulares (Silva et al., 2007).

Kadioglu e Algur (1992), precursores nos estudos envolvendo a utilização de vinhaça no cultivo de microalgas, encontraram um aumento na densidade celular em *Chlamydomonas reinhardtii*, quando cultivada com 5% do efluente. Posteriormente, muitos autores vêm relatando a

utilização de diferentes cepas para avaliar sua capacidade de remoção de nutrientes e obtenção simultânea de maiores quantidades de biomassa. Budiyo et al. (2014) utilizaram 8% de vinhaça no cultivo de *Spirulina platensis* e obtiveram uma taxa de crescimento similar ($0,05 \text{ d}^{-1}$). Santos et al. (2016) relataram que a mesma espécie alcançou taxas de $0,54$ e $1,02 \text{ d}^{-1}$ com $0,1\%$ e $1,0\%$ de vinhaça, respectivamente. Marques et al. (2013) obtiveram uma taxa de $0,76 \text{ d}^{-1}$ com 2% de vinhaça no crescimento de *Chlorella vulgaris*.

A massa seca de *K. flaccidum* no controle foi aumentando exponencialmente ao longo do cultivo, atingindo o valor máximo de $0,50 \text{ g L}^{-1}$, no último dia de cultivo (Figura 2), porém, esse valor foi estatisticamente igual aos tratamentos T2 ($0,41 \text{ g L}^{-1}$) e T3 ($0,49 \text{ g L}^{-1}$).



Valores seguidos pela mesma letra em cada dia de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 2 - Massa seca de *Klebsormidium flaccidum* no meio Basal de Bold (controle) e tratamentos com diferentes concentrações de vinhaça diluída (T1= 10%, T2= 20%, T3= 30%)

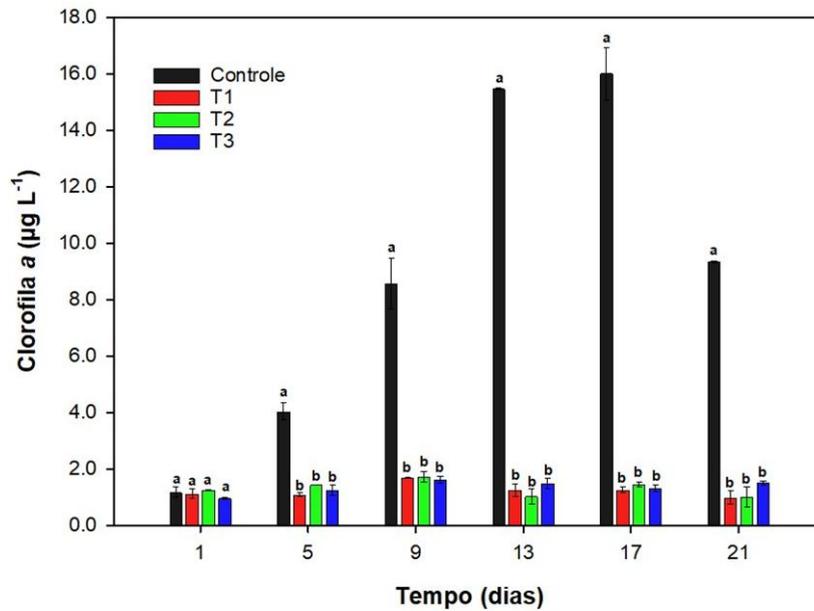
Apesar de ter reportado previamente uma densidade celular mínima nos tratamentos empregados (Figura 1), o incremento relatado na massa seca é devido à alta disponibilidade de nutrientes do efluente. Esses achados podem estar relacionados a uma maior capacidade de armazenamento de substâncias de reserva nos filamentos de *K. flaccidum* nos tratamentos, decorrendo em uma elevada massa seca.

Diversas pesquisas têm explorado também o cultivo de microalgas verdes em diferentes concentrações de vinhaça, ressaltando a necessidade de determinar a concentração ideal para maximizar a produção de biomassa (Liu et al., 2016, Engin et al. 2018). Visando a otimização dos cultivos com vi-

nhaça ou efluentes que possuam alta turbidez, Ramirez et al. (2014) sugeriram que a intensidade luminosa deva ser proporcionalmente maior à medida que aumenta a concentração do efluente, o que possibilitaria o uso de concentrações mais elevadas.

Composição de pigmentos de *Klebsormidium flaccidum*

A maior concentração de clorofila *a* foi registrada no 17º dia no controle, atingindo um valor de $16,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 3). A concentração do pigmento nos diferentes tratamentos não apresentou diferença significativa ao longo dos dias de cultivo, além de representar valores inferiores ao controle ($1,66 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$).

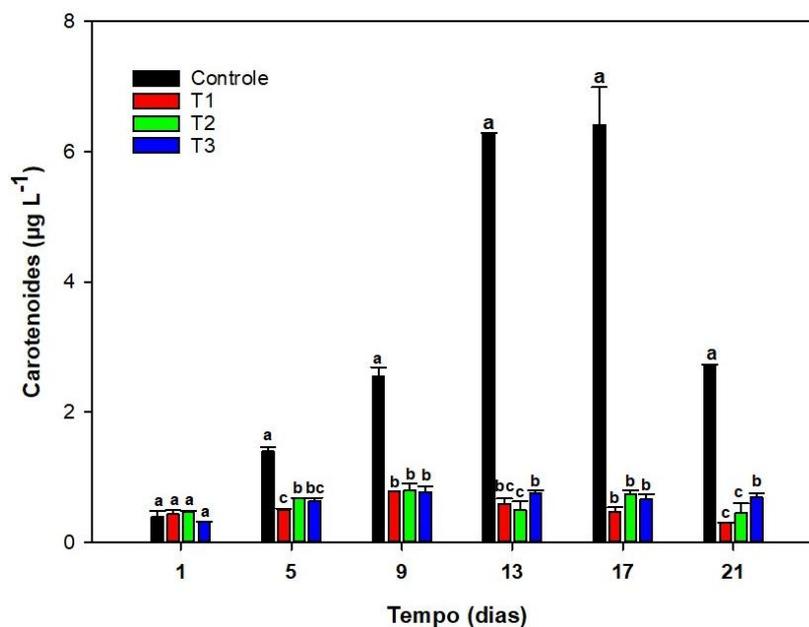


Valores seguidos pela mesma letra em cada dia de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
 Figura 3 - Clorofila *a* de *Klebsormidium flaccidum* no meio Basal de Bold (controle) e tratamentos com diferentes concentrações de vinhaça diluída (T1= 10%, T2= 20%, T3= 30%)

A clorofila *a* é uma molécula orgânica complexa envolvida na captação de luz e conversão de energia, sua abundância está associada ao estado fisiológico celular, e à capacidade fotossintética e de fixação de carbono (Da Silva et al., 2020). Os baixos teores de clorofila *a* nos tratamentos demonstram que o desempenho fotossintético de *K. flaccidum* foi afetado devido à dificuldade da incidência da luz, o que também resultou em baixa densidade celular como foi explicado anteriormente. Porém, algumas espécies podem ter uma melhor adaptação,

como descrito por Candido e Lombardi (2018) que registraram concentrações elevadas de clorofila *a* (4,0 e 5,0 mg L⁻¹) no cultivo de *C. vulgaris* utilizando altas concentrações de vinhaça (80% e 60%, respectivamente).

Quanto às concentrações de carotenoides, o valor máximo também foi registrado no 17º dia de cultivo pelo controle (6,42 µg L⁻¹). Enquanto os tratamentos mantiveram um valor constante e inferior a 0,8 µg L⁻¹ ao longo do período de cultivo (Figura 4).



Valores seguidos pela mesma letra em cada dia de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
 Figura 4 - Carotenoides de *Klebsormidium flaccidum* no meio Basal de Bold (controle) e tratamentos com

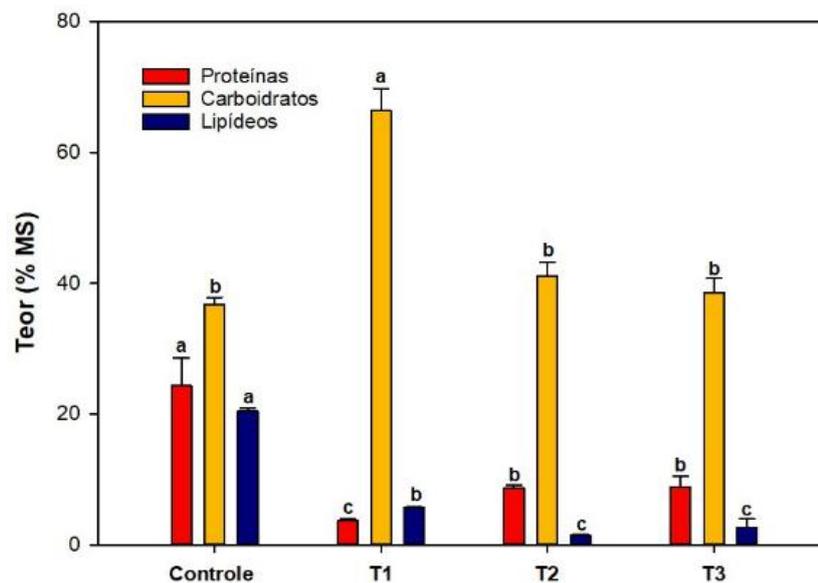
diferentes concentrações de vinhaça diluída (T1= 10%, T2= 20%, T3= 30%)

Os carotenoides têm ganhado grande atenção devido às suas propriedades antioxidantes, além de serem comercialmente importantes para aplicações industriais nos mercados de corantes, alimentos e cosméticos (Sathasivam et al., 2019). Embora neste estudo as concentrações de carotenoides não tenham alcançado valores expressivos, outras pesquisas apontam à utilização de resíduos agropecuários na produção de uma biomassa rica nesse pigmento. Rodrigues et al. (2014) ao cultivar *Phormidium autumnale* em águas residuais de matadouro como meio de cultura chegaram a obter grandes quantidades de pigmentos carotenoides, constituídos em

vinte tipos. Embora a vinhaça se apresente como um meio alternativo rico em nutrientes, *K. flaccidum* optou por outras rotas metabólicas de síntese de compostos bioativos como se discutirá mais a diante.

Composição bioquímica de *Klebsormidium flaccidum*

Observa-se que nos tratamentos com maior quantidade de vinhaça (T2 e T3), *K. flaccidum* apresentou um teor de proteínas ($8,72 \pm 0,11\%$ MS) superior a T1 (3,61% MS) (Figura 5).



Valores seguidos pela mesma letra no controle e em cada tratamento não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 5 - Teor de proteínas, carboidratos e lipídeos de *Klebsormidium flaccidum* no meio Basal de Bold (controle) e tratamentos com diferentes concentrações de vinhaça diluída (T1= 10%, T2= 20%, T3= 30%)

Esses resultados indicam que o incremento do teor proteico nos tratamentos foi consequência da maior disponibilidade de nitrogênio. A abundância deste elemento no meio tende a aumentar a síntese de ácidos nucleicos e proteínas celulares (Grobbe-laar et al., 2013). No entanto, os tratamentos apresentaram valores de proteínas inferiores ao controle, devido ao fato de que, embora a vinhaça forneça diferentes fontes de nitrogênio, o meio de cultura sintético empregado oferece altas concentrações de nitrato (NO_3^-) que podem ser mais eficientemente anabolizadas do que as formas nítricas disponíveis na vinhaça diluída.

Alguns estudos também reportam a importância do aproveitamento de efluentes para a obtenção de proteínas de microalgas. Zhang et al. (2018) ao analisar a influência de várias concentrações de águas residuais domésticas na composição da biomassa

de *Scenedesmus* sp. concluíram que o conteúdo proteico celular é proporcional ao fornecimento de nitrogênio no meio. Da mesma forma, Syaichurrozi e Jayanudin (2017) ao estudarem o efeito da água residual oriunda da produção de tofu no crescimento de *S. platensis*, relataram aumento no teor de proteínas de 36,73% MS para 66,62% MS.

Em relação ao teor de carboidratos de *K. flaccidum*, observou-se efeito inverso, uma vez que os tratamentos apresentaram maior teor dessa biomolécula na menor concentração de vinhaça (T1 com 66,39% MS), inclusive superior que o controle (36,82% MS).

Patel et al. (2023) reportam que principalmente nas microalgas verdes o fluxo de carbono proveniente da fotossíntese é desviado para as vias metabólicas associadas à síntese de compostos ricos em

energia como polissacarídeos. Embora os polissacarídeos de microalgas tenham potenciais aplicações comerciais na alimentação e na agricultura, muito pouco se sabe sobre a sua produção e recuperação a partir de resíduos agroindustriais. Estes processos poderiam ser concebidos para promover a produção alimentar sustentável, fechando o ciclo entre os resíduos e a revalorização ou reutilização da biomassa (Franco-Morgado et al., 2023). Uma biomassa rica em carboidratos pode ser também considerada como matéria prima apropriada para a produção de biocombustíveis como bioetanol e biogás (Spolaore et al., 2006; Kumar et al., 2022).

Calixto et al. (2016) observaram síntese de carboidratos superior a 50% MS em *Chlorella* sp. e *Lagerheimia longiseta* usando resíduos da cana-de-açúcar. Contrariamente, Mitra et al. (2012) registrou baixo acúmulo de carboidratos em *C. vulgaris* cultivada em vinhaça de etanol de milho e em efluente de soro de soja (6,64% MS e 15,48% MS, respectivamente). Com base nesses estudos, o cultivo de microalgas em efluentes com elevada turbidez demonstra constituir uma fonte de nutrientes para a produção de uma biomassa constituída por variáveis teores de carboidratos, uma vez que a limitação da incidência de luz pode ser superada aproveitando a capacidade particular de cada uma das espécies em degradar fontes de carbono orgânico em condições de baixa exigência luminosa (Wang et al., 2015).

Em relação ao teor de lipídeos de *K. flaccidum*,

o maior valor dentre os tratamentos foi registrado em T1 (5,74% MS), porém, significativamente inferior ao registrado no controle (20,4% MS). Ferreira et al. (2018) observaram incremento no teor lipídico até 24% MS em *Desmodesmus* sp. cultivada unicamente com vinhaça bruta. Calixto et al. (2016) ao avaliarem o teor lipídico de *Chlorella* sp., *Chlaydomonas* sp., *Pediastrum tetras* e *L. longiseta* cultivados utilizando vinhaça como fonte suplementar de nutrientes atingiram 8%, 20%, 13% e 15% MS, respectivamente. Alternativas metabólicas da fixação do carbono em microalgas condizem à síntese lipídica, desse modo, os baixos valores registrados em termos de teor lipídico podem ser consequência da competição existente entre a síntese de lipídeos e carboidratos (Oliveira et al., 2017). Devido à pouca disponibilidade de nitrogênio em comparação ao meio de cultura sintético, pode-se afirmar que existe uma relação inversamente proporcional entre a disponibilidade desse elemento e o acúmulo de substâncias de reserva oleicas (Delgado et al., 2021).

A composição dos FAME de *K. flaccidum* está listada na Tabela 3. Os ácidos graxos foram classificados como ácidos graxos saturados (SFA) e insaturados (UFA). Os SFA detectados foram o ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0). Os UFA foram constituídos pelo ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3).

Tabela 3 - Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) de *Klebsormidium flaccidum* no meio Basal de Bold (controle) e tratamentos com diferentes concentrações de vinhaça diluída (T1= 10%, T2= 20%, T3= 30%)

FAME	Controle	T1	T2	T3
Ácido láurico	14,3 ^b	42,2 ^a	4,9 ^c	8,3 ^{bc}
Ácido mirístico	131,3 ^{ab}	51,9 ^b	64,9 ^{ab}	164,4 ^a
Ácido palmítico	59,9 ^b	62,8 ^b	176,4 ^a	40,4 ^b
Ácido oleico	80,5 ^{ab}	45,9 ^c	65,9 ^{bc}	98,9 ^a
Ácido linoleico	20,8 ^a	4,9 ^c	11,4 ^b	8,4 ^{bc}
Ácido linolênico	1,8 ^a	1,5 ^a	2,7 ^a	2,7 ^a
SFA	205,5 ^{ab}	156,9 ^b	246,2 ^a	213,10 ^{ab}
UFA	103,10 ^a	52,3 ^b	80,0 ^{ab}	110,0 ^a

Valores seguidos pela mesma letra no controle e em cada tratamento não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Dos SFA, o maior contribuinte foi o ácido mirístico no controle e no tratamento T3 com 131,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS e 164,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS, respectivamente. Entretanto, no tratamento T2 o ácido palmítico foi o mais predominante (176,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS). No caso dos UFA, o ácido oleico foi o mais representativo, e teve uma relação proporcional ao aumento de vinhaça no

meio de cultura. Dentre os tratamentos, T1 apresentou os menores valores de ácidos graxos.

As variações observadas no perfil de FAME podem ser equiparadas aos resultados obtidos por Engin et al. (2018) no seu experimento sobre o cultivo de *Micractinium* sp. com a adição de 20% de vinhaça. Segundo os achados, o ácido linoleico foi

identificado como o principal componente, representando 45% do total de FAME. Mitra et al. (2012) avaliaram o efeito da vinhaça e do soro de soja como fonte de nutrientes para o cultivo heterotrófico e mixotrófico de *Chlorella prothecoides*, encontrando que os principais FAME foram o ácido linoleico, ácido oleico e ácido palmítico, com valores percentuais de $52,2 \pm 0,4\%$, $21,4 \pm 0,2\%$ e $13,9 \pm 0,2\%$, respectivamente. Zheng et al. (2016) relataram também aumento de SFA e declínio de UFA em culturas de *Chlorella* sp., *Chlorella sorokinana* e *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas com extratos de resíduos de macroalgas.

Como encontrado neste estudo, as alterações na composição bioquímica da biomassa de microalgas em resposta à composição das águas residuais têm consequências importantes para sua valorização e

utilização (Kumar et al., 2022). Além disso, o custo dos nutrientes para a preparação dos meios de cultivos representa um dos fatores relevantes na produção de microalgas, desse modo, optar por meios alternativos diminuirá de forma significativa os custos de produção (Tawfik et al., 2022).

Remoção de nutrientes de vinhaça por *Klebsormidium flaccidum*

No final do experimento, após a retirada da biomassa microalgal, a composição residual dos tratamentos foi avaliada em relação aos teores de nitrogênio total (N-total), fósforo total (P-total), nitrogênio amoniacal (NH_4^+), ortofosfato (PO_4^{3-}) e potássio (K), para avaliar a capacidade de remoção de nutrientes de *K. flaccidum* (Tabela 4).

Tabela 4 - Percentual de remoção de nutrientes de *Klebsormidium flaccidum* no meio Basal de Bold (controle) e tratamentos com diferentes concentrações de vinhaça diluída (T1= 10%, T2= 20%, T3= 30%)

Tratamento	% remoção N-total	% Remoção P-total	% Remoção NH_4^+	% Remoção PO_4^{3-}	% Remoção K
T1	78,42 ^b	9,67 ^b	91,70 ^a	14,51 ^b	42,51 ^b
T2	90,07 ^a	29,08 ^a	97,27 ^a	31,68 ^a	67,21 ^a
T3	91,58 ^a	34,02 ^a	96,94 ^a	40,17 ^a	51,18 ^a

Valores seguidos pela mesma letra em cada tratamento não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

K. flaccidum demonstrou uma alta capacidade de remoção de N-total, apresentando maior eficiência (> 90%) nos tratamentos T2 e T3. Os resultados demonstraram também remoção acentuada de NH_4^+ em todos os tratamentos. As maiores remoções de P-total, sua forma iônica PO_4^{3-} , e K também aconteceram nos dois tratamentos com maior fornecimento de vinhaça.

Estudos indicam que uma alta concentração de N-total nas águas residuais é um pré-requisito para a remoção efetiva e simultânea de P-total, isso porque a assimilação de nutrientes em algas ocorre mediante transporte ativo de íons através da membrana celular; logo, são necessárias proteínas de transporte que dependem da disponibilidade de nitrogênio (Beuckels et al., 2015). Portanto, as menores reduções de P-total e PO_4^{3-} (14,51%) no tratamento T1 podem ser resultado da menor disponibilidade de nitrogênio no meio.

Dentre as pesquisas com vinhaça, Marques et al. (2013) testaram esse efluente no cultivo de *C. vulgaris*, alcançando a remoção pouco menos do total de NH_4 e PO_4 . Valderrama et al. (2002) cultivaram também a mesma espécie utilizando vinhaça como fonte suplementar ao meio de cultura, e encontraram alta eficácia na remoção de NH_4 e PO_4 (78% e 28%, respectivamente).

A remoção desses compostos em águas residuais

ocorre principalmente na fase de tratamento terciário, e os métodos mais comumente utilizados incluem processos biológicos, como digestão anaeróbica seguida de nitrificação e desnitrificação (Siqueira et al., 2022). Znad et al. (2018) investigaram a remoção de nutrientes em águas residuais municipais por *C. vulgaris*, e obtiveram remoção de N e P nos níveis de 80% e 100% respectivamente. Por sua vez, Singh et al. (2017) utilizaram diferentes algas verdes, destacando-se *Parachlorella kessleri* que removeu até 98% de fosfatos com biomassa constituída por altos teores de FAME. Caporgno et al. (2015) reportaram a redução de 96% de N-total e 98% de P-total ao implementar águas residuais urbanas no cultivo de *Chlorella kessleri* e *C. vulgaris* em águas residuais urbanas. *S. obliquus* cultivada em águas residuais da indústria avícola chegou a remover 97% do nitrogênio amoniacal contido no efluente (Oliveira et al., 2017).

Nesta pesquisa a remoção de K-total foi mais eficiente no tratamento T2, no qual o percentual de remoção deste elemento chegou a 67%. A utilização de espécies com alta capacidade de absorção de K-total representa um grande desafio para a agricultura sustentável, uma vez que a utilização de microalgas pode vir a minimizar os problemas derivados da fertirrigação (Candido et al., 2021).

Esses estudos demonstram que as microalgas têm a capacidade de assimilar grandes quantidades

de nitrogênio e fósforo para seu desenvolvimento. Portanto, sua utilização para a biorremediação em diferentes águas residuais derivadas da agroindústria, como a vinhaça, representa uma alternativa para uma economia sustentável (Franco-Morgado et al., 2023).

CONCLUSÕES

A combinação do cultivo de microalgas com a utilização de vinhaça representa um avanço significativo no tratamento de águas residuais provenientes de indústrias sucroalcooleiras. Esse processo não apenas torna economicamente viável a produção de biomassa para diversas aplicações, mas também contribui para a biorremediação desses efluentes, além de ajudar na mitigação dos impactos ambientais.

Dessa forma, é crucial realizar uma caracterização detalhada do efluente para determinar a concentração ideal para seu uso no cultivo de microalgas. Neste estudo, *K. flaccidum* cultivada em diferentes tratamentos com base em vinhaça demonstrou uma notável capacidade de remoção de nutrientes e padrão constante de crescimento, demonstrando ser uma espécie promissora para a obtenção de biomassa constituída por biomoléculas de interesse econômico.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores gostariam de agradecer também aos seguintes laboratórios da UFES: Laboratório de Espectrometria Atômica pelo auxílio na caracterização química elementar da vinhaça e Laboratório de Saneamento Ambiental pelo apoio na análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos da biomassa algal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination for Water and Wastewater. 22th ed. Washington, D.C.: AWWA, WPCF, 2012.
- Beuckels A, Smolders E, Muylaert K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, v. 77, p. 98-106, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.
<https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Budiyono IS, Sumardiono S, Sasongko SB. Production of *Spirulina platensis* biomass using digested vinasse as cultivation medium. *Trends in Applied Sciences Research*, v. 9, p. 93-102, 2014.
<https://doi.org/10.3923/tasr.2014.93.102>
- Calixto CD, da Silva Santana JK, de Lira EB, Sassi PGP, Rosenhaim R, da Costa Sassi CF, da Conceição MM, Sassi R. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, v. 221, p. 438-446, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.066>
- Candido C, Bernardo A, Lombardi AT. Optimization and qualitative comparison of two vinasse pre-treatments aiming at microalgae cultivation. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 26, n. 2, p. 359-367, 2021.
<https://doi.org/10.1590/S1413-415220190306>
- Candido C, Lombardi AT. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. *Algal Research*, v. 30, p. 79-85, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.005>
- Caporgno MP, Taleb A, Olkiewicz M, Font J, Pruvost J, Legrand J, Bengoa C. Microalgae cultivation in urban wastewater: nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *Algal Research*, v. 10, p. 232-239, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>
- Christofolletti CA, Escher JP, Correia JE, Marinho JF, Fontanetti CS. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>
- Conceição GR, da Silva CS, do Vale TO, dos Santos JN, Matos JBTL, de Almeida PF, Chinalia FA. Culture operational strategies for the production of methane and algal oil using ethanol vinasse effluent. *Journal of Applied Phycology*, v. 35, n. 5, p. 2135-2149, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s10811-023-03019-7>
- Da Silva JC, Lombardi AT. Chlorophylls in Microalgae: Occurrence, Distribution, and Biosynthesis. In: Jacob-Lopes E, Queiroz MI, Zepka LQ (eds). *Pigments from Microalgae Handbook*. Springer Nature, Switzerland, p. 1-18, 2020.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2>
- Delgado RT, Guarieiro MS, Antunes PW, Cassini ST, Terrosos HM, Fernandes VO. Effect of nitrogen limitation on growth, biochemical composition, and cell ultrastructure of the microalga *Picocystis salinarum*. *Journal of Applied Phycology* v. 33, n. 4, p. 2083-2092, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02462-8>
- Engin IK, Cekmecelioglu D, Yücel AM, Oktem HA. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 251, p. 128-134, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.023>
- Ferreira G, Fernandes D, Pinto LR, Tasic M, Maciel Filho R. Investigation of *Desmodesmus* sp. growth in photobioreactor using vinasse as a carbon source. *Chemical Engineering Transactions*, v. 65, p. 721-726, 2018.
<https://doi.org/10.3303/CET1865121>

- Fogg GE, Thake B. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin Press, London, 175p., 1987.
- Franco-Morgado M, Amador-Espejo GG, Pérez-Cortés M, Gutiérrez-Urbe J.A. Microalgae and Cyanobacteria Polysaccharides: Important Link for Nutrient Recycling and Revalorization of Agro-Industrial Wastewater. *Applied Food Research*, v. 3, n. 100296, p. 1-11, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100296>
- Fuess LT, Garcia ML, Zaiat M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. *Science of The Total Environment*, v. 634, p. 29–40, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.326>
- Grobbelaar JU. The microalgal cell with reference to mass cultures. Inorganic algal nutrition. In: Richmond A, Hu Q (eds). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Wiley-Blackwell, Oxford, p. 123-133, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch8>
- Hori K, Maruyama F, Fujisawa T, Togashi T, Yamamoto N, Seo M et al. Klebsormidium flaccidum genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications*, v. 5, p. 3978, 2014. <https://doi.org/10.1038/ncomms4978>
- Jeffrey SW, Humphrey GF. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, v. 167, p. 191-194, 1975. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)
- Kadioglu A, Algur OF. Tests of media with vinasse for Chlamydomonas reinhardtii for possible reduction in vinasse pollution. *Bioresource Technology*, v. 42, n. 1, p. 1-5, 1992. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90080-H](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90080-H)
- Karsten U, Herburger K, Holzinger A. Photosynthetic plasticity in the green algal species Klebsormidium flaccidum (Streptophyta) from a terrestrial and a freshwater habitat. *Phycologia*, v. 56, n. 2, p. 213–220, 2016. <https://doi.org/10.2216/16-85.1>
- Kochert G. Carbohydrate determination by phenol–sulfuric acid method. In: Hellebust JA, Craigie JS (eds). *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 95–97, 1978.
- Kumar N, Banerjee C, Chang JS, Shukla P. Valorization of wastewater through microalgae as a prospect for generation of biofuel and high-value products. *Journal of Cleaner Production*, v. 362, p. 132114, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132114>
- Liu J, Danneels B, Vanormelingen P, Vyverman W. Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae Klebsormidium sp., Stigeoclonium spp. and their communities: From laboratory flask to outdoor algal turf scrubber (ATS). *Water Research*, v. 92, p. 61-68, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.049>
- Liu J, Pemberton B, Lewis J, Scales PJ, Martin GJO. Wastewater treatment using filamentous algae – A review. *Bioresource Technology*, v. 298, p. 122556, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122556>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 265–275, 1951. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lyra FH, Carneiro MTWD, Brandão GP, Pessoa HM, Castro EVR. Determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) using microemulsion as sample preparation. *Microchemical Journal*, v. 96, n. 1, p. 180-185, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.03.005>
- Markou G, Vandamme D, Muylaert K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, v. 65, p. 186–202, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>
- Marques SSI, Nascimento IA, de Almeida PF, Chinalia FA. Growth of Chlorella vulgaris on sugarcane vinasse: The effect of anaerobic digestion pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 171, p. 1933-1943, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0481-y>
- Mitra D, Van Leeuwen J., Lamsal B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous Chlorella vulgaris on industrial co-products. *Algal Research*, v. 1, n. 1, p. 40-48, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.002>
- Montoya T, Gómez J, Mariano M, Jara E, Carrasco N, Tarazona R et al. Comunidades aeroterrestres de la microalga Klebsormidium (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) en costras biológicas del desierto costero peruano. *Arnaldoa*, v. 26, n. 3, p. 1105-1124, 2019. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.263.26317>
- Oliveira O, Giancesella S, Silva V, Mata T, Caetano N. Lipid and carbohydrate profile of a microalga isolated from wastewater. *Energy Procedia*, v. 136, p. 468–473, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.305>
- Patel AK, Vadrale AP, Singhania RR, Michaud P, Pandey A, Chen, SJ. et al. Algal polysaccharides: current status and future prospects. *Phytochemistry Reviews*, v. 22, p. 1167–1196, 2023. [doi:10.1007/s11101-021-09799-5](https://doi.org/10.1007/s11101-021-09799-5)
- Ramirez NNV, Farenzena M, Trierweiler JO. Growth of microalgae Scenedesmus sp. in ethanol vinasse. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 5, p. 630-635, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201401791>
- Renewable Fuels Association (RFA). Annual Ethanol Production. Washington, D.C.: RFA, 2024. Available at: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>. Accessed on: Feb. 20, 2024.
- Rodrigues DB, Flores EMM, Barin JS, Mercadante AZ, Jacob-Lopes E, Zepka LQ. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, v. 65, p. 144–148, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.037>
- Santana H, Cereijo CR, Teles VC, Nascimento RC, Fernandes MS, Brunale P. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. *Bioresource Technology*, v. 228, p. 133-

- 140, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>
- Santos RR, Araújo ODQF, Medeiros JL, Chaloub RM. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresource Technology*, v. 204, p. 38-48, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.077>
- Sathasivam R, Radhakrishnan R, Hashem A, Abd Allah EF. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 26, n. 4, p. 709-722, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>
- Silva AS, Griebeler NP, Borges LC. 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.
<https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014>
- Singh AK, Sharma N, Farooqi H, Abdin MZ, Mock T, Kumar S. Phycoremediation of municipal wastewater by microalgae to produce biofuel. *International Journal of Phytoremediation*, v. 19, n. 9, p. 805-812, 2017.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1284758>
- Siqueira JC, Braga MQ, Ázara MS, Garcia KJ, Alencar SNM, Ramos TS, Siniscalchi LAB, Assemany PP, Ensinas AV. Recovery of vinasse with combined microalgae cultivation in a conceptual energy-efficient industrial plant: Analysis of related process considerations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 155, p. 111904, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111904>
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.
<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stein J. *Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements.* Cambridge University Press, 448 p., 1973.
- Strickland JDH, Parsons TR. *A practical handbook of seawater analysis.* Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, 310p., 1972.
- Syaichurrozi I, Jayanudin J. Effect of tofu wastewater addition on the growth and carbohydrate-protein-lipid content of *Spirulina platensis*. *International Journal of Engineering*, v. 30, n. 11, p. 1631-1638, 2017.
<https://doi.org/10.5829/ije.2017.30.11b.02>
- Tawfik A, Ismail S, Elsayed M, Qyyum MA, Rehan M. Sustainable microalgal biomass valorization to bioenergy: key challenges and future perspectives. *Chemosphere*, v. 296, p. 133812, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133812>
- Valderrama LT, Del Campo CM, Rodriguez CM, de Bashan LE, Bashan Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*, v. 36, n. 17, p. 4185-4192, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00143-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00143-4)
- Wang Y, Guo W, Yen HW, Ho SH, Lo YC, Cheng CL, Ren N, Chang JS. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology*, v. 198, p. 619-625, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.067>
- Zhang L, Cheng J, Pei H, Pan J, Jiang L, Hou Q et al. Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. *Renewable Energy*, v. 115, p. 276-287, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.08.034>
- Zheng S, He M, Jiang J, Zou S, Yang W, Zhang Y et al. Effect of kelp waste extracts on the growth and lipid accumulation of microalgae. *Bioresource Technology*, v. 201, p. 80-88, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.038>
- Znad H, Al Ketife AMD, Judd S, AlMamani F, Vuthaluru, HB. Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, v. 110, p. 1-7, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.10.008>