



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**Triagem baseada na pegada metabólica de cepas
de microalgas para a biorremediação de vinhaça
de cana-de-açúcar**

Bruno Costa Val de Melo

Brasília - DF

2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA - PPGBOT

BRUNO COSTA VAL DE MELO

**Triagem baseada na pegada metabólica de cepas
de microalgas para a biorremediação de vinhaça
de cana-de-açúcar**

Dissertação de mestrado
apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Mestre em
Botânica pelo Programa de Pós-
Graduação em Botânica - PPGBOT
da Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Brasília – DF

2023

“Souls cross ages like clouds cross skies, an'
tho' a cloud's shape nor hue nor size don't
stay the same, it's still a cloud an' so is a soul.
Who can say where the cloud's blowed from
or who the soul'll be 'morrow?”

— **David Mitchell, Cloud Atlas**

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams, pela orientação e dedicação em instruir a mim e seus alunos de maneira sempre compreensiva; aos pesquisadores Dr. Luiz Fernando Roncaratti Júnior e Dra. Letícia Jungmann Cançado, pela colaboração e por sempre fornecerem idéias para aprimorar os experimentos.

Ao CNPq pelo apoio e financiamento do projeto.

Às minhas colegas, Mariana Machado de Castro e Letícia Barbosa de Oliveira, pela companhia e ajuda na rotina do laboratório, compartilhando sucessos e perrengues comigo na jornada da pós-graduação.

Aos estagiários Clara Katharina Vaz da Silva, Ana Luísa Kruschewsky da Paz, João Vítor Vieira Barros, Leonardo Coutinho da Silva Pereira, Márcio Marques de Paula, Maria Eduarda Chaves Ribeiro, Ariane Leandro Souto e Lucas Gasparotto de Castro pelo esforço, dedicação e trabalho em equipe nas atividades de laboratório. Com a ajuda de vocês, análises que demorariam semanas para serem concluídas duraram apenas dias.

À minha família, especialmente ao meu pai, Luiz Carlos de Melo Júnior, meus avós, Alice Caminha Lustosa de Melo e Luiz Carlos de Melo, e meus irmãos, Carlos Eduardo e Izadora, por serem meu porto seguro, por sempre torcerem por mim, me ouvirem e me amarem incondicionalmente.

Aos meus amigos de Brasília, Filipe Vieira Barbalho, Hélio Santana da Silva Júnior, Hugo Lins de Albuquerque Vieira, Aluísio Oliveira de Paula, e Gabriel Barros Arcadepani, que acompanharam minha jornada de perto, proporcionando momentos de apoio, descontração e Inovação.

À minha psicóloga Adriana, e ao meu psiquiatra Rafael, pela ajuda nos momentos mais difíceis, por confiarem em mim e me ensinarem a confiar em mim mesmo.

E em lembrança de Christiane Chaves Costa de Melo: minha mãe. Desde criança carrego em mim uma chama de emoções que, durante muito tempo, não soube de onde vinha. Hoje, gosto de imaginar que herdei isso de ti, e, pouco a pouco, venho aprendendo a dar voz a essas emoções. Você está e estará comigo em todos os momentos.

Obrigado, Mãe.

RESUMO

A vinhaça de cana-de-açúcar é um dos principais efluentes produzidos nas destilarias de etanol com cerca de 300 bilhões de litros produzidos anualmente no Brasil. Embora altamente poluente, sua diversidade de compostos orgânicos e nutrientes a torna uma matéria-prima com potencial para uso em biorrefinarias, com o objetivo de simultaneamente remediar esse efluente e produzir biomassa algal de alto valor agregado. Neste estudo, foram realizadas triagens com dez cepas de microalgas da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicadas à Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio), localizada na Embrapa Agroenergia (DF, Brasil), que foram avaliadas quanto à sua capacidade de crescer em vinhaça e de consumir seus componentes orgânicos e inorgânicos, resultando em sua remediação. Em seguida, as cepas Embrapa|LBA39 e Embrapa|LBA40 foram selecionadas para o cultivo em fotobiorreatores automatizados (FBRs). As triagens foram acompanhadas diariamente com base em medições de densidade óptica (DO). Análises comparativas de *metabolite footprint* foram realizadas utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM) entre amostras coletadas no dia 0 e em diferentes dias de cultivo. Essas técnicas foram capazes de detectar, respectivamente, o teor de seis íons (cloreto, nitrato, malato, sulfato, fosfato e citrato), além de mais de 50 moléculas orgânicas, incluindo uma série de ácidos orgânicos, aminoácidos, álcoois, ácidos graxos e açúcares. Todas as cepas demonstraram indícios crescimento em vinhaça com pH ajustado para 7,0, e os resultados das análises de composição do meio de cultivo indicaram consumo significativo de metabólitos pela cepa Embrapa|LBA40 nas duas triagens realizadas, bem como redução do teor de fosfato em quatro das dez cepas. Esses dados, juntamente com a curva de crescimento de cada microalga, apontam para a seleção das cepas de microalgas Embrapa|LBA39 e Embrapa|LBA40 como candidatos a futuros processos de escalonamento dos volumes de cultivo.

Palavras-chave: vinhaça de cana-de-açúcar, microalgas, biorremediação, biorrefinarias, tratamento de águas residuais

ABSTRACT

Sugarcane vinasse is one of the main effluents produced in ethanol distilleries, with approximately 300 billion liters generated annually in Brazil. Despite being highly polluting, its diversity of organic compounds and nutrients make it a potential raw material for use in biorefineries, with the aim of simultaneously remediating this effluent and producing high-value-added algal biomass. In this study, screenings were conducted with ten strains of microalgae from the Collection of Microorganisms and Microalgae Applied to Agroenergy and Biorefineries (CMMAABio), located at Embrapa Agroenergy (DF, Brazil). These strains were evaluated for their ability to grow in vinasse and consume its organic and inorganic components, resulting in its remediation. Subsequently, the strains Embrapa|LBA39 and Embrapa|LBA40 were selected for cultivation in automated photobioreactors (PBRs). The screenings were monitored daily based on optical density (OD) measurements. Comparative metabolic footprint analyses were performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) techniques among samples collected on day 0 and on different cultivation days. These techniques were able to detect the content of six ions (chloride, nitrate, malate, sulfate, phosphate, and citrate), as well as more than 50 organic molecules, including a variety of organic acids, amino acids, alcohols, fatty acids, and sugars. All strains showed indications of growth in vinasse with a pH adjusted to 7.0, and the results of the medium composition analyses indicated significant consumption of metabolites by the Embrapa|LBA40 strain in both screenings, as well as a reduction in phosphate content in four out of the ten strains. These data, along with the growth curve of each microalgae, point towards the selection of microalgae strains Embrapa|LBA39 and Embrapa|LBA40 as candidates for future scaling-up processes.

Keywords: sugarcane vinasse, microalgae, bioremediation, biorefineries, wastewater treatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de crescimento da cepa LBA39 em duas concentrações de vinhaça.....	26
Figura 2. Curvas de crescimento da cepa LBA39 em vinhaça sob pré-tratamentos.	27
Figura 3. Triagem 1: curva de crescimento das dez cepas de microalgas em vinhaça (pH 7,0).	28
Figura 4. Triagem 1: taxas de crescimento das cepas de microalgas cultivadas em vinhaça (pH 7,0)	28
Figura 5. Triagem 2: curva de crescimento das dez cepas de microalgas em vinhaça (pH 7,0).	29
Figura 6. Triagem 2: taxas de crescimento das cepas de microalgas cultivadas em vinhaça (pH 7,0).	29
Figura 7. Triagem 1: concentrações de íons do meio de cultivo a base de vinhaça.....	30
Figura 8. Triagem 2: concentrações de íons no meio de cultivo a base de vinhaça.....	32
Figura 9. Concentrações de íons obtidas a partir de análises espectrofotométricas de amostras da Triagem 2.	34
Figura 10. Triagem 1: Mapa de calor das alterações nos níveis extracelulares de compostos orgânicos.....	36
Figura 11. Triagem 2: Mapa de calor das alterações nos níveis extracelulares de metabólitos (dias 0 e 10).	38
Figura 12. Triagem 2: Mapa de calor das alterações nos níveis extracelulares de metabólitos (dias 0 e 20).	39
Figura 13. Densidade óptica dos cultivos de LBA39 nos dias 0 e 10.	40
Figura 14. Densidade óptica dos cultivos de LBA40 nos dias 0 e 11.	41
Figura 15. Cultivos de LBA40 realizado em fotobiorreatores (FBRs).	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas de pré-tratamento utilizadas na literatura para favorecimento da produção de biomassa algal.	15
Tabela 2. Caracterização físico-química da vinhaça bruta utilizada nos experimentos.....	18
Tabela 3. Identificação molecular das cepas de microalgas utilizadas na triagem.	19
Tabela 4. Composição do meio BG-11, utilizado para o cultivo de microalgas	19
Tabela 5. Gradiente Multi-step adotado nas corridas de CLAE.....	22
Tabela 6. Ficha técnica de parâmetros utilizados nas análises com kits da empresa Alfakit.....	24
Tabela 7. Rendimento médio de biomassa seca obtida da cepa LBA39, cultivada em vinhaça pré-tratada, em relação ao volume de cultivo coletado..	27
Tabela 8. Concentração de íons nas amostras de meio de cultivo (Vinhaça - pH 7,0) e dos inóculos de microalgas em meio BG-11 utilizados na Triagem 2. ...	33
Tabela 9. Contagem de células após o cultivo das cepas LBA39 e LBA40 em FBRs.	42

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Hipótese.....	17
3. Objetivos.....	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. Materiais e métodos.....	18
4.1. Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar bruta.....	18
4.2. Cepas de microalgas.....	18
4.3. Cultivo de LBA39 em diferentes concentrações de vinhaça.....	20
4.4. Cultivo de LBA39 em vinhaça sob diferentes pré-tratamentos.....	20
4.5. Triagem das dez cepas de microalgas em vinhaça com pH ajustado para 7,0.....	21
4.6. Cultivo das cepas LBA39 e LBA40 em fotobiorreatores (FBRs).....	24
4.7. Análise estatística.....	25
5. Resultados.....	25
5.1. Curvas de crescimento de LBA39 em vinhaça.....	25
5.2. Triagem de microalgas.....	27
5.3. Análises de íons extracelulares.....	30
5.4. Análises de pegada metabólica baseada em CG-EM.....	34
5.5. Cultivo das cepas LBA39 e LBA40 em FBRs.....	40
6. Discussão.....	45
6.1. Crescimento das microalgas em vinhaça.....	45
6.2. Metabolismo de íons provenientes da vinhaça.....	46
6.3. Análises de pegada metabólica.....	48
6.4. Cultivo de microalgas em FBRs.....	50

7. Conclusões	50
8. Referências bibliográficas.....	51

1. Introdução

As microalgas constituem um grupo diverso de microrganismos do qual mais de 25.000 espécies já foram isoladas e identificadas (Vale et al., 2020). São indivíduos fotossintetizantes unicelulares ou multicelulares que habitam principalmente ambientes aquáticos, sendo fontes primárias de cadeias alimentares para mais de 70% da biomassa global (Singh e Saxena, 2015) e, ainda, importantes agentes no processo de captura de dióxido de carbono atmosférico através da fotossíntese.

Esse grupo inclui organismos tanto procarióticos, do filo Cyanobacteria, quanto eucarióticos, pertencentes a diferentes linhagens evolutivas não relacionadas, como o supergrupo TSAR (telonemids, stramenopiles, alveolata, e Rhizaria), e os clados Haptista, Cryptista, Excavata (Euglenida), e, por fim, Archaeplastida, que abrange os filios Glaucophyta, Rhodophyta e Chlorophyta (Burki et al., 2020). Microalgas desse último filo, informalmente referido como algas verdes, compartilham diversas semelhanças com as plantas terrestres, como cloroplastos envolvidos em uma membrana dupla, tilacóides agrupados em lamelas, presença de clorofilas a e b e uso do amido como polissacarídeo de reserva (Leliaert et al., 2012; Sluiman, 1985). Esses indivíduos compõem juntos o reino Viridiplantae.

As diversidades fisiológicas e bioquímicas pertinente às microalgas as tornam alvos de estudo para interesse econômico, devido à variedade de proteínas, lipídios, metabólitos secundários, carotenóides e vitaminas que são capazes de produzir (Priyadarshani e Rath, 2012). Essas características motivam pesquisadores a investigarem novas aplicações biotecnológicas para gerar produtos a partir do cultivo de biomassa algal.

Na indústria alimentícia, o cultivo de microalgas apresenta um potencial para a produção de suplementos com alto valor proteico utilizados na nutrição humana e animal, além de pigmentos e corantes naturais (Spolaore et al., 2006). Além disso, técnicas de engenharia genética mostram-se promissoras na obtenção de uma série de metabólitos com atividades farmacológicas, como antimicrobianos, bloqueadores neuromusculares e antígenos vacinais (Borowitzka, 1995; Priyadarshani e Rath, 2012).

O uso da biomassa desses microrganismos também se aplica à produção de biofertilizantes para a agricultura, devido a seus altos níveis de nitrogênio e fósforo, e também por desempenharem um papel importante na prevenção contra a erosão do solo (Renuka et al., 2015). Por fim, ainda são estudadas abordagens para produção de etanol de terceira geração e biodiesel, onde a técnica de limitação por nitrogênio durante o crescimento algal tem se mostrado eficaz no acúmulo de carboidratos e lipídios por esses organismos (Silva e Bertucco, 2019).

Apesar da vasta aplicabilidade do cultivo de microalgas, sua viabilidade econômica para produção de biomassa em larga escala ainda não foi alcançada (Brasil et al., 2016), o que limita sua utilização apenas para produtos de maior valor agregado. Uma alternativa para diminuir custos no cultivo é a obtenção de fontes baratas de CO₂, água e nutrientes (Santana et al., 2017). Muitos efluentes agroindustriais costumam atender tais critérios, por possuírem altos teores de matéria orgânica, vitaminas e sais minerais (Rawat et al., 2016). Devido a tais características, esses efluentes representam risco ao meio ambiente e requerem a realização de tratamentos antes de retornarem a cursos de água (Pacheco et al., 2015).

A vinhaça de cana-de-açúcar é o principal efluente gerado pela indústria sucroalcooleira, produzida numa proporção de 10 a 15 L para cada litro de etanol (Christofolletti et al., 2013). Com base no levantamento do CONAB (2023), a safra de 2022/23 produziu 27,4 bilhões de litros de etanol, o que leva à estimativa de 330 bilhões de litros de vinhaça gerados nesse período. Trata-se de uma solução ácida e de cor escura, rica em compostos orgânicos de baixo peso molecular, como ácidos, álcoois, açúcares e glicerol, além de íons, como: NO₃⁻, PO₄³⁻, Cl⁻, Na⁺, K⁺ e Mg²⁺ (Botelho et al., 2013). Devido a essa composição, o descarte inadequado de vinhaça pode provocar desequilíbrio em ecossistemas aquáticos, resultando na eutrofização de mananciais e cursos d'água (Da Silva et al., 2007). A fim de reduzir os impactos gerados, a vinhaça tem sido utilizada na fertirrigação de canaviais como substituto de fertilizantes químicos, o que, apesar de ter demonstrado maiores rendimentos na produção, ainda apresenta riscos a fontes de água subterrâneas (Christofolletti et al., 2013).

Em frente ao cenário de produção em larga escala desse efluente, seu uso como meio de cultivo para microalgas é uma alternativa promissora, capaz de não somente tratar o resíduo como gerar produtos de valor agregado à escala de produção de etanol (Rawat et al., 2016). A capacidade de assimilar macro e micronutrientes de diversas fontes (Ma et al., 2022) faz desses microrganismos ótimos candidatos para o tratamento da vinhaça, sendo possível gerar diversos produtos a partir de biomassa microalgal.

O uso desse efluente como base para meio de cultivo algal já foi relatado por diversos autores, demonstrando bons potenciais no crescimento de cepas como *Chlamydomonas biconvexa*, *Micractinium* sp. (Santana et al., 2017), *Chlorella vulgaris* (Candido e Lombardi, 2015; Quintero-Dallos et al., 2019), *Neochloris oleoabundans* (Olguín et al., 2015) e *Scenedesmus* sp. (Ramirez et al., 2014). Por outro lado, esses estudos também relatam limitações no uso de vinhaça bruta para o cultivo. O pH baixo característico, entre 3,8 e 4,7, assim como a alta carga de compostos orgânicos como fenóis e melanoidinas, pode estar relacionado com a inibição do crescimento de microalgas (Falconí et al., 2020), assim como a contaminação do cultivo por outros organismos (Santana et al., 2017). Portanto, a adoção de estratégias de pré-tratamento para a vinhaça é uma etapa de grande importância para um cultivo bem-sucedido. Na Tabela 1, são sumarizados alguns dos métodos adotados por pesquisadores para tratar vinhaça em ensaios de crescimento com microalgas.

Para que seja possível associar a remediação de efluentes a uma produção de biomassa algal em escalas maiores, é necessária a escolha de um pré-tratamento de baixo custo e que seja passível de ser escalonado. Métodos como o de centrifugação são limitados à escala de laboratório (Saavedra et al., 2017), sendo um processo oneroso se aplicado a grandes volumes de meio de cultura (Brasil et al., 2016).

Tabela 1. Técnicas de pré-tratamento utilizadas na literatura para favorecimento da produção de biomassa algal.

Cepas de microalgas	Meio	Pré-tratamento	Resultados	Referência
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vinhaça bruta diluída, vinhaça tratada diluída	Filtração com argila e carvão ativado	Redução da turbidez e aumento de pH no meio; não foi observado crescimento em vinhaça bruta diluída	Candido et al., 2015
<i>Scenedesmus</i> sp.	Meio Guillard modificado com diferentes concentrações de vinhaça	—	Melhores taxas de crescimento foram obtidas com até 40% de vinhaça; maior intensidade luminosa contribuiu para o crescimento em concentrações maiores	Ramirez et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vinhaça biodigerida em diluições de 10% - 50%	Biodigestão, sedimentação e filtração (filtro de papel)	Maior crescimento foi observado com 50% de diluição; remoção substancial de amônia e fosfato	Trevisan et al., 2020
<i>Chlamydomonas biconvexa</i> e <i>Micractinium</i> sp.	Vinhaça bruta e clarificada 100% ou 50% diluída	Centrifugação; clarificação com Ca(OH) ₂	Ambas as cepas cresceram em vinhaça bruta; remoção significativa de N	Santana et al., 2017
<i>Scenedesmus bajacalifornicus</i> ; selecionada de uma triagem de 10 cepas	Vinhaça diluída em água deionizada (50%; 75% e 100%)	Centrifugação; Ozonização	Aumento de 20,5% na produção de biomassa; redução expressiva da carga orgânica e inorgânica do meio	Falconí et al., 2020
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Vinhaça não diluída	Eletrocoagulação	Remoção de 66% de carbono orgânico total após o tratamento com eletrodo de alumínio seguido do cultivo	Saavedra et al., 2017

De acordo com Falconí e colaboradores (2020), o pré-tratamento com gás ozônio aspergido no meio a base de vinhaça se mostrou um método eficiente na diminuição dos níveis de compostos fenólicos e de contaminação por outros microrganismos, o que permitiu uma maior produtividade da cepa de

Scenedesmus bajacalifornicus em seu estudo. O uso de ozônio é, também, relatado no tratamento de resíduos industriais em larga escala (Silva e Jardim, 2006), o que reforça sua eficiência na redução de custos em diversas indústrias se comparado a tratamentos convencionais (Rice, 1996).

Outro ponto crucial para a produção de biomassa em larga escala é a escolha da cepa, pois se sabe que nem toda microalga é capaz de se desenvolver em condições adversas como aquelas observadas na vinhaça (Santana et al., 2017). Sob esse aspecto, muitos estudos realizam etapas de triagem entre um grupo de cepas para selecionar aquelas que demonstrem sinais de crescimento conforme os parâmetros pré-determinados (Candido et al., 2022; Ördög et al., 2004; Sydney et al., 2011). Dessa forma, essa abordagem pode ser empregada para avaliar a capacidade de remediação do resíduo de cana de açúcar através das respostas metabólicas que esses microrganismos apresentam em relação aos componentes da vinhaça.

O consumo ou síntese desses componentes extracelulares pode ser avaliado através da análise de *metabolite footprint*. Esse termo representa uma área de estudo dentro da metabolômica especializada no padrão de metabólitos encontrados no meio de cultivo e possui uma vasta aplicabilidade na tecnologia de bioprocessos (Mapelli et al., 2008). Algumas das suas aplicações incluem a identificação de moléculas de interesse em diferentes estágios de cultivo (Sun et al., 2021), caracterização de cepas de microrganismos em estudos de genômica funcional (Allen et al., 2003) e o monitoramento de contaminações microbianas (Sue et al., 2011). Portanto, o panorama de metabólitos e íons inorgânicos, bem como a variação nos níveis destes no decorrer do cultivo de microalgas pode fornecer informações relevantes sobre a capacidade de remediação da vinhaça que essas cepas apresentam.

Visando contribuir para a viabilidade desse processo em larga escala, o estudo presente realizou uma triagem de dez cepas de microalgas isoladas de diferentes regiões do território brasileiro cultivadas em meio de cultivo a base de vinhaça, buscando identificar aquelas que demonstram boa capacidade de consumo de matéria orgânica e nutrientes do meio de cultivo, além de

favorecer o crescimento algal utilizando técnicas de pré-tratamento que sejam economicamente passíveis de serem escalonadas.

2. Hipótese

As taxas de crescimento resultantes do cultivo das cepas estão diretamente relacionadas com a capacidade de aquisição de nutrientes e compostos orgânicos provenientes da vinhaça.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Identificar cepas de microalgas com altas taxas de crescimento relacionadas à capacidade de remoção de nutrientes e compostos orgânicos dos meios de cultura formulados com vinhaça.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Adotar métodos para permitir um bom desempenho do crescimento das cepas e evitar contaminações por possíveis microrganismos indesejados.
- 2) Acompanhar periodicamente o desenvolvimento dos cultivos para a elaboração da curva de crescimento de cada cepa.
- 3) Identificar possíveis variações nos níveis de compostos orgânicos e nutrientes.
- 4) Analisar as taxas de crescimento de cada cepa, relacionando-as com os dados de composição do meio de cultura para selecionar microalgas com melhores desempenhos.

4. Materiais e métodos

4.1. Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar bruta

A vinhaça bruta (pH 3,8) utilizada nos experimentos foi fornecida pela usina de etanol Jalles Machado (Goianésia/GO) e armazenada em refrigerador a -20 °C. Seus parâmetros físico-químicos foram determinados pela empresa Soloquímica e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização físico-química da vinhaça bruta utilizada nos experimentos.

Parâmetros	Resultados	Unidades	Referências
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO)	30,2	mg L ⁻¹	SMEWW 5210 B
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	10,2	mg L ⁻¹	SMEWW 5220 B
Nitrogênio Amoniacal (NH ³⁺)	0,28	mg L ⁻¹	USEPA 3015A; SMEWW 4500 NH3 C e D
Nitrato (NO ³⁻)	0,228	mg L ⁻¹	SMEWW 4110 B
Nitrito (NO ²⁻)	<0,001	mg L ⁻¹	SMEWW 4110 B
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	<0,001	mg L ⁻¹	SMEWW 4110 PO4-B
Potássio Total (K ⁺)	849,080	mg L ⁻¹	USEPA 3015A; SMEWW 3120 B
Sólidos Totais	32,105	mg L ⁻¹	SMEWW 2540 B e E
Sólidos Fixos	10,205	mg L ⁻¹	SMEWW 2540 B e E
Sólidos Voláteis	21,9	mg L ⁻¹	SMEWW 2540 B e E
Sólidos Suspensos	<0,001	mg L ⁻¹	SMEWW 2540 D

4.2. Cepas de microalgas

Dez linhagens de microalgas do filo Chlorophyta (Tabela 3) da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio) da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária – Embrapa (Brasília/DF) foram cedidas para os experimentos, sendo todas isoladas de diferentes biomas do território brasileiro. Hadi e colaboradores (2016) realizou a

identificação molecular das cepas, baseada no sequenciamento de marcadores Internal Transcript Sequence (ITS) 1 e 2 e no gene da subunidade grande da Ribulose Bisfosfato Carboxilase (rbcl).

Tabela 3. Identificação molecular das cepas de microalgas utilizadas na triagem.

Cepa	Identificação
Embrapa LBA6	Microalga da família Chlorococcaceae
Embrapa LBA28	Microalga da família Selenastraceae
Embrapa LBA30	<i>Desmodesmus</i> sp.
Embrapa LBA32	<i>Micractinium</i> sp.
Embrapa LBA39	<i>Chlorella sorokiniana</i>
Embrapa LBA40	<i>Chlamydomonas biconvexa</i>
Embrapa LBA45	Microalga da família Chlorococcaceae
Embrapa LBA46	<i>Uronema tretonense</i>
Embrapa LBA47	Microalga da família Dunaliellaceae
Embrapa LBA48	Microalga da família Haematococcaceae

Os cultivos das cepas foram mantidos por meio da repicagem de 2 mL das culturas-mãe para frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio BG-11 autoclavado (Tabela 4) e postos sobre uma mesa agitadora a 110 rpm nas seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C e intensidade luminosa de $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob um regime de 16/8 h claro/escuro.

Tabela 4. Composição do meio BG-11, utilizado para o cultivo de microalgas

Macronutrientes			Micronutrientes		
Reagentes	Concentração		Reagentes	Concentração	
NaNO ₃	1,53	g L ⁻¹	H ₃ BO ₃	2,86	mg L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	40	mg L ⁻¹	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,08	mg L ⁻¹
MgSO ₄ 7H ₂ O	74	mg L ⁻¹	Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0,05	mg L ⁻¹
EDTA-Na ₂	1,13	mg L ⁻¹	MnCl ₂ 4H ₂ O	1,81	mg L ⁻¹
CaCl ₂ H ₂ O	1,13	mg L ⁻¹	ZnSO ₄	0,22	mg L ⁻¹
Ácido cítrico	36	mg L ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,39	mg L ⁻¹
C ₆ H ₈ FeNO ₇	6	mg L ⁻¹			
Na ₂ CO ₃	6	mg L ⁻¹			

4.3. Cultivo de LBA39 em diferentes concentrações de vinhaça

A cepa Embrapa|LBA39 foi submetida ao cultivo axênico em triplicata ($n = 3$) em meios autoclavados a base de vinhaça em duas concentrações: vinhaça 100% v v⁻¹ (V100%) e vinhaça 50% v v⁻¹, diluída com água destilada ultrapura (V50%). Uma cultura-mãe da cepa em meio BG-11 com densidade óptica (DO) de 1,783 de absorbância (680 nm) foi utilizada como inóculo, representando 20% do volume total dos cultivos (10 mL). O grupo Controle consistiu da mesma proporção de inóculo e meio BG-11 axênico. O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 50 mL dispostos em uma mesa agitadora a 110 rpm durante 8 dias com temperatura a 26 ± 1 °C e intensidade luminosa de $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob um regime de 16/8 h claro/escuro. A DO foi monitorada aproximadamente a cada 24 h através de espectrofotometria a 680 e 750 nm.

4.4. Cultivo de LBA39 em vinhaça sob diferentes pré-tratamentos

A cepa Embrapa|LBA39 foi inoculada em meios de cultura a base de vinhaça pré-tratada adotando metodologias descritas por Falconí et al. (2021) e, em seguida, autoclavada. Os tratamentos consistiram em: vinhaça centrifugada a 7.000 G por 15 min (VC), vinhaça com o pH ajustado para 7,0 com uma solução 1 M de NaOH (VpH), e vinhaça centrifugada e com o pH ajustado sob os mesmos métodos descritos anteriormente (VCpH). O grupo Controle consistiu no cultivo da mesma cepa em meio BG-11 autoclavado. Uma cultura axênica de LBA39 em meio BG-11 com densidade óptica de 1,849 de absorbância (680 nm) foi utilizada como inóculo, representando 20% do volume total dos cultivos (10 mL). Todos os tratamentos e o Controle foram realizados em triplicata ($n = 3$) em frascos Erlenmeyer de 50 mL dispostos em uma mesa agitadora a 110 rpm e o experimento teve 6 dias de duração, nas seguintes condições: temperatura a 26 ± 1 °C e intensidade luminosa de $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob um regime de 16/8 h claro/escuro. O monitoramento da DO dos cultivos foi realizado utilizando espectrofotômetro a 680 e 750 nm.

Após o cultivo, a biomassa algal foi coletada por centrifugação a 10.000 G durante 10 min e o *pellet* lavado com água destilada, este processo foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, O *pellet* foi secado em um liofilizador durante 48 h, obtendo-se biomassa seca, que foi determinada através de pesagem em balança analítica.

4.5. Triagem das dez cepas de microalgas em vinhaça com pH ajustado para 7,0

Dois experimentos de triagem foram conduzidos, onde o primeiro durou 15 dias (Triagem 1) e o segundo, 21 dias (Triagem 2). Foram utilizados como inóculos cultivos axênicos das dez cepas de microalgas (Tabela 3) em meio BG-11, com a DO padronizada para aproximadamente 0,5 (680 nm).

Para a padronização da densidade, cultivos pré-existentes com DO inferior a 0,5 (680 nm) foram concentrados em tubos Falcon estéreis através de centrifugação a 10.000 G por 10 min, seguido da retirada de sobrenadante necessária e ressuspensão manual das células. Já os cultivos com absorbância superior a 0,5 (680 nm) foram diluídos utilizando meio BG-11 autoclavado. Em seguida, a leitura de DO dos inóculos foi realizada novamente para confirmar a padronização.

Após esse processo, as dez cepas foram inoculadas em vinhaça autoclavada e com pH ajustado para 7,0 em uma proporção de 20% do volume total de cultivo (10 mL) e o experimento foi realizado em quadruplicata ($n = 4$) em frascos Erlenmeyer de 50 mL dispostos sobre uma mesa agitadora a 110 rpm durante 21 dias nas seguintes condições: temperatura a 26 ± 1 °C e intensidade luminosa de $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob um regime de 16/8 h claro/escuro. O monitoramento da DO foi realizado diariamente por espectrofotometria a 680 e 750 nm.

4.5.1. Análises de composição do meio extracelular

Alíquotas coletadas dos cultivos nos dias 0 e 6 da Triagem 1, e dos dias 0, 10 e 20 da Triagem 2, foram diluídas 5 vezes em água destilada ultrapura e centrifugadas a 17.000 G durante 30 min. O sobrenadante foi utilizado para as

análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Para as análises de CLAE, 575 μL do sobrenadante foram filtrados com filtros para seringa e transferidos para microtubos de leitura cromatográfica. Os íons presentes nas amostras foram separados através de CLAE de troca iônica Dionex ICS3000 equipado com uma coluna IonPac™ AS11-HC (2 \times 250 mm) a 30 °C, uma guarda IonPac™ AG11-HC (2 \times 50 mm), um supressor a 57 mA e um detector de condutividade a 35 °C. As amostras foram injetadas no aparelho e eluídas em um gradiente Multi-step (Tabela 5) de água destilada (A) e hidróxido de sódio 100 mM (B) a um fluxo de 0,38 mL min⁻¹ por 46 min. Os íons foram identificados a partir da comparação com os tempos de retenção obtidos de padrões puros e a quantificação foi realizada através de curvas de calibração. Esse método permitiu a quantificação dos íons cloreto, nitrato, malato, sulfato, fosfato e citrato nas amostras. A análise dos cromatogramas foi realizada no programa Chromeleon Chromatography Data System (Dionex Corporation, California, USA).

Tabela 5. Gradiente Multi-step adotado nas corridas de CLAE. Os tempos de retenção em que o percentual do eluente B (hidróxido de sódio 100 mM) é alterado estão indicados em minutos.

Retenção (min)	Fluxo (mL min ⁻¹)	%B
0,0	0,38	1,0
8,0	0,38	1,0
18,0	0,38	15,0
28,0	0,38	30,0
38,0	0,38	60,0
39,0	0,38	1,0
46,0	0,38	1,0

A análise de *metabolite footprint* do meio de cultivo por cromatografia gasosa foi realizada com um volume de 25 μL das alíquotas diluídas 5 vezes, às quais foram adicionados 60 μL de um padrão interno, que consiste numa solução de ribitol em etanol a 0,2 mg mL⁻¹ e, em seguida, secadas em um concentrador a vácuo. A derivatização das moléculas extracelulares foi

realizada com a adição de 40 μL de uma solução de hidrocloreto de metoxiamina a 20 mg mL^{-1} em piridina e uma incubação de 2 h a 37 °C em banho seco com agitação, seguida da adição de 70 μL do reagente N-metil-N-[trimetilsilil]trifluoroacetamida (MSTFA) e outra incubação em banho seco por 30 min a 37 °C, conforme método descrito por Lisec et al. (2006). Finalmente, 100 μL do resultado da reação foram transferidos para frascos (vials) de vidro para leitura no aparelho de CG-EM (Agilent Technologies), equipado com uma coluna HP-5MS de 30 m com 0,25 mm de diâmetro e 0,25 μm de espessura do filme. Para a cromatografia gasosa, os seguintes parâmetros foram ajustados: temperatura do injetor de 230 °C, injeção de 1 μL no modo *split* em uma razão de 30:1, temperatura da coluna de 70 °C por 5 min, programada para aumentar 5 °C min^{-1} , até 330 °C. Gás hélio a 0,6 mL min^{-1} foi utilizado como gás de arraste. Para os parâmetros da espectrometria de massa, foram ajustados: temperatura da linha de transferência a 250 °C, temperatura do quadrupolo a 150 °C, temperatura do detector MS a 250 °C. Os espectros foram coletados no modo scan entre 50 e 600 m z^{-1} . Metabólitos foram identificados utilizando o software Chemstation, pela comparação dos espectros de massas com a biblioteca NIST, e comparação dos tempos de retenção obtidos de uma solução de padrões puros dos seguintes analitos: ácido málico, ácido cítrico, lactato de lítio, ácido galacturônico, glicerol, manose, xilose, arabinose, fucose, glicose, sorbitol, sacarose, mio-inositol, rafinose, ramnose, frutose, manitol e trealose. O alinhamento dos cromatogramas foi realizado utilizando o software MetAlign (Lommen, 2009).

4.5.2. Análises espectrofotométricas de nitrato, nitrito e amônia

Alíquotas de 100 μL coletadas dos cultivos nos dias 0, 10 e 21 da Triagem 2 foram diluídas 50 vezes em água destilada ultrapura, até se atingir um volume de 5 mL, e então centrifugadas a 17.000 G durante 30 min. Em seguida, foram utilizados kits comerciais para análise espectrofotométrica fabricados pela empresa Alforkit, adotando metodologias adaptadas de *Organic Reagents for Trace Analysis* (Fries e Getrost, 1977); *Análisis de Trazas: Métodos Fotométricos Comprobados* (Fries, 1971); *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Eaton et al., 2005) e NBR 10560 (1988).

A partir dos 5 mL das amostras diluídas, 1 mL foi utilizado para análise de nitrato, enquanto que as de nitrito e amônia utilizaram 2 mL cada. Os protocolos foram executados com a adição dos reagentes comerciais conforme as instruções contidas nos kits, e analisados em cubetas de vidro em um espectrofotômetro nas especificações descritas para cada análise (Tabela 6).

Tabela 6. Ficha técnica de parâmetros utilizados nas análises com kits da empresa Alfacit.

Nutriente	Método	Fotocolorímetro				Unidade (mg L ⁻¹)	Filtro	Espectro (nm)	Referência
		LQI*	LQS*	Sensib.*					
Nitrato	Brucina	0,1	6,0	-	N-NO ₃	Azul	415	Fries e Getrost (1977)	
Nitrito	Alfanafitilamina	0,03	0,5	-	N-NO ₂	Verde	520	Fries (1971) Eaton et. al	
Amônia	Azul de indofenol	0,1	3,0	-	N-NH ₃	Vermelho	630	(2005); NBR 10560 (1988)	

*LQI: Limite de quantificação inferior, LQS: Limite de quantificação superior, Sensib.: Sensibilidade ou coeficiente angular.

Fonte: Alfacit (2023)

4.6. Cultivo das cepas LBA39 e LBA40 em fotobiorreatores (FBRs)

As cepas Embrapa|LBA39 e Embrapa|LBA40 foram submetidas ao cultivo em vinhaça pré-tratada e autoclavada durante 10 e 11 dias, respectivamente, onde os pré-tratamentos consistiram em: vinhaça com ajuste de pH para 7,0 (VpH) e vinhaça tratada com ozônio por 1 h, seguido de ajuste do pH para 7,0 (VO3). Os meios foram autoclavados em autoclave a 120 °C por 20 min.

Para ozonização, a vinhaça foi espargida com gás ozônio produzido por um gerador com um fluxo de gás de 34 L min⁻¹ e concentração de ozônio de aproximadamente 0,3 g L⁻¹ por 60 min.

Os cultivos das duas cepas foram realizados de forma independente e em quadruplicata (n = 4), onde cada frasco dos FBRs contendo 25 mL de meio de cultura autoclavado foi inoculado com 6 mL de cultivos axênicos da cepas LBA39 e LBA40 em meio BG-11, com DO de 0,434 e 0,484 de absorbância (680 nm), respectivamente. Os cultivos foram conduzidos sob os seguintes parâmetros: regime de 12/12 h claro/escuro, utilizando lâmpadas LED brancas

neutras com irradiância máxima de 5 W m^{-2} , agitação magnética e aeração de aproximadamente $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ de ar atmosférico filtrado por um filtro de seringa PTFE com porosidade de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Sensores ópticos acoplados aos FBRs foram utilizados para detectar o crescimento a cada 5 min, consistindo em uma lâmpada LED branca que emite um feixe luminoso através do cultivo em direção a um sensor de cor TCS34725 para medir a luz espalhada, posicionados a 180° um do outro. Dessa forma, o sensor registra unidades de valor digital (UVD) inversamente proporcionais à quantidade de luz espalhada devido à densidade de microalgas.

Coletas amostradas no início (dia 0) e fim dos experimentos foram utilizadas para registrar dados de crescimento dos cultivos. A densidade óptica das amostras foi medida por espectrofotometria a 680 e 750 nm. Além disso, a contagem de células dos inóculos utilizados e das amostras do final dos cultivos foi feita utilizando uma câmara de Neubauer, com dois quadrantes diferentes para cada réplica utilizando a seguinte equação:

$$\text{Número de células por mL} = \frac{\text{Número de células total}}{\text{Número de quadrantes analisados}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4$$

4.7. Análise estatística

Comparações entre os tratamentos, cepas, e dias de cultivo foram feitas utilizando teste de Tukey com uma significância de $p < 0,05$. Análises estatísticas dos dados de CG-EM foram realizadas na plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) (Xia e Wishart, 2016) e plotados em mapas de calor utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.1.244.

5. Resultados

5.1. Curvas de crescimento de LBA39 em vinhaça

O uso de vinhaça bruta pura (V100%) ou diluída (V50%) como meio de cultura aparenta não ter permitido o crescimento da cepa LBA39, considerando que as densidades ópticas em ambas as condições mantiveram valores similares de absorbância no decorrer dos oito dias de experimento (Figura 1). Em estudos realizados por outros autores, a vinhaça bruta, mesmo em

diluições maiores que 50% v v⁻¹, também se mostrou ineficaz para o desenvolvimento de microalgas (Ramirez et al., 2014; Candido et al., 2015), o que denota a necessidade de um pré-tratamento ao resíduo.

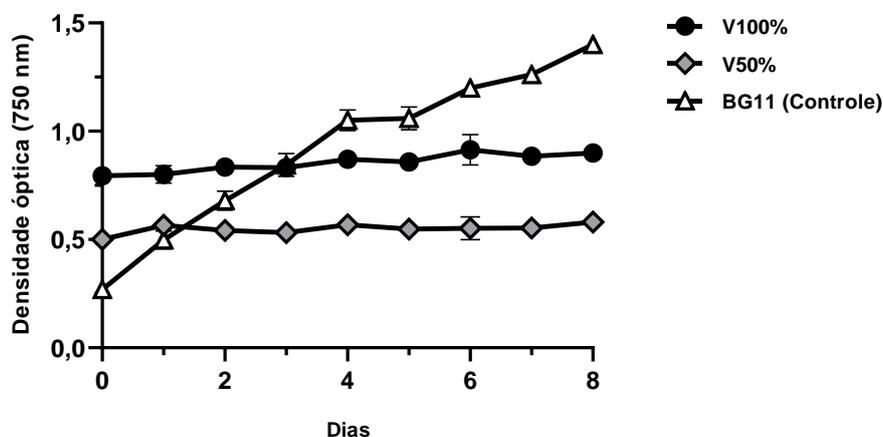


Figura 1. Curvas de crescimento da cepa LBA39 em duas concentrações de vinhaça. Os inóculos foram feitos em: vinhaça bruta (V100%), vinhaça 50% v v⁻¹ diluída com água destilada ultrapura (V50%) e meio BG-11 (Controle). Os resultados estão apresentados como média das três réplicas (n = 3) e ± barras de erro.

De fato, os cultivos de LBA39 feitos em vinhaça pré-tratada revelaram variações significativas no rendimento de biomassa entre os tratamentos (Tabela 7). Os tratamentos que envolveram correção de pH para 7,0 (VpH e VCpH) geraram um teor médio de biomassa seca de 2,93 e 2,88 g L⁻¹, respectivamente, após seis dias de cultivo, valores que foram estatisticamente superiores ao do grupo Controle, que chegou a apenas 0,53 g L⁻¹. Por outro lado, o inóculo feito em vinhaça centrifugada (VC) obteve um rendimento de apenas 0,08 g L⁻¹, o que, somado a sua curva de crescimento (Figura 2), deixa explícito o êxito no ajuste de pH para o cultivo de LBA39.

Mesmo não sendo possível determinar o quanto de massa seca em VpH é proveniente dos sólidos suspensos da vinhaça, o rendimento médio no cultivo em VCpH ajuda a estimar que maior parte das massas secas é referente à biomassa microalgal, visto que, ainda após centrifugação, este atingiu valores próximos aos de VpH (Tabela 7).

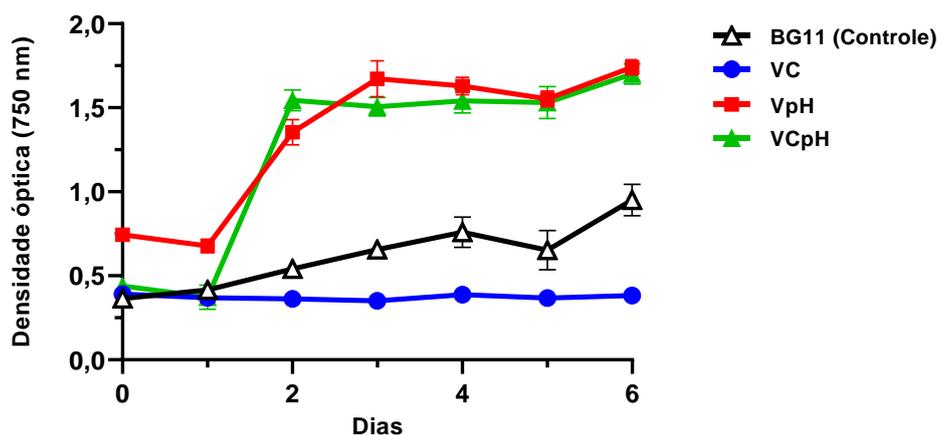


Figura 2. Curvas de crescimento da cepa LBA39 em vinhaça sob pré-tratamentos. Os meios de cultivo foram submetidos aos seguintes tratamentos: vinhaça centrifugada (VC), vinhaça com o pH ajustado para 7 (VpH), vinhaça centrifugada e com o pH ajustado para 7 sob os mesmos parâmetros descritos acima (VCpH) e meio BG-11 (Controle). Os resultados estão apresentados como média das três réplicas (n = 3) e \pm barras de erro.

Tabela 7. Rendimento médio de biomassa seca obtida da cepa LBA39, cultivada em vinhaça pré-tratada, em relação ao volume de cultivo coletado. Os resultados estão apresentados como média das triplicatas (n = 3) \pm erro padrão. Letras indicam diferenças significativas entre tratamentos (p < 0,05) determinados por ANOVA seguido por Teste T de Tukey.

Unidade	VC	VpH	VCpH	BG-11 (Controle)
g L ⁻¹	0,08 ^b \pm 0,04	2,93 ^a \pm 0,12	2,88 ^a \pm 0,18	0,53 ^b \pm 0,06

5.2. Triagem de microalgas

Na Triagem 1, todas as dez cepas demonstraram certo nível de crescimento em vinhaça com ajuste de pH para 7,0 (Figura 3). As maiores taxas de crescimento foram alcançadas pelas cepas LBA6, LBA39 e LBA40, atingindo valores acima de 0,15 d⁻¹ (Figura 4).

Ao sétimo dia de experimento, vários cultivos foram perdidos devido a um incidente mecânico relacionado à mesa agitadora. Os cultivos restantes continuaram sendo acompanhados através de suas DOs, já que pelo menos duas réplicas de cada cepa ainda estavam disponíveis. Porém, a análise química dos meios de cultivo foi realizada apenas entre os dias 0 e 6, para que todas as réplicas das dez cepas pudessem ser analisadas. Devido a essa

perda, uma segunda triagem (Triagem 2) foi realizada, para que pontos mais tardios do crescimento pudessem ser analisados.

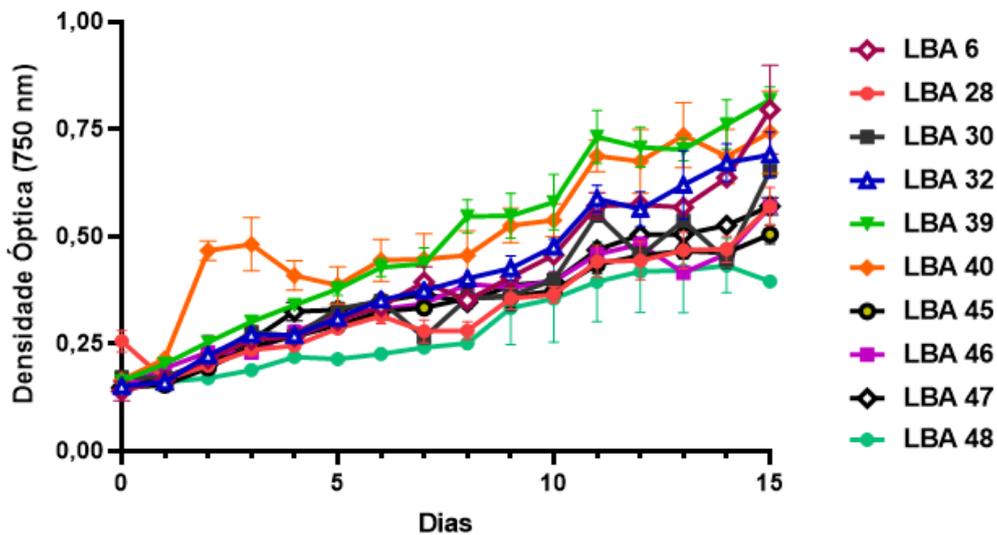


Figura 3. Triagem 1: curva de crescimento das dez cepas de microalgas em vinhaça (pH 7,0). Os resultados estão expressos como média de absorbância das quatro réplicas de cada cepa (n = 4) e ± barras de erro.

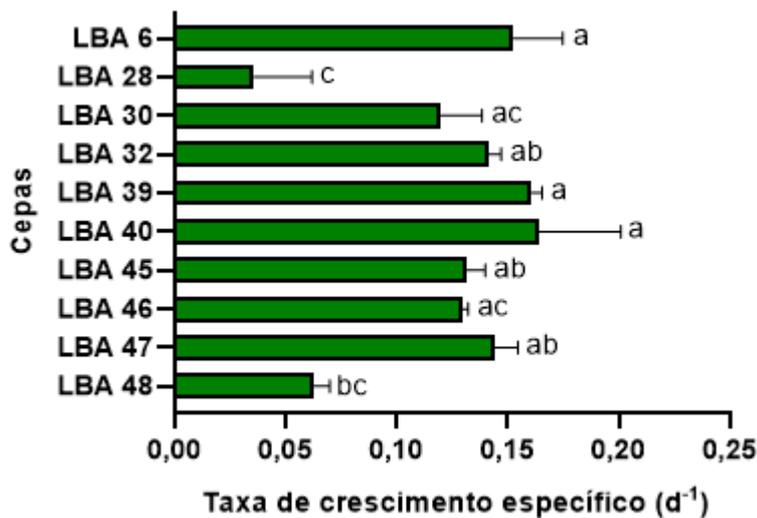


Figura 4. Triagem 1: taxas de crescimento das cepas de microalgas cultivadas em vinhaça (pH 7,0). Os valores foram calculados com base na densidade óptica dos cultivos nos dias 0 e 6. Os resultados estão expressos como média da quadruplicata (n = 4) de cada cepa e as barras indicam erro padrão. Letras ao lado das barras indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05).

As curvas de crescimento das cepas na Triagem 2 foram similares ao experimento anterior. Oito das dez cepas apresentaram crescimento em

vinhaça com ajuste de pH para 7,0, enquanto que os cultivos das cepas LBA47 e LBA48 foram interrompidos no oitavo dia devido à presença de contaminação nas culturas (Figura 5). As cepas LBA6, LBA32, LBA39, LBA40 e LBA45 se destacaram em relação às demais, com taxas de crescimento próximas a 0,15 d⁻¹ (Figura 6).

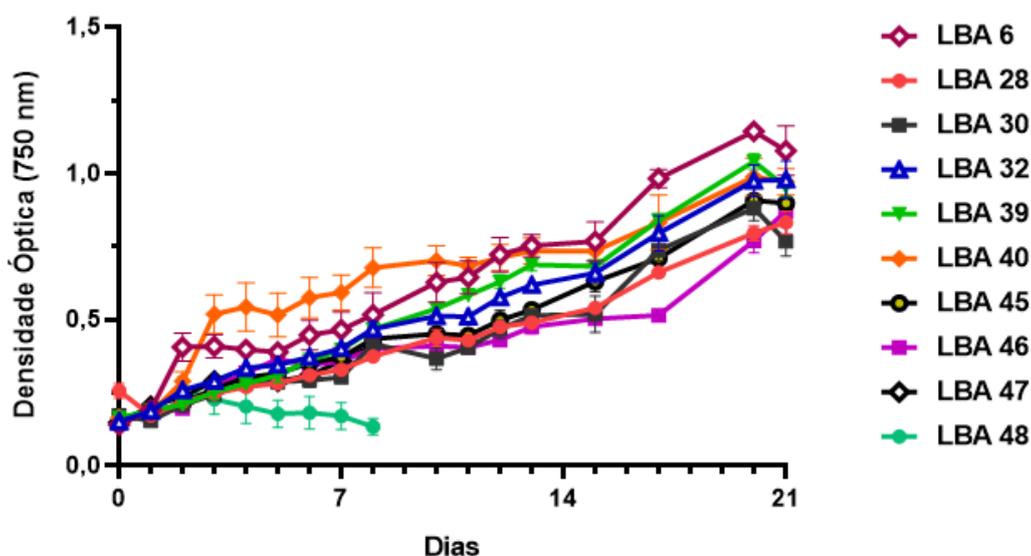


Figura 5. Triagem 2: curva de crescimento das dez cepas de microalgas em vinhaça (pH 7,0). Os resultados estão expressos como média da absorbância das quatro réplicas (n = 4) e ± barras de erro.

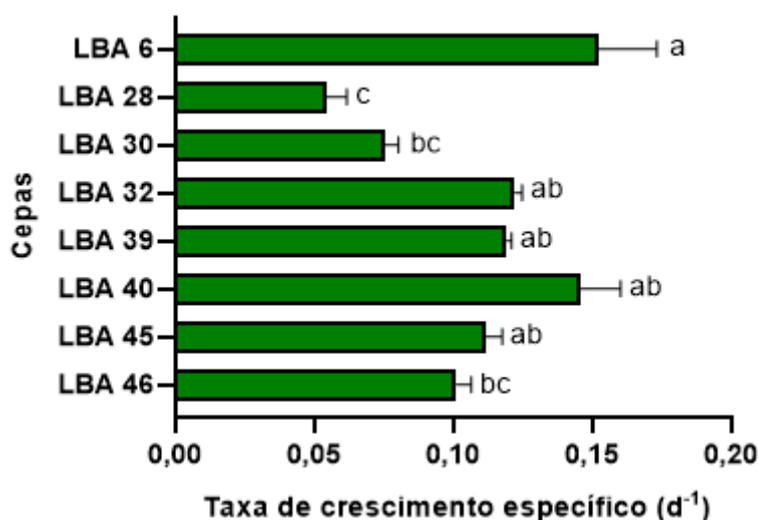


Figura 6. Triagem 2: taxas de crescimento das cepas de microalgas cultivadas em vinhaça (pH 7,0). Os valores foram calculados com base na densidade óptica dos cultivos nos dias 0 e 10. Os resultados estão expressos como média da quadruplicata (n = 4) de cada cepa e as barras indicam erro padrão. Letras ao lado das barras indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05).

5.3. Análises de íons extracelulares

As concentrações dos seis íons identificados por CLAE foram comparadas entre amostras dos dias 0 e 6 de cultivo da Triagem 1 (Figura 7). Nos cultivos das cepas LBA28, LBA32, LBA39 e LBA45, observa-se que a concentração do íon fosfato diminuiu em 51,72%, 64,2%, 58,28% e 69,47%, respectivamente (Figura 7E). Os demais íons não sofreram variações significativas em suas concentrações por nenhuma das cepas.

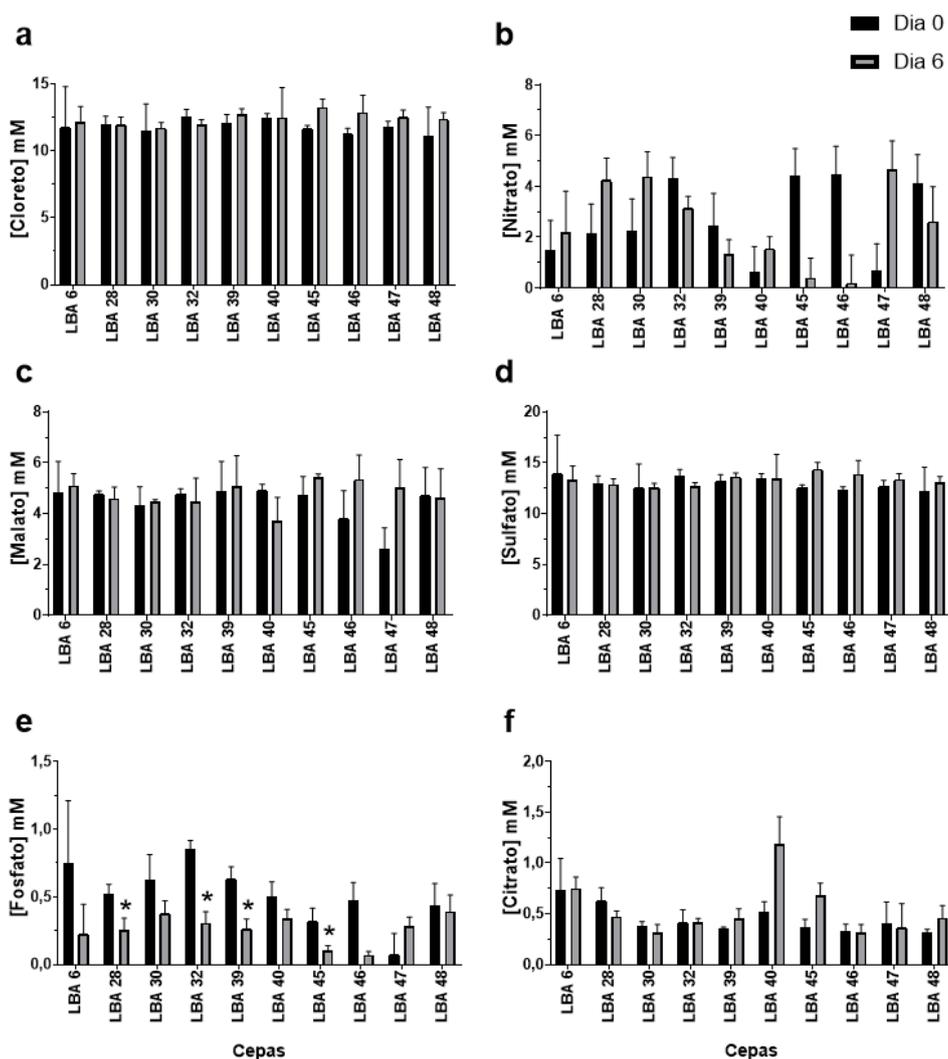


Figura 7. Triagem 1: concentrações de íons do meio de cultivo a base de vinhaça. As colunas indicam as concentrações (mM) de cloreto (a), nitrato (b), malato (c), sulfato (d), fosfato (e) e citrato (f) nos dias 0 e 6 para cada cepa. Os resultados estão apresentados como média das quadruplicatas (n = 4) e barras de erro. Teste-T pareado foi feito comparando o dia 0 com o dia 6 para cada cepa. Variações estatisticamente significativas (p < 0,05) estão indicadas com asterisco (*).

Na Triagem 2, por sua vez, as análises foram realizadas comparando as concentrações de íons dos dias 10 e 20 do experimento em relação ao seu respectivo valor no dia 0 para cada cepa. Variações significativas foram encontradas nos cultivos das seguintes cepas: LBA30, onde se observou diminuição nos níveis de malato; LBA40, que demonstrou um aumento de citrato; LBA45, responsável pela queda no teor de fosfato; e LBA46, que elevou o conteúdo de cloreto e sulfato (Figura 8).

Analisando manualmente os cromatogramas das amostras do dia 20, foi possível confirmar a ausência do pico de nitrato nas quatro réplicas de todas as cepas, com exceção de LBA6. O mesmo ocorreu em relação aos picos de fosfato para as réplicas de LBA30, LBA39 e LBA46, o que indica fortemente o esgotamento desses íons por essas cepas.

Os cultivos de LBA47 e LBA48 não foram analisados, já que estes foram interrompidos antes do décimo dia de experimento, devido à contaminação.

Nas duas triagens, foram observadas discrepâncias na detecção dos picos de nitrato entre as réplicas de várias cepas, o que explica os altos valores de erro obtidos nas análises (Figuras 7B e 8B). O teor desse íon deveria ser relativamente similar entre as réplicas de uma mesma cepa, uma vez que tanto os inóculos quanto o meio utilizado tiveram a mesma origem. Tais inconsistências motivaram uma análise de CLAE de amostras de Vinhaça (pH 7,0) utilizada nos experimentos, e dos inóculos das cepas LBA39 e LBA40 (em meio BG-11), coletadas no dia de início da Triagem 2, seguindo a mesma metodologia adotada nas análises anteriores. A quantificação dos íons é apresentada na Tabela 8. A partir desses dados, é possível inferir que boa parte dos íons nitrato e fosfato disponível para ambas as cepas foi proveniente do inóculo utilizado.

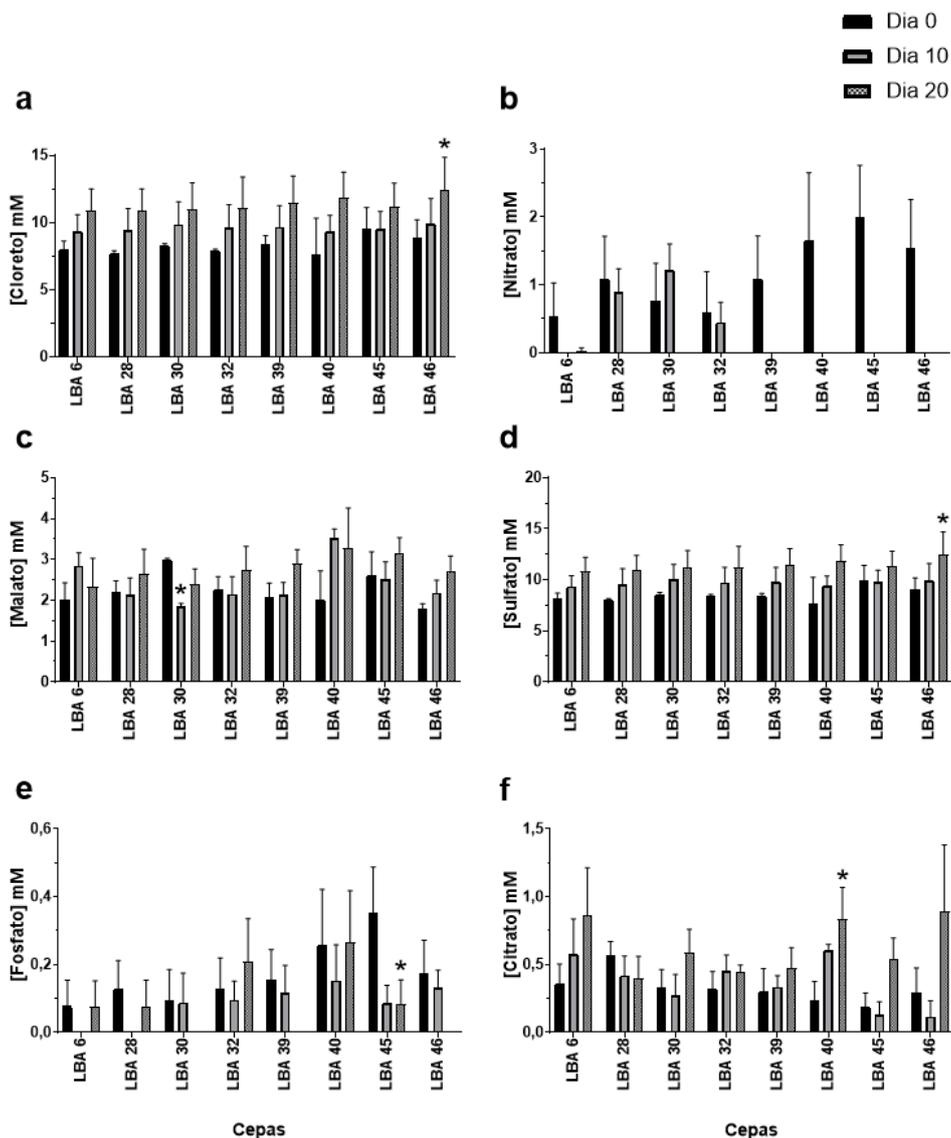


Figura 8. Triagem 2: concentrações de íons no meio de cultivo a base de vinhaça. As colunas indicam as concentrações (mM) de cloreto (a), nitrato (b), malato (c), sulfato (d), fosfato (e) e citrato (f) nos dias 0, 10 e 20 para cada cepa. Os resultados estão apresentados como média das quadruplicatas (n = 4) e barras de erro. Teste-T pareado foi feito comparando o dia 0 com os dias 10 ou 20 para cada cepa. Variações estatisticamente significativas (p<0,05) estão indicadas com asterisco (*).

Além disso, nas duas triagens, os valores iniciais (dia 0) de nitrato, fosfato e citrato variaram entre as cepas (Figuras 7 e 8). Considerando que esses íons são pouco abundantes na vinhaça não inoculada, é sugerido que as suas concentrações variem em função do crescimento das cepas no pré-inóculo (BG-11), o que justifica as diferenças observadas no dia 0.

Tabela 8. Concentração de íons nas amostras de meio de cultivo (Vinhaça - pH 7,0) e dos inóculos de microalgas em meio BG-11 utilizados na Triagem 2. Os resultados estão apresentados como média das triplicatas ($n = 3$) \pm erro padrão.

Amostra	Unidade	Cloreto	Nitrato	Malato	Sulfato	Fosfato	Citrato
Vinhaça (pH 7,0)	mM	13,30 \pm 0,74	0,43 \pm 0,05	3,54 \pm 0,57	13,34 \pm 0,74	0,00 \pm 0,06	1,04 \pm 0,23
LBA 39 (BG-11)	mM	0,58 \pm 0,05	15,79 \pm 0,09	0,54 \pm 0,11	0,42 \pm 0,19	0,19 \pm 0,02	-
LBA40 (BG-11)	mM	0,66 \pm 0,03	16,95 \pm 0,16	0,49 \pm 0,06	0,35 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03	-

Análises espectrofotométricas adicionais foram realizadas com amostras dos dias 0, 10 e 21 da Triagem 2 (Figura 9), com o objetivo de investigar o teor de nitrato, nitrito e amônia nas amostras. Esses três compostos representam possíveis fontes de nitrogênio que podem ocorrer na vinhaça (de Godoi et al., 2019; Reis e Hu, 2017) e que podem ser assimiladas por microalgas verdes (Wollmann et al., 2019).

A partir dos resultados obtidos, as cepas de microalga LBA30, LBA39 e LBA40 apresentaram um aumento significativo no teor de nitrato, ao passo que a cepa LBA46 mostrou uma diminuição deste (Figura 9A). Quanto ao nitrito, todas as oito cepas analisadas demonstraram aumentos superiores a 100% ao final do período de cultivo (Figura 9B). Notavelmente, as cepas LBA30 e LBA46 exibiram uma redução significativa nos níveis de amônia ao décimo dia de cultivo, sugerindo uma capacidade dessas cepas de metabolizá-la, enquanto a cepa LBA32 demonstrou um aumento nos níveis de amônia, indicando uma possível liberação desse composto (Figura 9C).

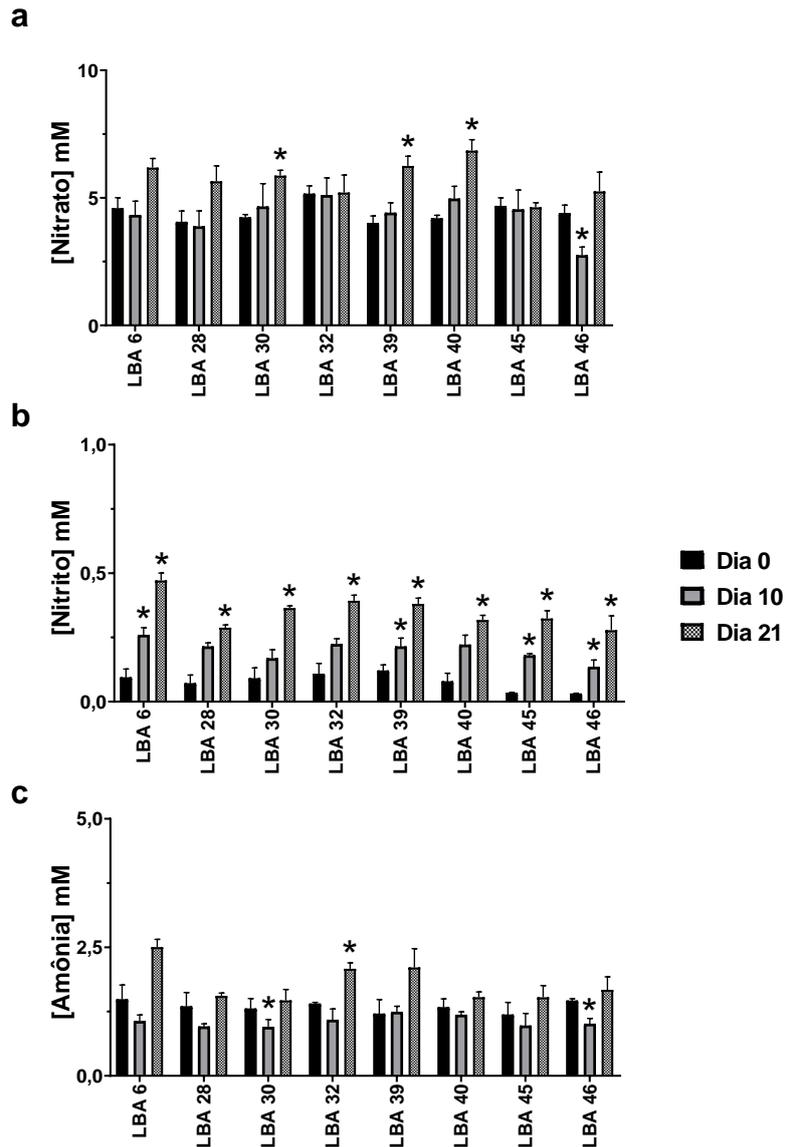


Figura 9. Concentrações de íons obtidas a partir de análises espectrofotométricas de amostras da Triagem 2. As colunas indicam os níveis (mM) de nitrato (a), nitrito (b) e amônia (c) nos dias 0, 10 e 21 para cada cepa. Os resultados estão apresentados como média das quadruplicatas ($n = 4$) e barras de erro. Teste-T pareado foi feito comparando o dia 0 com os dias 10 e 21 para cada cepa. Variações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) estão indicadas com asterisco (*).

5.4. Análises de *metabolite footprint* baseada em CG-EM

Análises da Triagem 1 por CG-EM permitiram a identificação de 31 metabólitos presentes nos meios de cultivo, dentre açúcares, alcoóis e ácidos orgânicos. A Figura 10 mostra a relação de aumento ou decréscimo no teor das moléculas no cultivo de cada cepa entre os dias 0 e 6.

Notavelmente, a cepa que mais apresentou variações significativas foi a LBA40, que consumiu 15 compostos, em sua maioria oligo e monossacarídeos, e elevou os níveis de ácido cítrico, o que foi consistente com as análises por CLAE (Figura 8). Além disso, alguns metabólitos tiveram alterações similares para boa parte das cepas. O ácido glicólico teve sua concentração significativamente reduzida nos cultivos de cinco das dez cepas: LBA28, LBA30, LBA40, LBA45 e LBA46. Sacarose, por sua vez, apresentou aumento em seus níveis pelas cepas LBA28, LBA30, LBA32 e LBA45. Ainda, a queda significativa nos níveis de glicose foi observada por mais da metade das cepas, não ocorrendo apenas nos cultivos das cepas LBA6, LBA46 e LBA48.

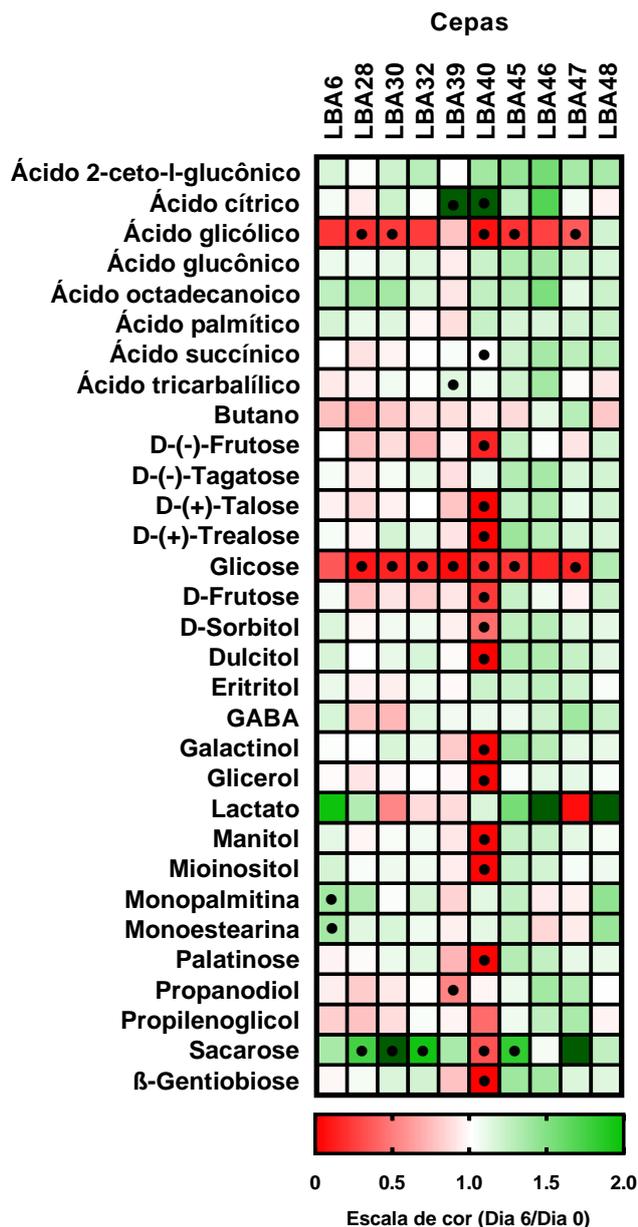


Figura 10. Triagem 1: Mapa de calor das alterações nos níveis extracelulares de compostos orgânicos. A escala de cor indica variações nas áreas dos picos cromatográficos relativos aos metabólitos entre os dias analisados (dia 6 relativo ao dia 0). Diferenças estatisticamente significativas com base em Teste-T pareado ($p < 0,05$) estão indicadas com um ponto preto (*) e valores que excederam a marca de 2,0 na escala de cor estão representados em verde escuro (■).

A avaliação de *metabolite footprint* da Triagem 2 revelou a detecção de 49 metabólitos distintos, muitos dos quais também haviam sido identificados na Triagem 1. Além disso, essa análise foi capaz de identificar metabólitos não encontrados no experimento anterior, incluindo aminoácidos e ácidos graxos.

As comparações entre os estágios iniciais e subsequentes do cultivo (dias 0 e 10) destacaram uma redução significativa em diversos compostos por grande parte das cepas, com uma ênfase particular nos aminoácidos como β -alanina, L-treonina, serina e valina (Figura 11). Assim como na Triagem 1, a LBA40 demonstrou êxito no consumo de moléculas, reduzindo significativamente as concentrações de 19 compostos, em sua maioria, açúcares e aminoácidos. A cepa LBA6, por sua vez, exibiu redução no teor de nove metabólitos distintos.

Ao comparar os dias 0 e 20 dos cultivos, observou-se uma tendência de elevação nas concentrações de moléculas orgânicas extracelulares mais frequente que o suposto consumo das mesmas (Figura 12). De acordo com as análises, os níveis de ácido málico, ácido L-treônico, ácido ribônico e ácido 2-ceto-L-glucônico aumentaram significativamente para mais da metade das cepas.

De maneira geral, através de análises das duas triagens é possível observar variações nas respostas metabólicas entre todas as cepas ao serem inoculadas em vinhaça, e que elas possuem padrões distintos de consumo de moléculas provenientes desse efluente.

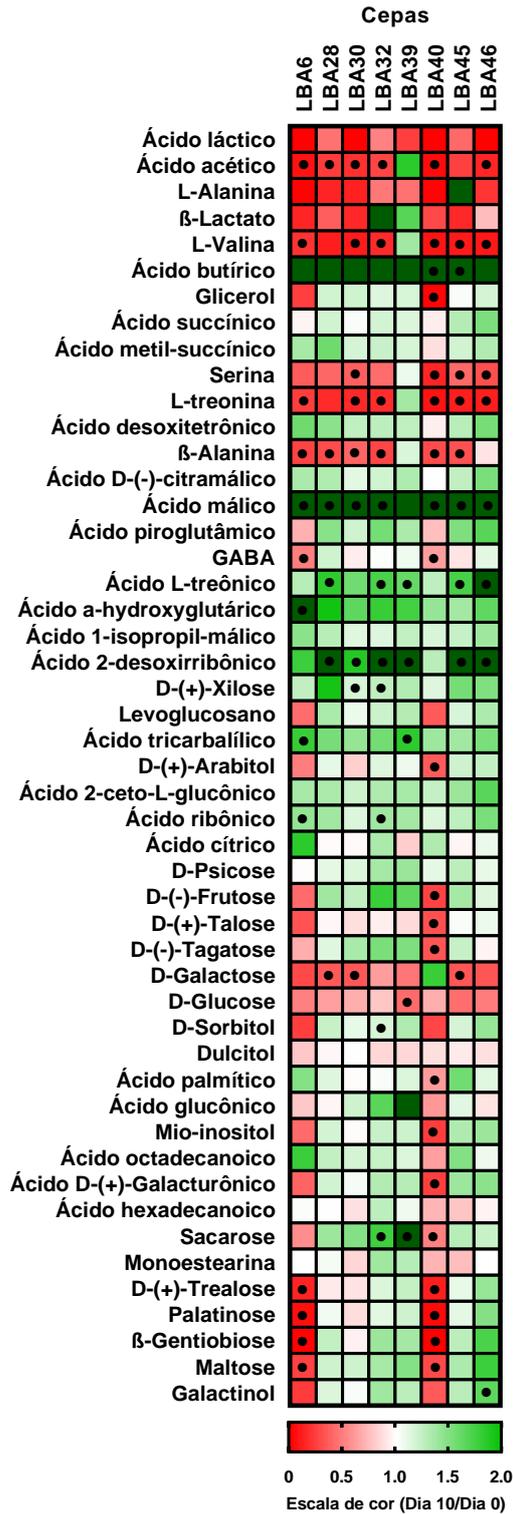


Figura 11. Triagem 2: Mapa de calor das alterações nos níveis extracelulares de metabólitos (dias 0 e 10). A escala de cor indica variações nas áreas dos picos cromatográficos relativos aos compostos entre os dias analisados (dia 10 relativo ao dia 0). Diferenças estatisticamente significativas com base em Teste-T pareado ($p < 0,05$) estão indicadas com um ponto preto (●) e valores que excedem a marca de 2,0 na escala estão representados em verde escuro (■).

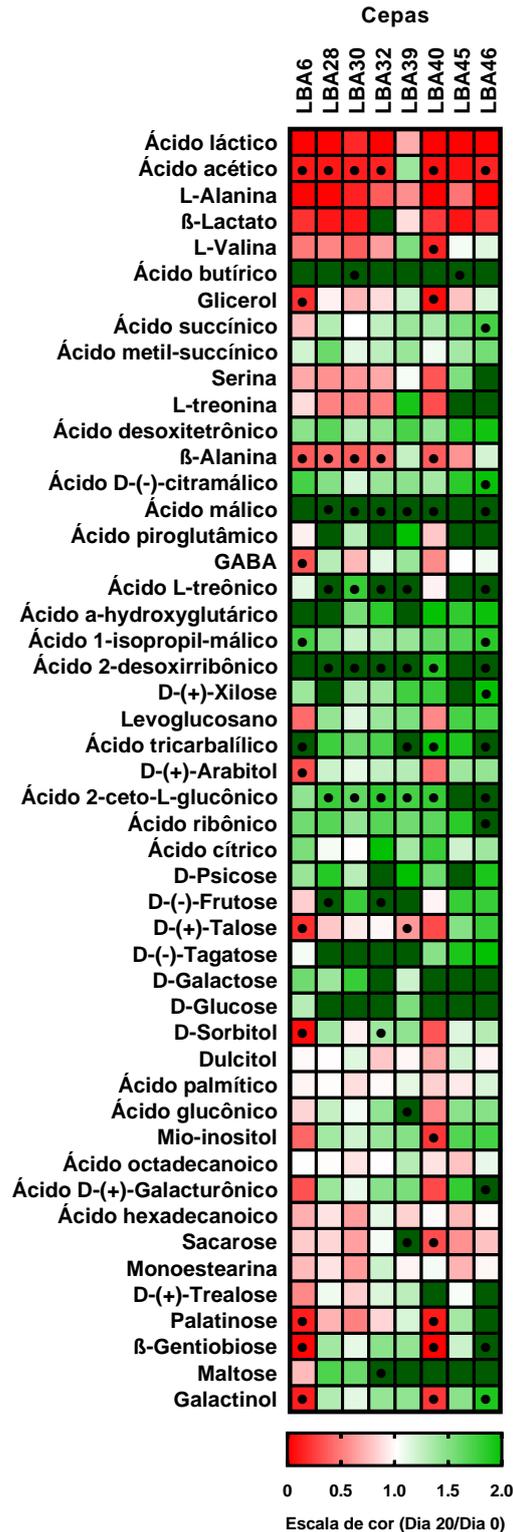


Figura 12. Triagem 2: Mapa de calor das alterações nos níveis extracelulares de metabólitos (dias 0 e 20). A escala de cor indica variações nas áreas dos picos cromatográficos relativos aos compostos entre os dias analisados (dia 20 relativo ao dia 0). Diferenças estatisticamente significativas com base em Teste-T pareado ($p < 0,05$) estão indicadas com um ponto preto (●) e valores que excedem a marca de 2,0 na escala estão representados em verde escuro (■).

5.5. Cultivo das cepas LBA39 e LBA40 em FBRs

As cepas Embrapa|LBA39 e Embrapa|LBA40 foram selecionadas para o cultivo em fotobiorreatores automatizados (FBRs) com base em seus dados de crescimento e de consumo de metabólitos obtidos nas etapas de triagem. Medidas espectrofotométricas feitas no dia 0 e no dia final dos cultivos apontam que houve crescimento significativo das duas cepas ao serem cultivadas em vinhaça com pH 7,0, tanto ozonizada (VO3) quanto não ozonizada (VpH) nos FBRs (Figuras 13 e 14).

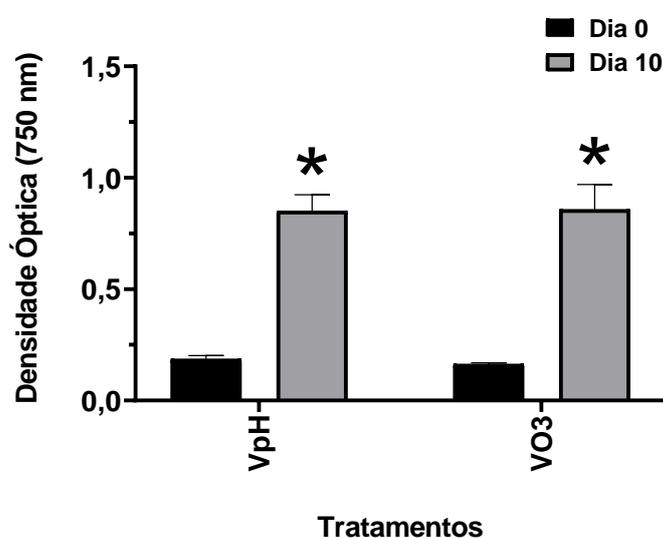


Figura 13. Densidade óptica dos cultivos de LBA39 nos dias 0 e 10. Os valores de absorbância estão expressos como média de absorbância das quatro réplicas de cada tratamento ($n = 4$) e \pm barras de erro. Variações estatisticamente significativas entre os tempos (Teste-T, $p < 0,05$) estão indicadas com asterisco (*).

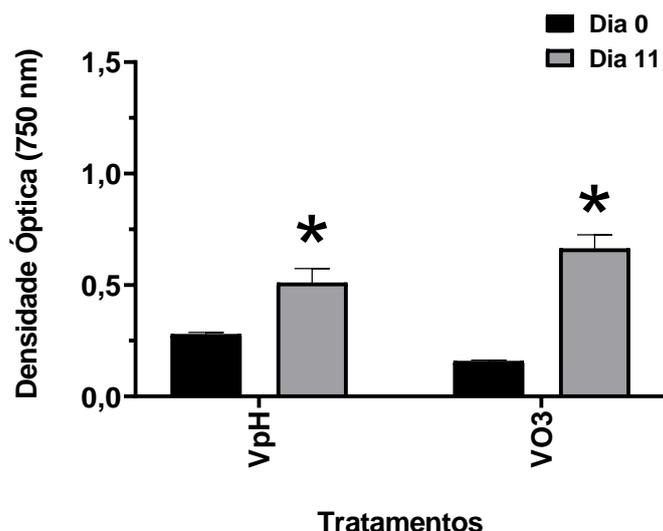


Figura 14. Densidade óptica dos cultivos de LBA40 nos dias 0 e 11. Os valores de absorvância estão expressos como média de absorvância das quatro réplicas de cada tratamento ($n = 4$) e \pm barras de erro. Variações estatisticamente significativas entre os tempos (Teste-T, $p < 0,05$) estão indicadas com asterisco (*).

A cepa LBA39 cultivada em vinhaça com ajuste de pH 7,0 atingiu valores de absorvância maiores após 10 dias de cultivo nos FBRs, do que quando comparados com os dados de densidade óptica desse mesmo dia de cultivo nas duas triagens realizadas neste trabalho (Figuras 3 e 5). A média da densidade óptica dessa cepa ao décimo dia de experimento nos FBRs foi de 0,851 (750 nm), enquanto que as DOs encontradas nas Triagens 1 e 2 para esse mesmo dia foram de 0,536 e 0,532 (750 nm), respectivamente.

No tratamento VO3, foi realizada a aspersão de ozônio como uma tentativa de permitir a observação do crescimento através dos sensores acoplados aos FBRs, uma vez que a coloração da vinhaça com pH 7,0 aparentou interferir no processo detecção de sinal luminoso dos cultivos de LBA39, reduzindo a quantidade de luz que atinge o sensor durante as leituras e, por consequência, retornando valores próximos de 0 UVD (dados não apresentados). A ozonização é um processo capaz de promover a descoloração da vinhaça através de sua reação com compostos fenólicos responsáveis pela cor escura característica desse efluente (Espanha-gamboa et al., 2016; Reis et al., 2019). Ainda assim, não foi possível retornar dados satisfatórios da leitura dos sensores mesmo nos cultivos de LBA39 em VO3.

A contagem celular realizada ao final do experimento resultou em valores levemente mais altos para VO3 do que os obtidos para VpH (Tabela 9), o que, junto com a análise estatística da densidade óptica, confirma o êxito no crescimento da cepa LBA39 em vinhaça ozonizada. Como valor de referência, a densidade celular inicial dos cultivos foi de aproximadamente $6,407 \log_{10}(\text{células mL}^{-1})$.

O cultivo da cepa LBA40 retornou uma DO de 0,509 (750 nm) ao final do cultivo em VpH (dia 11). Esse valor, foi inferior àqueles observados nas Triagens 1 e 2, de 0,701 e 0,663, respectivamente. A média da contagem celular desse cultivo também foi a menor em comparação com os demais cultivos realizados em FBRs (Tabela 9). Visto que a taxa de crescimento específico da cepa LBA40 foi uma das maiores entre as demais cepas, era esperado que esse comportamento se mantivesse para os experimentos em FBRs.

Por outro lado, o cultivo de LBA40 em VO3 obteve indícios de um crescimento bem-sucedido, com base tanto na comparação da DO no início e no fim do experimento (Figura 14), quanto em sua média da contagem de células, que obteve valores próximos aos dos cultivos de LBA39 (Tabela 9). A concentração celular inicial dos cultivos de LBA40 foi de aproximadamente $6,247 \log_{10}(\text{células mL}^{-1})$.

Tabela 9. Contagem de células após o cultivo das cepas LBA39 e LBA40 em FBRs. Os resultados estão expressos em média das quadruplicatas ($n = 4$) \pm erro padrão.

Tratamentos	Unidades	LBA39	LBA40
VpH	$\log_{10}(\text{células mL}^{-1})$	$7,996 \pm 0,15$	$6,695 \pm 0,07$
VO3	$\log_{10}(\text{células mL}^{-1})$	$8,174 \pm 0,19$	$7,923 \pm 0,07$

No experimento em FBRs com a cepa LBA40, os sensores de cor foram ajustados no tempo de abertura do obturador para que houvesse maior exposição à luz durante as medições. Após essa modificação, foi possível observar um crescimento nítido de LBA40 em VO3, principalmente entre os dias 0 e 5, com base nos valores obtidos dos sensores no decorrer do cultivo

(Figura 15B). Notavelmente, houve queda nos valores digitais durante as horas de luz do cultivo, essa diminuição é inversamente proporcional à densidade do cultivo, já que o aumento no número de células no cultivo acarreta na chegada de menos luz ao receptor do sensor. Além disso, os valores se mantiveram estáveis, durante as horas de escuro, refletindo que os cultivos não demonstraram crescimento nesses períodos. Isso é um forte indício de que o crescimento da cepa LBA40 em vinhaça é condicionado à presença de luz.

Por outro lado, mesmo com os ajustes realizados nos sensores, não foi possível elucidar as curvas de crescimento para os cultivos feitos em VpH, que retornaram valores digitais em uma ordem de grandeza consideravelmente menor em comparação com os valores encontrados em VO3.

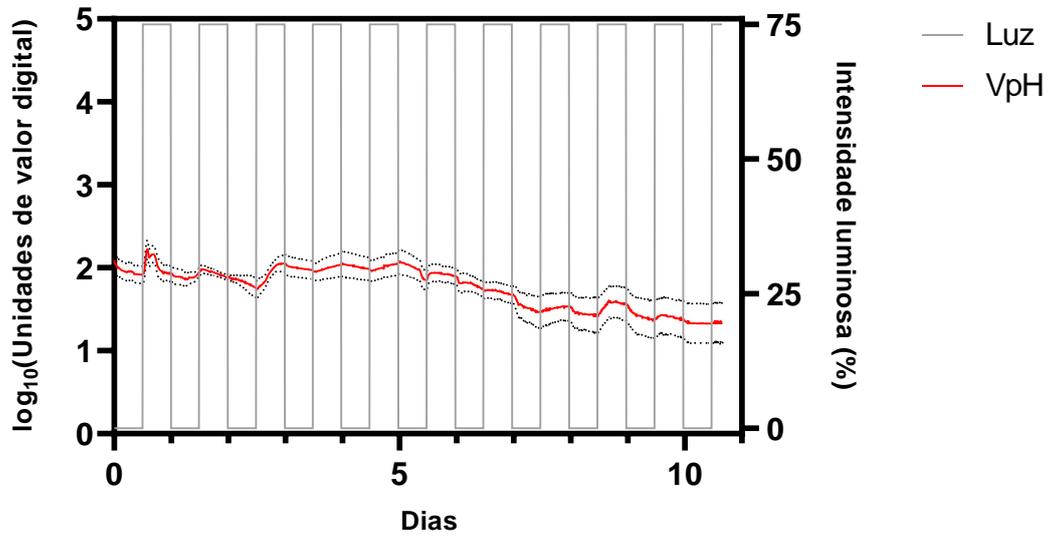
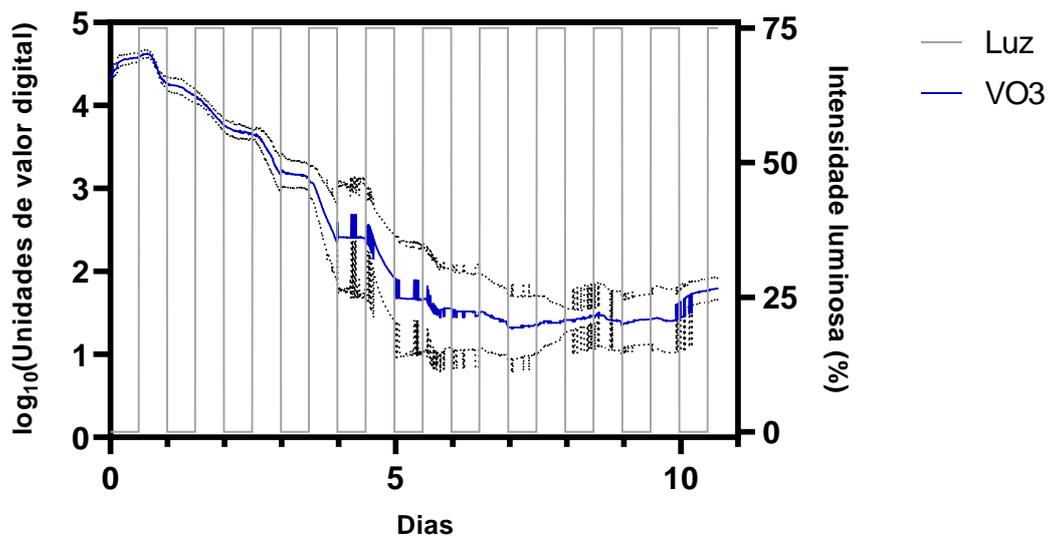
a**b**

Figura 15. Cultivos de LBA40 realizado em fotobiorreatores (FBRs). Os gráficos apresentam o crescimento da cepa em vinhaça com pH ajustado para 7,0 (a), e vinhaça ozonizada e com o mesmo ajuste de pH (b). No eixo Y esquerdo estão expressas as médias de \log_{10} (unidades de valor digital) das quatro réplicas ($n = 4$) e \pm erro padrão. O eixo Y direito representa o percentual da capacidade máxima das lâmpadas utilizadas durante os cultivos.

6. Discussão

6.1. Crescimento das microalgas em vinhaça

Oito das dez microalgas avaliadas nesse estudo revelaram uma curva de crescimento similar nos dois experimentos de triagem. As cepas LBA47 e LBA48 foram as únicas a terem seu crescimento comprometido, onde se observou a presença de contaminantes heterotróficos (dados não apresentados). A alta carga de matéria orgânica presente na vinhaça representa uma fonte de nutrientes não somente para microalgas, mas também para uma vasta quantidade de microrganismos heterotróficos capazes de metabolizar componentes orgânicos (Candido et al., 2022).

Santana e colaboradores (2017) realizaram uma triagem com 40 cepas da CMMAABio (Embrapa|LBA1 a Embrapa|LBA40), incluindo seis cepas também analisadas aqui. Os autores selecionaram as cepas LBA32 e LBA40 após demonstrarem êxito no crescimento em vinhaça bruta. No presente estudo, o cultivo em vinhaça com ajuste de pH para 7,0 revelou um destaque nas taxas de crescimento não somente dessas mesmas cepas, mas também das cepas LBA6 e LBA39. Esses resultados ressaltam que a otimização do pH para 7,0 pode ser um fator crítico capaz de ampliar o sucesso no cultivo de microalgas em vinhaça. Nesse contexto, o ajuste do pH em grande escala pode ser facilmente alcançado por meio da introdução controlada de reagentes químicos adequados (Sahu e Chaudhari, 2013). Assim, a utilização desta abordagem de pré-tratamento não se revela uma proposta inviável.

Embrapa|LBA39 é uma cepa de *Chlorella sorokiniana* isolada da biodiversidade do Cerrado brasileiro. Estudos envolvendo o cultivo de outras cepas de *C. sorokiniana* também relataram bons dados de crescimento em vinhaça com ajustes de pH entre 6,8 e 7, sob diluições de até 50% v v⁻¹ em água destilada (Candido e Lombardi, 2020; Falconí et al., 2020), reforçando a capacidade que essa cepa apresenta de se desenvolver nas condições impostas pelo efluente. Interessantemente, até o momento, não há estudos evidenciando o desempenho da cepa Embrapa|LBA6 ao ser cultivada em vinhaça. No experimento aqui realizado, essa cepa atingiu a maior taxa de

crescimento na Triagem 2, e a terceira maior na Triagem 1, estando atrás apenas de LBA39 e LBA40.

6.2. Metabolismo de íons provenientes da vinhaça

A vinhaça da cana-de-açúcar é conhecida por apresentar em sua composição uma abundância de macronutrientes, muitos dos quais estão disponíveis na forma de íons, como nitrato, fosfato e sulfato (Reis et al., 2019; Sydney et al., 2011). No entanto, a caracterização físico-química da vinhaça bruta utilizada nos experimentos resultou em valores quase nulos de nitrato e fosfato (Tabela 2). É sabido que a composição desse efluente pode variar em função das técnicas empregadas no processamento da cana-de-açúcar e particularidades do local de cultivo (Carpanez et al., 2022), o que justificaria as concentrações observadas.

De fato, os resultados obtidos por CLAE apresentados na Tabela 8 apontam que boa parte do teor de nitrato e fosfato disponíveis para as cepas LBA39 e LBA40 na Triagem 2 foram provenientes do inóculo utilizado, enquanto que o sulfato disponível teve sua origem na vinhaça. A partir dessas informações, é possível inferir que os níveis de nitrato e fosfato variam entre as cepas, considerando as características metabólicas que cada microalga apresenta durante o crescimento em BG-11, enquanto que a concentração de sulfato ao dia 0 foi relativamente similar entre as algas nas duas triagens realizadas (Figura 7 e Figura 8).

O nitrogênio é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento de microalgas, estando presente em aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas e clorofilas (Borowitzka et al., 2016). Sua aquisição pode ocorrer tanto na forma inorgânica, como íons de nitrato, nitrito e amônio, como em moléculas orgânicas, principalmente uréia (Yaakob et al., 2021). Na Triagem 2, as análises cromatográficas de nitrato retornaram valores que são inconsistentes com aqueles observados por espectrofotometria. Dada sua importância, era esperada uma notável tendência de consumo das fontes desse íon, o que condiz melhor com a ausência de nitrato observada ao dia 20, de acordo com a análise através de CLAE (Figura 8B). Ainda, os resultados de espectrofotometria da Triagem 2 indicaram a presença de íons de amônia nos

cultivos ao dia 0, cujos níveis não apresentaram sinais de consumo significativo no decorrer do experimento. A amônia representa uma fonte de nitrogênio que demanda menos energia para sua aquisição, em comparação com as outras fontes de nitrogênio inorgânicas (i.e.: nitrato e nitrito) (Perez-Garcia et al., 2011), e, por isso, costuma ser a primeira a ser esgotada do meio extracelular. Portanto, a variação aqui observada é inconsistente com os relatos da literatura.

O fósforo, por sua vez, participa da composição de lipídios constituintes de membranas, bem como nas trocas energéticas e nas conduções de reações metabólicas (Borowitzka et al., 2016). Em microalgas, o fósforo é majoritariamente obtido do íon fosfato (PO_4^{3-}) através de transportadores de membrana e sua aquisição é proporcional à abundância destes na célula (Borowitzka, 2016). Dessa forma, não seria incomum que as cepas consumissem o conteúdo de fosfato do meio de cultivo em taxas diferentes, como foi observado nas análises de CLAE para as duas triagens (Figura 7E e Figura 8E).

Por fim, o alto teor de enxofre presente na vinhaça em forma de íons de sulfato (Tabela 8) pode ser resultante da aplicação de H_2SO_4 , comumente utilizado na correção do pH para a fermentação do mosto nas destilarias (Junior et al., 2022). Esse nutriente está presente nas células de microalgas na forma de cofatores, vitaminas, sulfolipídeos, tióis não proteicos (e. g. glutatona), e nos aminoácidos cisteína e metionina (Takahashi et al., 2011). Apesar de haver relatos na literatura do uso de microalgas, incluindo *Chlorella* sp. e *Chlamydomonas* sp., na remoção de sulfato de efluentes industriais (Mohammadi et al., 2018), nenhuma das cepas aqui avaliadas demonstrou o consumo desse íon. Pérez-Castiñeira e colaboradores (1998) concluíram, em seu estudo, que a absorção de sulfato pelas microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e *Monoraphidium braunii* foi inibida por ânions estruturalmente similares presentes no meio extracelular. Considerando que a vinhaça apresenta uma diversidade de íons em sua composição (Reis et al., 2019), é possível que a aquisição de sulfato tenha sido comprometida por estes mesmos fatores.

6.3. Análises de *metabolite footprint*

Nas duas triagens, foi evidente que a cepa que mais demonstrou consumo de metabólitos do meio de cultivo foi a Embrapa|LBA40, uma cepa de *Chlamydomonas biconvexa* isolada de uma lagoa de estabilização de vinhaça de cana-de-açúcar em uma usina de etanol brasileira (Hadi et al., 2016). O perfil de metabólitos extracelulares obtido por essa cepa reflete a sua capacidade de adaptação para se desenvolver a partir dos componentes da vinhaça. Dentre os metabólitos removidos pela LBA40, encontram-se uma variedade de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos de baixo peso molecular, além de glicerol. De acordo com Morales-Sánchez e colaboradores (2014) a habilidade que as microalgas apresentam em metabolizar componentes orgânicos extracelulares está relacionada a dois principais fatores: a presença de transportadores de membrana, bem como de vias metabólicas adaptadas para a incorporação dessas fontes de nutrientes. Ainda, a performance de crescimento observada para a cepa LBA40 nos FBRs apresenta indícios de uma dependência da luz para o desenvolvimento da cepa, visto que o aumento na densidade do cultivo ocorreu principalmente nos períodos de luz (Figura 15). Esses dados indicam um possível regime foto-heterotrófico e são consistentes com os dados obtidos por outros autores para esta mesma cepa (Santana et al., 2017).

A cepa Embrapa|LBA6 também apresentou uma forte tendência na remoção de compostos, principalmente nas análises da Triagem 2 (Figura 11 e Figura 12). Trata-se de uma microalga da família Chlorococcaceae (Hadi et al., 2016), cuja identificação a nível de espécie ainda não foi bem definida. Após dez dias de cultivo, essa microalga apresentou indícios de consumo de uma série de açúcares e aminoácidos. Na Triagem 1, os cultivos com a LBA6 resultaram apenas no aumento extracelular dos metabólitos monopalmitina e monoestearina (Figura 10). Ambos são co-produtos da quebra de lipídios, e podem estar relacionados com o metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos, bem como a biossíntese de metabólitos secundários (Guo et al., 2017; Guo e Yuan, 2019). Portanto, a presença de tais moléculas nas amostras pode justificar o desenvolvimento bem sucedido da cepa LBA6, indicando uma possível estratégia metabólica em resposta às condições da vinhaça.

As análises de CG-EM revelaram, ainda, um comportamento similar na variação de alguns metabólitos por maioria das cepas. Na Triagem 1, a redução de ácido glicólico extracelular observada nos cultivos com LBA28, LBA30, LBA40 e LBA45 pode estar relacionada com o fenômeno de fotorrespiração. O primeiro estágio desse processo envolve a atividade de oxigenação de ribulose-1,5-bisfosfato pela enzima RuBisCO, originando fosfoglicolato e, posteriormente, glicolato (Wilson e Tolbert, 1991). O glicolato, por sua vez, pode transitar entre o meio intra e extracelular, através de uma troca aniônica glicolato-bicarbonato, permitindo que a célula excrete ou absorva esse íon em direção a um equilíbrio. Portanto, a avaliação desses níveis pode indicar alterações nas características de cultivo, como, por exemplo, mudanças bruscas de pH ou de concentração de CO₂ (Tolbert e Zill, 1956).

Na Triagem 2, por sua vez, foi evidenciada uma remoção significativa de ácido acético pelas cepas LBA6, LBA28, LBA30, LBA32, LBA40 e LBA46, além do consumo de aminoácidos por praticamente todas as cepas (Figura 11). A aquisição de acetato extracelular por microalgas é bem documentada na literatura, o transporte desse íon se dá por proteínas de membrana que realizam simporte de monocarboxilatos/prótons, sendo, em seguida, metabolizado em acetil-CoA. Este, por sua vez, pode ser destinado tanto ao ciclo de glioxilato, resultando na sua incorporação em moléculas como aminoácidos ou glicose, quanto ao ciclo do ácido tricarboxílico, fornecendo esqueletos de carbono, energia na forma de ATP ou, ainda, NADH (Bogaert et al., 2019; Perez-Garcia et al., 2011). As oito cepas analisadas também relataram indícios de redução nos níveis de todos os aminoácidos identificados por CG-EM, foram eles L-valina, serina, L-treonina e β-alanina. Tipicamente, a aquisição de aminoácidos como fonte de nitrogênio por esses organismos costuma variar entre espécies, a depender dos transportadores de membrana expressos em cada uma delas (Hellebust e Ahmad, 1988). É possível, portanto, que as cepas cultivadas em vinhaça tenham obtido parte do nitrogênio necessário para o crescimento dos aminoácidos presentes no meio. Por fim, o padrão de aumento na concentração de metabólitos observado entre os dias 0 e 20 sugere que, à medida que as cepas de microalgas atingiram a fase estacionária do cultivo, a liberação de ácidos orgânicos no meio ambiente

ganhou destaque, possivelmente refletindo as respostas adaptativas das microalgas à disponibilidade limitada de nutrientes.

6.4. Cultivo de microalgas em FBRs

A ozonização da vinhaça demonstrou ser uma solução para a detecção do crescimento nos cultivos da cepa LBA40 realizados em fotobiorreatores. No entanto, não foi possível estabelecer uma curva de crescimento para LBA39, ainda que esta tenha demonstrado crescimento de maneira indireta, através das leituras de DO ao início e fim do experimento.

Diante disso, é necessário que se faça a repetição do cultivo dessa cepa para que possa observar seu crescimento com mais precisão. É necessário, ainda, avaliar as pegadas metabólicas deixadas por essas cepas através de futuras análises cromatográficas, a fim de comparar padrões de resposta metabólica de cada cepa nos dois tratamentos de vinhaça. A partir dessas informações, novos experimentos poderão ser realizados objetivando o escalonamento dos volumes de cultivo.

7. Conclusões

As microalgas, em sua maioria, são organismos que apresentam inúmeras estratégias para contornar adversidades no ambiente em que estão (Sun et al., 2018). Os resultados obtidos nas triagens podem ser um reflexo da variabilidade metabólica adotada pelas cepas para promover seu desenvolvimento nas condições do meio de vinhaça.

De maneira geral, a avaliação conjunta dos dados de crescimento e das análises extracelulares realizadas nas duas triagens fornece fortes indícios de biorremediação da vinhaça pela cepa Embrapa|LBA40, que foi capaz de remover uma ampla variedade de compostos orgânicos dos meios de cultivo. As análises de pegada metabólica, por sua vez, mostraram um papel importante na avaliação das cepas nas triagens. É necessário que sejam feitas as análises cromatográficas das amostras coletadas dos experimentos nos FBRs para que tenha mais informação a respeito da performance dessa cepa ao se desenvolver nos parâmetros impostos nesses experimentos.

Além disso, o cultivo de microalgas em vinhaça ozonizada ainda é pouco documentado na literatura. Apesar do aparente êxito no crescimento das cepas inoculadas nesse meio, é preciso verificar e aprimorar seu desempenho em maiores volumes de cultivo. É importante lembrar que, para que a biorremediação da vinhaça seja uma alternativa viável, esse processo precisa ocorrer em uma escala proporcional ao volume de vinhaça produzido pela indústria sucroalcooleira.

8. Referências bibliográficas

- Allen, J., Davey, H.M., Broadhurst, D., Heald, J.K., Rowland, J.J., Oliver, S.G., Kell, D.B., 2003. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat. Biotechnol.* 21, 692–696. <https://doi.org/10.1038/nbt823>
- Bogaert, K.A., Perez, E., Rumin, J., Giltay, A., Carone, M., Coosemans, N., Radoux, M., Eppe, G., Levine, R.D., Remacle, F., Remacle, C., 2019. Metabolic, physiological, and transcriptomics analysis of batch cultures of the green microalga *Chlamydomonas* grown on different acetate concentrations. *Cells* 8, 1–21. <https://doi.org/10.3390/cells8111367>
- Borowitzka, M.A., 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol.* 3–15. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1990.tb124478.x>
- Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A., 2016. The Physiology of Microalgae, *The Physiology of Microalgae*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>
- Botelho, R.G., Christofoletti, C.A., Correia, J.E., Tornisielo, V.L., 2013. Environmental implications of using waste from sugarcane industry in agriculture. *Sugarcane Prod. Consum. Agric. Manag. Syst.* 91–113.
- Brasil, B.S.A.F., Silva, F.C.P., Siqueira, F.G., 2016. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *N. Biotechnol.* 39, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.04.007>
- Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W., Simpson, A.G.B., 2020. The New Tree of Eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* 35, 43–55.

<https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>

- Candido, C., Cardoso, L.G., Lombardi, A.T., 2022. Bioprospecting and selection of tolerant strains and productive analyses of microalgae grown in vinasse. *Brazilian J. Microbiol.* 53, 845–855. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00692-7>
- Candido, C., Lombardi, A.T., 2020. Mixotrophy in green microalgae grown on an organic and nutrient rich waste. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2802-y>
- Candido, C., Lombardi, A.T., Lima, M.I.S., 2015. The growth of *Chlorella vulgaris* in filtered vinasse. *Rev. Bras. Ciências Ambient.* 16, 123–142.
- Carpaneze, T.G., Moreira, V.R., Assis, I.R., Amaral, M.C.S., 2022. Sugarcane vinasse as organo-mineral fertilizers feedstock: Opportunities and environmental risks. *Sci. Total Environ.* 832, 154998. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154998>
- Christofoletti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2013. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Manag.* 33, 2752–2761. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>
- Da Silva, M.A.S., Griebeler, N.P., Borges, L.C., 2007. Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. *Rev. Bras. Eng. Agric. e Ambient.* 11, 108–114. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014>
- de Godoi, L.A.G., Camiloti, P.R., Bernardes, A.N., Sanchez, B.L.S., Torres, A.P.R., da Conceição Gomes, A., Botta, L.S., 2019. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 29267–29282. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06019-8>
- España-gamboa, E., Vicent, T., Font, X., Mijangos-cortés, J., Canto-, B., Alzategaviria, L., 2016. Phenol and color removal in hydrous ethanol vinasse in an air-pulsed bioreactor using *Trametes versicolor* 6, 982–986.
- Falconí, J.H.H., Soares, J., Rocha, D.N., Vaz, M.G.M.V., Martins, M.A., 2020. Strain screening and ozone pretreatment for algae farming in wastewaters from sugarcane ethanol biorefinery. *J. Clean. Prod.* 282. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124522>
- Guo, Y., Yuan, Z., 2019. Metabolomics analysis of microalgae for the cellular physiology adjustment to high CO₂. *Microalgae Biotechnol. Dev. Biofuel*

- Wastewater Treat. 465–486. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_18
- Guo, Y., Yuan, Z., Xu, Jingliang, Wang, Z., Yuan, T., Zhou, W., Xu, Jin, Liang, C., Xu, H., Liu, S., 2017. Metabolic acclimation mechanism in microalgae developed for CO₂ capture from industrial flue gas. *Algal Res.* 26, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.029>
- Hadi, S.I.I.A., Santana, H., Brunale, P.P.M., Gomes, T.G., Oliveira, M.D., Matthiensen, A., Oliveira, M.E.C., Silva, F.C.P., Brasil, B.S.A.F., 2016. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS One* 11, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>
- Hellebust, J.A., Ahmad, I., 1988. Biological Oceanography Regulation of Nitrogen Assimilation in Green Microalgae. *Biol. Oceanogr.* 5581, 241–255. <https://doi.org/10.1080/01965581.1988.10749529>
- Junior, A.D.N.F., Etchebehere, C., Perecin, D., Teixeira, S., Woods, J., 2022. Advancing anaerobic digestion of sugarcane vinasse: Current development, struggles and future trends on production and end-uses of biogas in Brazil. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 157. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.112045>
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F., De Clerck, O., 2012. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Ma, X., Mi, Y., Zhao, C., Wei, Q., 2022. A comprehensive review on carbon source effect of microalgae lipid accumulation for biofuel production. *Sci. Total Environ.* 806, 151387. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151387>
- Mapelli, V., Olsson, L., Nielsen, J., 2008. Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. *Trends Biotechnol.* 26, 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.008>
- Mohammadi, M., Mowla, D., Esmaeilzadeh, F., Ghasemi, Y., 2018. Cultivation of microalgae in a power plant wastewater for sulfate removal and biomass production: A batch study. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 2812–2820. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.037>
- Morales-Sánchez, D., Martínez-Rodríguez, O.A., Kyndt, J., Martínez, A., 2014. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World J. Microbiol.*

- Biotechnol. 31, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1773-2>
- Olguín, E.J., Dorantes, E., Castillo, O.S., Hernández-Landa, V.J., 2015. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. *J. Appl. Phycol.* 27, 1813–1822. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0540-6>
- Ördög, V., Stirk, W.A., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., Van Staden, J., Szigeti, J., Németh, L., 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J. Appl. Phycol.* 16, 309–314. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047789.34883.aa>
- Pacheco, M.M., Hoeltz, M., Moraes, M.S.A., Schneider, R.C.S., 2015. Microalgae: Cultivation techniques and wastewater phycoremediation. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 50, 585–601. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.994951>
- Perez-Castineira, J.R., Prieto, J.L., Gonzalez-Arroyo, J.G., Vega, J.M., 1998. Kinetic properties of sulfate uptake in two types of eukaryotic green microalgae. *J. Plant Physiol.* 153, 324–331. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80158-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80158-2)
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Priyadarshani, I., Rath, B., 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Util.* 3, 89–100.
- Quintero-Dallos, V., García-Martínez, J.B., Contreras-Ropero, J.E., Barajas-Solano, A.F., Barajas-Ferrerira, C., Lavecchia, R., Zuurro, A., 2019. Vinasse as a sustainable medium for the production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. *Water (Switzerland)* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3390/w11081526>
- Ramirez, N.N.V., Farenzena, M., Trierweiler, J.O., 2014. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 57, 630–635. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201401791>
- Rawat, I., Gupta, S.K., Shriwastav, A., Singh, P., Kumari, S., Bux, F., 2016. Microalgae Applications in Wastewater Treatment. *Algae Biotechnol.* 249–268. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_13

- Reis, C.E.R., Bento, H.B.S., Alves, T.M., Carvalho, A.K.F., De Castro, H.F., 2019. Vinasse treatment within the sugarcane-ethanol industry using ozone combined with anaerobic and aerobic microbial processes. *Environ. - MDPI* 6. <https://doi.org/10.3390/environments6010005>
- Reis, C.E.R., Hu, B., 2017. Vinasse from sugarcane ethanol production: Better treatment or better utilization? *Front. Energy Res.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2017.00007>
- Renuka, N., Prasanna, R., Sood, A., Ahluwalia, A.S., Bansal, R., Babu, S., Singh, R., Shivay, Y.S., Nain, L., 2015. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 6608–6620. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5884-6>
- Rice, R.G., 1996. Applications of ozone for industrial wastewater treatment — A review. *Ozone Sci. Eng. J. Int. Ozone Assoc.* 18, 477–515.
- Saavedra, M.D.M., Bissoto, F.P., Souza, R.A., Concha, V.O.C., Bastos, R.G., 2017. Growth of *Desmodesmus subspicatus* green microalgae and nutrient removal from sugarcane vinasse clarified by electrocoagulation using aluminum or iron electrodes. *Dyna* 86, 225–232. <https://doi.org/10.15446/dyna.v86n211.72379>
- Sahu, O., Chaudhari, P., 2013. Review on Chemical treatment of Industrial Waste Water. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 17. <https://doi.org/10.4314/jasem.v17i2.8>
- Santana, H., Cereijo, C.R., Teles, V.C., Nascimento, R.C., Fernandes, M.S., Brunale, P., Campanha, R.C., Soares, I.P., Silva, F.C.P., Sabaini, P.S., Siqueira, F.G., Brasil, B.S.A.F., 2017. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. *Bioresour. Technol.* 228, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>
- Silva, C.E. de F., Bertucco, A., 2019. Bioethanol from Microalgal Biomass: Promising Approach in Biorefinery. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 62.
- Silva, L.M., Jardim, W.F., 2006. Trends and strategies of ozone application in environmental problems. *Quim. Nova* 29, 310–317.
- Singh, J., Saxena, R.C., 2015. An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. *Handb. Mar. Microalgae Biotechnol. Adv.* 11–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9>

- Sluiman, H.J., 1985. A cladistic evaluation of the lower and higher green plants (Viridiplantae). *Plant Syst. Evol.* 149, 217–232. <https://doi.org/10.1007/BF00983308>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Sue, T., Obolonkin, V., Griffiths, H., Villas-Bôas, S.G., 2011. An exometabolomics approach to monitoring microbial contamination in microalgal fermentation processes by using metabolic footprint analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7605–7610. <https://doi.org/10.1128/AEM.00469-11>
- Sun, X.M., Ren, L.J., Zhao, Q.Y., Ji, X.J., Huang, H., 2018. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnol. Biofuels* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9>
- Sun, Y., Peng, C., Wang, J., Sun, H., Guo, S., Zhang, H., 2021. Metabolic footprint analysis of volatile metabolites to discriminate between different key time points in the fermentation and storage of starter cultures and probiotic *Lactobacillus casei* Zhang milk. *J. Dairy Sci.* 104, 2553–2563. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18968>
- Sydney, E.B., da Silva, T.E., Tokarski, A., Novak, A.C., de Carvalho, J.C., Woiciechowski, A.L., Larroche, C., Soccol, C.R., 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl. Energy* 88, 3291–3294. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.024>
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., Hell, R., 2011. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: Molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 157–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103921>
- Tolbert, N.E., Zill, L.P., 1956. Excretion of glycolic acid by algae during photosynthesis. *J. Biol. Chem.* 222, 895–906. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)89946-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)89946-3)
- Trevisan, E., Godoy, R.F.B., Radomski, F.A.D., Crisigiovanni, E.L., Branco, K.B.Z.F., Arroyo, P.A., 2020. *Chlorella vulgaris* growth in different

- biodigested vinasse concentrations: Biomass, pigments and final composition. *Water Sci. Technol.* 82, 1111–1119.
<https://doi.org/10.2166/wst.2020.192>
- Vale, M.A., Ferreira, A., Pires, J.C.M., Gonçalves, A.L., 2020. CO₂ capture using microalgae. *Adv. Carbon Capture* 381–405.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819657-1.00017-7>
- Wilson, B.J., Tolbert, N.E., 1991. The transport of glycolic acid by *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 279, 313–315.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80176-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80176-4)
- Yaakob, M.A., Mohamed, R.M.S.R., Al-Gheethi, A., Ravishankar, G.A., Ambati, R.R., 2021. Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. *Cells* 10, 1–19.
<https://doi.org/10.3390/cells10020393>