



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**AVALIAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO ABE (ACETONA-BUTANOL-
ETANOL) ORIGINADO DO APROVEITAMENTO DA VINHAÇA ETANÓLICA**

MARIANE APARECIDA MESSETTI FERREIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Novembro 2017

**AVALIAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO ABE (ACETONA-
BUTANOL-ETANOL) ORIGINADO DO APROVEITAMENTO DA VINHAÇA
ETANÓLICA**

MARIANE APARECIDA MESSETTI FERREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Microbiologia
Aplicada).

Rio Claro – SP

Novembro 2017

604.6 Ferreira, Mariane Aparecida Messetti
F383a Avaliação do resíduo da fermentação ABE
 (acetona-butanol-etanol) originado do aproveitamento da
 vinhaça etanólica / Mariane Aparecida Messetti Ferreira. - Rio
 Claro, 2017
 98 f. : il., figs., gráfs., tabs.

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis
 Coorientador: Ariovaldo José da Silva

 1. Resíduos. 2. Biodegradação. 3. Vinhaça. 4.
 Fermentação anaeróbia. 5. Toxicidade. I. Título.

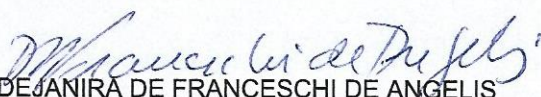
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

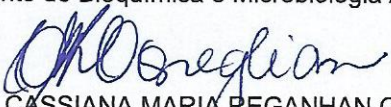
TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO ABE (ACETONA-BUTANOL-ETANOL) ORIGINADO DO APROVEITAMENTO DA VINHAÇA ETANÓLICA.

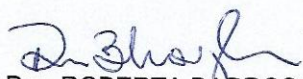
AUTORA: MARIANE APARECIDA MESSETTI FERREIRA

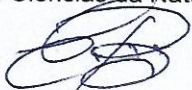
ORIENTADORA: DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

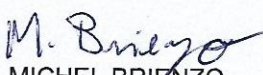
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. CASSIANA MARIA REGANHAN CONEGLIAN
Faculdade de Tecnologia / UNICAMP


Profa. Dra. ROBERTA BARROS LOVAGLIO
Centro de Ciências da Natureza / Universidade Federal de São Carlos


Prof. Dr. EDERIO DINO BIDOIA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. MICHEL BRIENZO
Laboratório de Caracterização de Biomassa / IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia

Rio Claro, 17 de novembro de 2017

Este trabalho é dedicado ao meu filho
Gael, que chegou para dar sentido à
minha vida e alegrar os meus dias.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao soberano Senhor Jeová Deus, criador do universo, por me permitir chegar até aqui.

Agradeço à minha mãe, Maria Aparecida (*in memoriam*) por tudo o que fez por mim. Agora que sou mãe, percebo o quanto ela se sacrificou pelos filhos e lembro com carinho dos muitos momentos em que sempre me incentivou a estudar. Fica a saudade e a certeza que nos encontraremos novamente.

Ao meu pai, Onivaldo, que sempre será meu porto seguro nesse mundo. Exemplo de vida, guiou meus passos até aqui, sempre me incentivando. Não existe melhor pai!

Às minhas irmãs Elaine e Denise, por me ajudarem a cuidar do Gael enquanto terminava a tese.

À Janiel Carlos Ferreira por ter me dado o presente mais valioso da minha vida.

À minha querida orientadora, profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, que me acolheu pela segunda vez quando eu mais precisava e me incentivou a fazer o doutorado. Serei eternamente grata pelo apoio. É um exemplo de trabalho e humildade e por isso é tão querida por todos!

À UNESP campus de Rio Claro por tudo. Uma vez aluna, sei que sempre serei bem acolhida nesta universidade. Agradeço ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada pela oportunidade.

À Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI/Unicamp), em nome do meu co-orientador prof. Dr. Ariovaldo José da Silva e à MSc. Graciete Mary dos Santos, pelo fornecimento da vinhaça FA que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À todos do Depto. de Bioquímica e Microbiologia, em especial aos técnicos de laboratório Inês, Maria Luiza, Beto, Carmem e Fátima, sempre prontos a ajudar.

Ao técnico de laboratório Adriano Uemura, pela grande ajuda!

Aos colegas de laboratório Zito, Márcio Ramos, Márcio Rozin, Eduardo Morales, João Paulo e todos os que já passaram por lá. Todos sempre muito dispostos a ajudar e a dar boas risadas!

À Nair Conde, pela amizade nesses 4 anos de doutorado e por toda ajuda.

À Dra. Dilza Nalin, pela ajuda e disponibilidade.

Ao prof. Dr. José Silvio Govone, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales e a Lais Sommaggio pelas análises de mutagenicidade.

Ao Oscar pelos ensaios no cromatógrafo gasoso e à Lusiane Pika pelo auxílio na metodologia e discussão dos resultados.

Ao prof. Dr. Jonas Contiero e à Dra. Luciana Fontes Coelho pelas análises de ácidos orgânicos no HPLC.

Ao prof. Dr. André Rodrigues, pelo aprendizado do estágio docência.

À toda equipe de profissionais do Centro de Convivência Infantil (CCI) da Unesp Rio Claro, que cuidaram com tanto carinho do meu pequeno para que eu pudesse concluir meu doutorado.

A todos os quais não citei nomes, pois a memória falha, mas que tiveram participação nesses anos e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Não lhe ordenei que seja corajoso e forte? Não fique apavorado nem tenha medo, pois Jeová, seu Deus, estará com você aonde quer que você for.”
(Josué 1:9)

RESUMO

Diversos estudos tem avaliado a utilização da vinhaça em uma nova fermentação, visando a obtenção de sub-produtos. Nesta fermentação, chamada acetona-butanol-etanol (ABE), bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium* podem converter matéria orgânica presente na vinhaça em acetona, butanol, etanol e ácidos orgânicos, que são recuperados do caldo fermentado mediante técnicas de separação. Após a recuperação dos produtos de interesse e da biomassa bacteriana, o resíduo final é descartado. Este resíduo, denominado vinhaça FA (vinhaça da fermentação anaeróbia) foi o objeto de estudo deste trabalho, bem como o processo fermentativo para a sua obtenção. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a vinhaça FA com relação às suas características físico-químicas e microbiológicas, bem como avaliar sua biodegradação em solo e sua toxicidade. Além disso, realizou-se fermentação utilizando-se cultura mista anaeróbia em meio de cultura sintético (MCS) suplementado com vinhaça e melaço. Avaliou-se a produção de ácidos orgânicos, acetona, butanol e etanol. A biodegradação da vinhaça FA em amostras de solo na presença e ausência de inóculo comercial foi avaliada mediante a produção de CO₂ durante 57 dias. A quantificação de microrganismos foi realizada no início e no final do ensaio. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda utilizando-se o microcrustáceo *Daphnia similis*; fitotoxicidade sobre *Lactuca sativa* e genotoxicidade ambiental com *Allium cepa*. A fermentação foi conduzida por 7 dias, sendo quantificados os teores de acetona, butanol e etanol por cromatografia gasosa, e ácidos orgânicos por CLAE, no início e final do ensaio. A vinhaça FA em solo atingiu 30% de eficiência de biodegradação após 13 dias. Não houve diferenças estatisticamente significativas com a adição de inóculo comercial. Vinhaça FA apresentou elevada toxicidade aguda para *D. similis*, com EC(50)= 9,10%; no entanto ensaios com o solubilizado mostraram que a toxicidade foi removida após o processo de biodegradação em solo. O crescimento relativo de *L. sativa* foi comprometido com o aumento da concentração de vinhaça FA, e a germinação foi inibida na concentração de 50%. Embora a vinhaça FA não tenha induzido efeitos genotóxicos e mutagênicos em *A. cepa*, a citotoxicidade da amostra avaliada pelo índice mitótico foi dose dependente. As amostras mais concentradas (12 e 20%), apresentaram resultados estatisticamente significativos, interferindo no potencial citostático das células de *A. cepa*, levando a diminuição dos índices mitóticos e, conseqüentemente, decréscimo nos índices de germinação e de crescimento radicular. Os ensaios toxicológicos, permitem inferir que o descarte de vinhaça FA não deve ocorrer em rede hídrica, pois pode comprometer os organismos aquáticos; e para uso seguro como fertilizante agrícola, é indicado que esse resíduo passe por tratamento como a biodegradação, para que haja diminuição da sua toxicidade. Nos ensaios de fermentação anaeróbia realizados, não foram detectados acetona e butanol. Verificou-se produção de etanol de 2,32 e de 1,10 g/L nos ensaios contendo MCS suplementado com melaço e MCS suplementado com melaço e vinhaça, respectivamente. No ensaio contendo MCS suplementado somente com a vinhaça não houve produção de etanol. A suplementação com o melaço favoreceu a produção de ácido láctico pela cultura mista, enquanto a produção de ácido butírico foi favorecida pela presença da vinhaça, atingindo valores de até 31,8 e 13,9 g/L, respectivamente.

Palavras-chave: Biodegradação. Vinhaça. Fermentação anaeróbia. Toxicidade.

ABSTRACT

Several studies have evaluated the use of stillage in a new fermentation in order to obtain by-products. In this fermentation, called acetone-butanol-ethanol (ABE), anaerobic bacteria of the genus *Clostridium* can convert organic matter present in the stillage in acetone, butanol, ethanol and organic acids which are recovered from the fermented broth by separation techniques. After recovering the interest products and bacterial biomass, the final residue is discarded. This residue, called AF stillage (stillage from anaerobic fermentation) was the object of study of this work, as well as the fermentation process to obtain it. Thus, the objective of this work was to evaluate AF stillage in relation to its physico-chemical and microbiological characteristics, as well as to evaluate its biodegradation in soil and its toxicity. In addition, fermentation was carried out using anaerobic mixed culture in synthetic culture medium (SCM) supplemented with stillage and molasses. The production of organic acids, acetone, butanol and ethanol was evaluated. The biodegradation of AF stillage was evaluated in soil samples in the presence and absence of commercial inoculum, through the production of CO₂ for 57 days. Microorganisms quantification was performed at the beginning and at the end of the test. Acute toxicity tests using the microcrustacean *Daphnia similis*; phytotoxicity with *Lactuca sativa* and environmental genotoxicity with *Allium cepa* were performed. The fermentation was conducted for 7 days, and the contents of acetone, butanol and ethanol were determined by gas chromatography and organic acids by HPLC at the beginning and end of the test. AF stillage in soil reached 30% biodegradation efficiency after 13 days. There were no statistically significant differences with the addition of commercial inoculum. AF stillage presented high acute toxicity for *D. similis*, with CE(50) = 9.10%; however, the solubilized tests showed that the toxicity was removed after the soil biodegradation process. The relative growth of *L. sativa* was compromised with increasing AF stillage concentration, and germination was inhibited at 50%. Although AF stillage did not induce genotoxic and mutagenic effects in *A. cepa*, the cytotoxicity of the sample evaluated by the mitotic index was dose dependent. The most concentrated samples (12 and 20%) presented statistically significant results, interfering with the cytostatic potential of *A. cepa* cells, leading to a decrease in mitotic indexes and, consequently, a decrease in germination and root growth indexes. The toxicological tests, allow to infer that the disposal of AF stillage should not occur in water supply, as it may compromise aquatic organisms; and for safe use as agricultural fertilizer, it is indicated that such waste passes through treatment such as biodegradation to reduce its toxicity. In the anaerobic fermentation tests, acetone and butanol were not detected. There was an ethanol production of 2.32 and 1.10 g/L in the tests containing SCM supplemented with molasses and SCM supplemented with molasses and stillage, respectively. In the tests containing SCM supplemented with only stillage, there was not ethanol production. The supplementation with molasses favored the production of lactic acid by the mixed culture, while the production of butyric acid was favored by the presence of stillage, reaching values of up to 31.8 and 13.9 g/L, respectively.

Keywords: Biodegradation. Vinasse. Stillage. Anaerobic fermentation. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas bioquímicas do metabolismo da glicose por <i>Clostridium acetobutylicum</i>	7
Figura 2 - Fluxograma do ensaio de adaptação do inóculo ao melaço e à vinhaça.....	20
Figura 3 - Frasco reator com adaptação de dispositivo para entrada e saída de gases.....	21
Figura 4 - Respirômetro de Bartha.....	26
Figura 5 - Indicação dos pontos de medição do comprimento da raiz de alface.....	30
Figura 6 – Quantificação final de etanol (g/L) produzido durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.....	34
Figura 7 - Quantificação final de ácidos orgânicos (g/L) produzidos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.....	37
Figura 8 - Resultados da quantificação de bactérias anaeróbias presentes no início e no final do ensaio de fermentação, com duração de 7 dias, para produção da vinhaça FA (UNESP), expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	38
Figura 9 - Resultados das medidas de densidade óptica em função do tempo de fermentação anaeróbia.....	40
Figura 10 - Resultados do valores de pH em função do tempo de fermentação anaeróbia.....	42
ARTIGO 1	
Figure 1 - Cumulative production of CO ₂ in different treatments in the respirometry test with AF stillage.....	55
ARTIGO 2	
Figura 1 - Índices de germinação (%) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA.....	77
Figura 2 - Germinação relativa (%) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA.....	77

Figura 3 - Crescimento relativo (%) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA.....	78
Figura 4 - Porcentagem de germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> no ensaio de toxicidade, desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA.....	80
Figura 5 - Frequência do índice mitótico observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA.....	81
Figura 6 - Frequência de morte celular observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA.....	82
Figura 7 - Frequência dos danos genotóxicos observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA.....	83
Figura 8 - Frequência dos danos mutagênicos observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do Reinforced Clostridial Medium (RCM).....	14
Tabela 2 - Solução de vitaminas do Reinforced Clostridial Medium (RCM).....	14
Tabela 3 - Solução de micronutrientes utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 4 - Solução de macronutrientes utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 5 - Solução de vitaminas utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 6 - Solução de agente redutor utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 7 - Solução tampão utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 8 - Protocolo do ensaio de adaptação do inóculo ao Meio de Cultura Sintético (MCS) suplementado com melaço e vinhaça bruta em concentrações crescentes.....	19
Tabela 9 – Teor de açúcares redutores totais (ART) presentes nas amostras de melaço e vinhaça bruta utilizados no ensaio de fermentação.....	21
Tabela 10 - Protocolo do ensaio de fermentação anaeróbia para obtenção de vinhaça FA (UNESP).....	22
Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos analisados baseados na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006).....	25
Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos analisados baseados no Artigo 19-A do Decreto No. 8.468 (SÃO PAULO, 1976).....	25
Tabela 13 - Características físicas do solo controle utilizado no ensaio de respirometria.....	27
Tabela 14 - Características químicas do solo controle, macro e micronutrientes.....	27
Tabela 15 - Quantificação de bactérias e fungos presentes na vinhaça FA expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	33
Tabela 16 – Quantificação final de ácidos orgânicos (g/L) produzidos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.....	36

Tabela 17 – Rendimento da produção de ácidos orgânicos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.....	38
---	----

Tabela 18 - Resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta utilizada para a fermentação anaeróbia e do seu resíduo final (vinhaça FA/UNESP), baseadas na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) para caracterização de vinhaça.....	43
---	----

Tabela 19 - Valores máximos permitidos (VMP) para lançamento de efluentes em esgoto segundo Decreto No. 8.468/76 (SÃO PAULO, 1976) e resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta e de seu resíduo final (vinhaça FA/UNESP).....	44
---	----

ARTIGO 1

Table 1 - Physicochemical composition of the AF stillage.....	52
--	----

Table 2 - Physical characteristics of the control soil.....	52
--	----

Table 3 - Chemical characteristics of control soil (macro and micronutrientes).....	53
--	----

Table 4 - Efficiency of biodegradation of AF stillage in the respirometry test for 57 days.....	57
--	----

Table 5 - Initial and final counts of heterotrophic bacteria and fungi from the respirometry test, expressed in colony forming units per gram of soil (CFU/g).....	57
---	----

Table 6 - Results of the acute toxicity test on <i>D. similis</i> for raw AF stillage.....	58
---	----

Table 7 - Results of the acute toxicity test on <i>D. similis</i> performed with leachate using respirometry test.....	59
---	----

ARTIGO 2

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos analisados, baseados na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006).....	69
---	----

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos analisados, baseados no Artigo 19-A do Decreto No. 8.468 (SÃO PAULO, 1976).....	69
--	----

Tabela 3 - Resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta utilizada para a fermentação anaeróbia e do seu resíduo final (vinhaça FA), baseadas na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) para caracterização de vinhaça.....	73
--	----

Tabela 4 - Valores máximos permitidos (VMP) para Lançamento de efluentes em esgoto segundo Decreto No. 8.468/76 (SÃO PAULO, 1976) e resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta e de seu resíduo final (vinhaça FA).....75

Tabela 5 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia similis*.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABE – acetona-butanol-etanol
ANOVA - Análise de Variância
ART – açúcares redutores totais
AT – ácido térmico
atm - atmosfera padrão
Ba(OH)₂ – hidróxido de bário
C₂H₇NO₂ – acetato de amônio
CE(50) - Concentração Efetiva Média
CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CN – controle negativo
CO₂ – gás carbônico
CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
CP – controle positivo
CR – crescimento relativo
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDGS - *Dried Distiller Grains With Soluble*
DNS - ácido 3,5 dinitrosalicílico
DQO - Demanda Química de Oxigênio
EB – eficiência de biodegradação
FA – fermentação anaeróbia
FEAGRI – Faculdade de Engenharia Agrícola
FeSO₄.7H₂O - sulfato de ferro heptahidratado
FID - Flame Ionization Detector
g – grama
GR – germinação relativa
H₂O – água
HCl – ácido clorídrico
IAC - Índice de Alterações Cromossômicas
IG – índice de germinação
IM - Índice Mitótico
IMC - Índice de Morte Celular
IMt - Índice de Mutagenicidade
K₂CO₃ – carbonato de potássio
K₂HPO₄ – Fosfato (mono)ácido de potássio
KH₂PO₄ - dihidrogenofosfato de potássio
KOH – hidróxido de potássio
Kpa - quilopascal
l – litro
μ - micro
m³ – metro cúbico
MCS – meio de cultura sintético
mg - miligrama
MgSO₄.7H₂O – sulfato de magnésio heptahidratado
min – minuto
mL - mililitro
MMS - metanosulfonato de metilo
MN - micronúcleos

MnSO₄ – sulfato de manganês
(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
nm – nanômetros
OD – oxigênio dissolvido
OECD - Organization for Economic Cooperation and Development
PCA – *Plate Count Agar*
pH potencial hidrogeniônico
ppm – partes por milhão
q.s.p. – quantidade suficiente para
QC - quebras cromossômicas
R² – coeficiente de determinação
RALF - reator anaeróbio de leito fluidizado
RCM - *Reinforced Clostridial Medium*
rpm – rotações por minuto
TT – tratamento térmico
UFC – unidades formadoras de colônia
UT - Unidades Tóxicas
VMP – valores máximos permitidos
ZnSO₄ – sulfato de zinco

SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Vinhaça da fermentação etanólica	4
3.2. Fermentação Acetona-Butanol-Etanol (ABE)	7
3.3. Avaliação de toxicidade e genotoxicidade de efluentes	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Meios de cultura e soluções	13
4.2. Resíduos	16
4.2.1. Obtenção da Vinhaça FA	16
4.2.1.1. Vinhaça FA (FEAGRI)	16
4.2.1.1.1. Preparação para utilização da Vinhaça FA (FEAGRI)	17
4.2.1.2. Vinhaça FA (UNESP)	18
4.2.1.2.1. Vinhaça bruta	18
4.2.1.2.2. Pré-tratamento do inóculo	18
4.2.1.2.3. Crescimento do inóculo	18
4.2.1.2.4. Adaptação do inóculo ao melaço e à vinhaça	19
4.2.1.2.4.1. Determinação de açúcares redutores totais (ART) presentes no melaço e na vinhaça	20
4.2.1.2.5. Ensaio de fermentação	21
4.2.1.2.5.1. Quantificação de bactérias anaeróbias	22
4.2.1.2.5.2. Densidade óptica	23
4.2.1.2.5.3. Quantificação de solventes	23

4.2.1.2.5.4. Quantificação de ácidos orgânicos.....	24
4.3. Ensaio com a Vinhaça FA (FEAGRI).....	24
4.3.1. Análises físico-químicas.....	24
4.3.2. Análises microbiológicas.....	25
4.3.3. Avaliação de biodegradação em solo.....	26
4.3.3.1. Solo utilizado no ensaio de respirometria.....	27
4.3.3.2. Ensaio de respirometria.....	27
4.3.3.3. Análise microbiológica do ensaio de respirometria.....	28
4.3.3.4. Ensaio de Toxicidade dos solubilizados.....	29
4.3.4. Ensaio toxicológicos.....	29
4.3.4.1. Ensaio de toxicidade com <i>Daphnia similis</i>	29
4.3.4.2. Ensaio de Germinação de sementes.....	29
4.3.4.3. Ensaio de Mutagenicidade com <i>Allium cepa</i>	30
4.4. Análises Estatísticas.....	31
4.4.1. Ensaio de respirometria para avaliação de biodegradação em solo.....	31
4.4.2. Ensaio de toxicidade aguda com <i>D. similis</i>	32
4.4.3. Ensaio de mutagenicidade com <i>A. cepa</i>	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Vinhaça FA (FEAGRI).....	33
5.1.1. Análise Microbiológica.....	33
5.2. Vinhaça FA (UNESP).....	34
5.2.1. Ensaio de fermentação.....	34
5.2.1.1. Quantificação de solventes.....	34
5.2.1.2. Quantificação de ácidos orgânicos.....	36
5.2.1.3. Quantificação de bactérias anaeróbias.....	38

5.2.1.4. Densidade óptica.....	39
5.2.1.5. Acompanhamento do pH.....	41
5.2.2. Análises físico-químicas.....	42
5.3. Artigos.....	45
5.3.1. Artigo 1.....	46
5.3.2. Artigo 2.....	64
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

O principal efluente da fermentação etanólica é a vinhaça, gerada anualmente no Brasil na proporção de 10 litros de vinhaça por litro de etanol produzido. É uma das grandes preocupações da indústria sucro-alcooleira e sua aplicação como fertilizante em campos agrícolas é amplamente utilizada. Contudo, essa operação a longo prazo pode afetar a qualidade do solo e contaminar as águas superficiais e subterrâneas. Assim, outras aplicações tem sido propostas para o reaproveitamento deste resíduo agroindustrial; e uma das alternativas é sua biodigestão mediante fermentação visando a geração de subprodutos.

A fermentação ABE é realizada por bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*, que convertem açúcares em solventes gerando acetona, butanol e etanol. Com a busca por biocombustíveis como o butanol, este tipo de fermentação tem sido objeto de interesse pelo setor industrial. A utilização da vinhaça etanólica como substrato pode diminuir os custos de produção, uma vez que recicla esse resíduo ambiental. No entanto, para cada litro de butanol produzido são gerados cerca de 80 litros de água residuária. Uma eventual produção de butanol em escala anual de bilhões de litros se tornará um grande problema ambiental.

Assim, o resíduo da fermentação anaeróbia da vinhaça para obtenção de subprodutos é o principal objeto de estudo deste trabalho, sendo denominado “vinhaça da fermentação anaeróbia” (Vinhaça FA). É necessário discutir soluções para o descarte da vinhaça FA, avaliando sua biodegradabilidade, bem como sua toxicidade tanto em ambiente aquático como no solo, para que não acarrete danos ambientais.

Substâncias tóxicas se acumulam no meio, comprometendo a fauna e a flora, e os seres humanos podem ser afetados por meio da transferência dos contaminantes pela cadeia trófica ou pela água de abastecimento. Na biorremediação, que é um processo biológico de tratamento amplamente utilizado, os microrganismos utilizam as substâncias xenobióticas como alimento para seu desenvolvimento e assim degradam contaminantes ambientais. A diversidade microbiana do solo exerce um papel muito importante nos processos de biodegradação de rejeitos industriais.

A interação entre diferentes métodos de avaliação de potenciais tóxicos e genotóxicos fornecem uma visão mais global e abrangente sobre o efeito de um agente químico. Os contaminantes, antes e após passarem por processos de biorremediação, podem ser avaliados mediante ensaios de ecotoxicidade, que levam em consideração o resultado do sinergismo de substâncias presentes em determinado meio sobre os organismos. Ensaio ecotoxicológicos com organismos padronizados são amplamente empregados para estimar o efeito tóxico de determinados compostos, dando subsídios para avaliações de riscos aos diferentes tipos de ambientes. Para o ambiente aquático, destaca-se a utilização de microcrustáceos do gênero *Daphnia* spp para avaliação de toxicidade aguda. Ensaio utilizando plantas superiores como a alface (*Lactuca sativa*) têm sido utilizados em estudos sobre a fitotoxicidade de águas e sedimentos contaminados. Ainda dentre as plantas superiores, a cebola (*Allium cepa*) é rotineiramente utilizada para avaliar contaminações ambientais e os mecanismos de ação de compostos químicos através da avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos.

Desse modo, o presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na Etapa I avaliou-se a vinhaça FA proveniente do trabalho de Santos (2015). Foram realizados ensaios físico-químicos, microbiológicos, ecotoxicológicos e de biodegradabilidade. Estes resultados foram organizados na forma de dois artigos científicos. Na Etapa II efetuou-se a fermentação ABE com cultura mista para geração de vinhaça FA. A quantificação dos subprodutos da fermentação, bem como os resultados das análises deste segundo resíduo obtido no Laboratório de Toxicidade de Águas do Depto. de Bioquímica e Microbiologia da Unesp/ Rio Claro-SP estão descritos na tese.

2 OBJETIVOS

- 2.1** caracterizar as propriedades físico-químicas, microbiológicas, ecotoxicológicas e biodegradabilidade do resíduo produzido a partir da fermentação acetona-butanol-etanol (ABE), denominado “Vinhaça da Fermentação Anaeróbia” (Vinhaça FA-FEAGRI), a fim de contribuir com a tomada de decisões referentes à disposição final desse resíduo.
- 2.2** realizar fermentação ABE utilizando inóculo proveniente de estação de tratamento de bovinocultura de leite, em meio de cultura sintético suplementado com vinhaça e melaço objetivando a produção de acetona, butanol, etanol e ácidos orgânicos. Caracterizar as propriedades físico-químicas deste resíduo pós-fermentação (Vinhaça FA-UNESP).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Vinhaça da fermentação etanólica

Segundo Mariano e Maciel Filho (2012) a indústria de bioetanol no Brasil gera aproximadamente 10 litros de vinhaça por litro de etanol produzido a partir da cana-de-açúcar. Consequentemente, a produção anual de etanol de cerca de 30,5 bilhões de litros (safra 2015/2016) é acompanhada por cerca de 305 bilhões de litros de vinhaça, que é aplicada diretamente nos cultivares de cana-de-açúcar (CONAB, 2016). Vinhaça, também conhecida como vinhoto ou restilo, é caracterizada como um efluente líquido de destilaria que possui alto poder poluente e valor fertilizante a ser considerado. Devido à sua composição rica em matéria

orgânica e inorgânica, é cerca de cem vezes mais poluente que o esgoto doméstico (LELIS NETO, 2008).

A vinhaça originada da fermentação etanólica é um líquido castanho claro que consiste de água (93%), sólidos orgânicos e minerais (7%), dentre os quais 75% são compostos por matéria orgânica e 25% de fração mineral (LUDOVICE, 1997). Sua composição química é variável, dependendo, entre outros fatores, das características da cana-de-açúcar e dos processos de fermentação e de destilação empregados. Em geral, a vinhaça apresenta turvação elevada e pH baixo, matéria orgânica (principalmente glicerol, uma fonte de carbono solúvel), potássio, cálcio e quantidades moderadas de nitrogênio e fósforo (FERRAZ et al., 1986; RODELLA et al., 1983; TAUKE, 1987; GÓMEZ; RODRIGUEZ, 2000 apud MARIANO et al., 2009).

No Brasil, durante muito tempo a vinhaça era descartada diretamente nos rios, poluindo-os. Após a limitação de seu descarte a vinhaça passou a ser utilizada como fertilizante em campos agrícolas, em um processo chamado fertirrigação. A fertirrigação em quantidades racionais apresenta efeitos positivos sobre a produtividade agrícola, atuando como um substituto parcial ou total dos fertilizantes minerais, principalmente potássio, minimizando a poluição dos rios e mananciais. A proposta de fertirrigação foi a opção mais favorável ao ambiente que a disposição que fora utilizada em tempos passados, que ocorria em rios nas proximidades das usinas. Esta opção teve boa aceitação por parte das destilarias devido a sua simplicidade técnica e vantagens econômicas (CABELLO et al., 2009; CORAZZA, 1999).

Segundo Fuess e Garcia (2014), evidências da literatura científica indicam que o principal obstáculo para utilização da vinhaça *in natura* na fertirrigação incluem riscos de salinização do solo, obstrução dos poros, redução da atividade microbiana, esgotamento significativo das concentrações de oxigênio dissolvido em corpos d'água, contaminação por nitratos e eutrofização, desestabilização da estrutura do solo devido às altas concentrações de potássio e sódio, e ainda, possível acidificação do solo e recursos hídricos devido ao baixo pH da vinhaça, além da possível presença de metais pesados. Os autores concluem que embora alguns estudos relatem benefícios da fertirrigação, o tratamento da vinhaça é necessário para que este processo seja considerado ambientalmente adequado. Quando aplicada em altas doses, a vinhaça pode comprometer a qualidade da cana-de-açúcar e até mesmo poluir o lençol freático (SILVA et al., 2007).

De acordo com Freire e Cortez (2000) apud GOMES et al. (2011) a vinhaça pode apresentar elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), atingindo valores de até 210.000 mg L⁻¹ e 100.000 mg L⁻¹, respectivamente. A vinhaça

é fonte de potássio e traz benefícios para o solo (ARIENZO et al., 2009), quando aplicada em concentrações que não excedem os limites impostos pela Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006), segundo a qual a aplicação só pode ser realizada se o teor de potássio disponível no solo for menor do que 5% da capacidade de troca de cátions.

Uma prática comum no passado era evaporar a vinhaça sob vácuo formando um concentrado contendo cerca de 50% de sólidos, que era seco por pulverização e, em seguida, vertido para alimentação animal (JONES e WOODS, 1986). Vinhaça (também referida como vinhaça total) é normalmente separada em uma fração sólida e uma fração líquida (vinhaça fina) mediante centrifugação. A fração sólida é geralmente seca e misturada com a fração líquida concentrada para produzir *Dried Distiller Grains With Soluble* (DDGS), que são comercializados como ração animal (KIM et al., 2008). Parte menor do volume da vinhaça fina é reciclada como água de processo ou enviada para estações de tratamento de efluentes. Recentemente, devido a quantidade de vinhaça gerada pelas usinas de produção de etanol, e o baixo preço de DDGS, os pesquisadores tem estudado o uso da vinhaça ou DDGS como substrato para a produção de biocombustíveis (EZEJI e BLASCHEK, 2008; DAVIS et al., 2005). Nestes processos, o pré-tratamento físico-químico e a hidrólise enzimática dos DDGS são necessários, uma vez que os carboidratos presentes na fração sólida da vinhaça são principalmente fibras não fermentescíveis que necessitam ser transformadas em açúcares para a produção de biocombustíveis. Diferentemente da fração sólida da vinhaça e DDGS, a vinhaça fina em si não tem sido amplamente considerada como um substrato para a produção de biocombustíveis, devido à sua baixa concentração de carboidratos e sua composição química complexa (GONZALEZ et al., 2010).

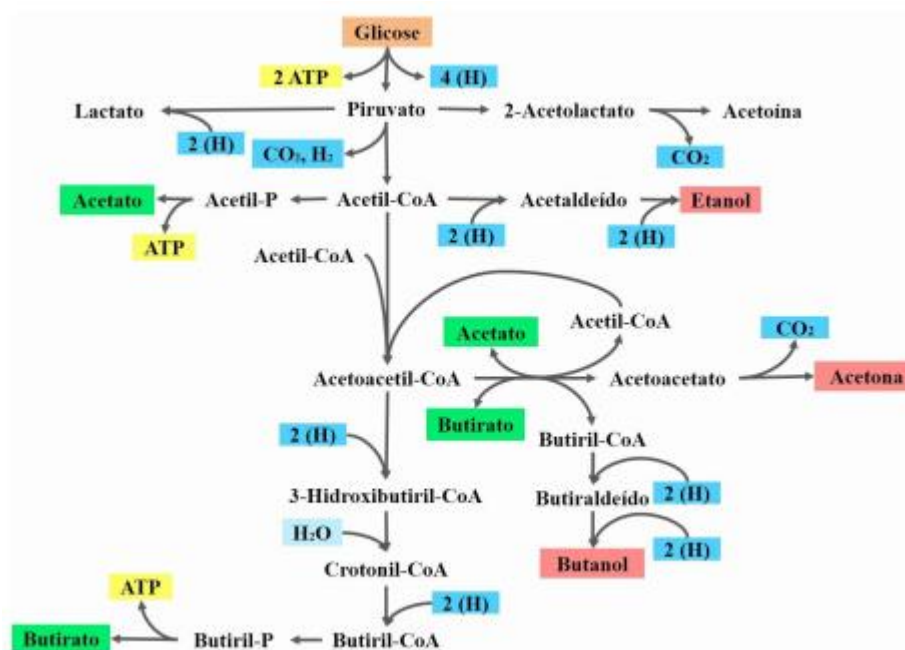
Apesar de o Brasil encontrar-se numa posição vantajosa, principalmente quando se fala de etanol da cana-de-açúcar, é necessário que o país consolide sua posição no mercado mundial de energia de forma sustentável, considerando questões de natureza ambiental, econômica e social (SANTOS et al., 2011). Segundo Mello et al. (2007) o Brasil deverá manter a posição de liderança na produção de etanol, em razão das características naturais de seu território, da larga experiência agrícola e industrial no setor sucroalcooleiro e do recente desenvolvimento da agroindústria do biodiesel.

A expansão dos biocombustíveis no Brasil traz grandes desafios e oportunidades ambientais, principalmente sobre uma das principais fontes poluentes das usinas, a vinhaça. Como há limites para a utilização da vinhaça na fertirrigação, uma das alternativas é a sua biodigestão mediante fermentação anaeróbia.

3.2 Fermentação Acetona-Butanol-Etanol (ABE)

Um dos processos microbiológicos mais antigos para a produção comercial de solventes é a fermentação Acetona-Butanol-Etanol (ABE). A produção de butanol por microrganismos foi descoberta por Pasteur em 1861. Acetona, butanol e etanol são os principais produtos desta fermentação bacteriana anaeróbia, conhecida por fermentação ABE (LINDEN et al., 1985). A fermentação ABE é um processo industrial que utiliza bactérias do gênero *Clostridium* para converter açúcares em solventes. A fermentação ocorre em duas etapas: a primeira, chamada de fase acidogênica, é uma fase de crescimento em que os ácidos acético e butírico são produzidos rapidamente, fazendo com que o pH do meio diminua. A segunda fase, também chamada solventogênica, é caracterizada pela reassimilação dos ácidos para produção de solventes. A fermentação também produz dióxido de carbono e hidrogênio (GREEN, 2011). A Figura 1 ilustra a rota metabólica de *Clostridium acetobutylicum*, onde a bactéria sintetiza ácidos a partir da glicose, que são reassimilados para produção de acetona, butanol e etanol.

Figura 1 – Rotas bioquímicas do metabolismo da glicose por *Clostridium acetobutylicum*



Fonte: Santos (2015)

Os maiores desafios tecnológicos para a fermentação ABE estão relacionados com o baixo rendimento de butanol e a inibição pelo produto durante a fermentação. A fermentação ABE dura em média de 36 a 72 horas, quando cerca de 15 a 20 g/L de solventes na proporção

habitual 3:6:1 são acumulados dependendo da cultura e das matérias-primas utilizadas. O butanol é altamente tóxico para as bactérias que catalisam sua produção, limitando-se a que 13 g/L de butanol seja produzido durante uma fermentação em batelada. Comparativamente, na fermentação para produção de etanol, as células de levedura toleram concentrações aproximadamente dez vezes maiores. Considerando-se a toxicidade do butanol para a cultura bacteriana as concentrações de substrato limitam-se a 60 g/L (MARIANO e MACIEL FILHO, 2012).

A toxicidade do butanol levou ao desenvolvimento de processos de recuperação dos solventes produzidos de maneira integrada à fermentação. Desse modo, a recuperação simultânea reduz o efeito de inibição pelo produto e permite aumento na concentração de substrato, que resulta na melhoria da produtividade e minimização da geração de efluentes. Várias técnicas vêm sendo estudadas nas últimas três décadas objetivando a recuperação simultânea de butanol do caldo de fermentação, mantendo sua concentração no biorreator abaixo do limiar de toxicidade. Foram relatados processos como adsorção, dessorção (*gas stripping*), líquidos iônicos, extração líquido-líquido, pervaporação, separação aquosa de duas fases, extração supercrítica e perstração (EZEJI et al., 2007; QURESHI E EZEJI, 2008), no entanto ainda não existe um consenso sobre qual é mais eficiente e viável economicamente. Além disso, linhagens de bactérias geneticamente modificadas são capazes de tolerar concentrações mais elevadas de butanol.

A recuperação do butanol envolve a remoção conjunta da acetona, do etanol e da água, seguida da separação do butanol. Em instalações comerciais de fermentação do butanol, a separação dos subprodutos é realizada em uma série de cinco colunas de destilação, sendo as duas últimas responsáveis pela separação do butanol da água. A água residuária da destilação para obtenção do butanol contém ácido acético e butírico, células, proteínas e sólidos não fermentescíveis (MARIANO et al., 2011).

Devido ao crescente interesse de alguns setores industriais em empregar bio-solventes nos seus processos, somado às características atrativas do butanol como um biocombustível, existe uma tentativa de retomar a produção, sendo que algumas fábricas já estão operando na China e Brasil (GREEN, 2011). O butanol apresenta algumas vantagens com relação ao etanol. Seu conteúdo de energia é 30% maior do que o etanol, portanto mais próximo da gasolina; sua baixa pressão de vapor facilita sua aplicação em canais de abastecimento de gasolina já existentes; é menos inflamável e pode ser misturado à gasolina em qualquer proporção.

No entanto, segundo Mariano e Maciel Filho (2012), são gerados cerca de 80 litros de água residuária para cada litro de butanol produzido, o que acrescenta uma grande preocupação quanto à correta disposição desse resíduo no ambiente. Considerando a viabilidade econômica da produção de butanol devido o alto gasto energético, as pesquisas atuais tem como meta aumentar a produção de butanol para no mínimo 36 g/L. Além disso, devido à presença de concentrações de butanol na água residuária gerada, pode-se alcançar redução de até 60% na geração deste efluente se a meta mínima de concentração de butanol na fermentação for alcançada.

Segundo BRITO (2015), os substratos mais utilizadas para a produção de butanol em escala industrial são o milho, o melaço e o permeado de soro (subproduto da indústria de laticíneos); no entanto, apresentam custo elevado. Os clostrídeos estão bem adaptados à utilização de açúcares derivados de material celulósico, incluindo pentoses. Assim, uma boa oportunidade para redução de custos no processo é a utilização de fontes mais econômicas de matéria-prima, como resíduos agroindustriais, tais como o bagaço de cana-de-açúcar (GREEN, 2011).

Soluções para a vinhaça gerada durante a produção de etanol a partir de material lignocelulósico foram discutidas por Wilkie et al., (2000) que apoiou a digestão anaeróbia da vinhaça seguida de fertirrigação. Corazza (1999) descreveu tecnologia alternativa onde a vinhaça pode ser reciclada no processo de fermentação, tratada em reatores anaeróbios, ou empregada na produção de levedura, ração animal e até mesmo utilizadas na construção civil. Cabello et al., (2009) avaliaram o desempenho de um reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) contendo biomassa imobilizada no tratamento de vinhaça proveniente da usina de açúcar e álcool. O tratamento mostrou-se eficiente, medido em termos de diminuição da carga de Demanda Química de Oxigênio (DQO mg/L⁻¹) da vinhaça utilizada, sob condições mesofílicas. O inóculo utilizado foi lodo anaeróbio proveniente de um reator anaeróbio de tratamento de águas residuárias. A eficiência máxima na operação foi de 57,1%, correspondendo a um tempo de operação de 14 dias, carga orgânica da vinhaça de 19,5 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ e tempo de retenção hidráulica de um dia.

O glicerol é um subproduto da fermentação de etanol e a sua concentração na vinhaça fina varia de 5,1 a 24,6 g/L (DOWD et al., 1994; GONZALEZ et al., 2010; KIM et al., 2008). *C. pasteurianum* DSM 525 é capaz de produzir butanol utilizando glicerol como única fonte de carbono e energia (BIEBL, 2001). Outros compostos orgânicos presentes na vinhaça fina são os ácidos láctico e acético, que são produzidos principalmente por contaminação bacteriana no

processo de fermentação do etanol (SKINNER; LEATHERS, 2004). Ahn et al., (2011) investigaram a fermentação para produção de butanol por *Clostridium pasteurianum* DSM 525, utilizando vinhaça contendo glicerol como substrato. Os autores verificaram que a bactéria produziu de 6,2 a 7,2 g/L de butanol, utilizando o glicerol presente na vinhaça como a principal fonte de carbono. O ácido láctico na vinhaça atuou como agente de tamponamento, mantendo o pH do meio no intervalo de 5,7 a 6,1. Os resultados encontrados no trabalho demonstraram a viabilidade econômica da produção de butanol utilizando vinhaça como substrato, com potencial para proporcionar todos os nutrientes necessários para a fermentação.

No entanto, uma eventual produção de butanol em escala anual de bilhões de litros faz com que grande quantidade de água residuária seja gerada, o que se tornará um grande problema ambiental, especialmente em países como o Brasil, onde a disposição de vinhaça para fertirrigação é controversa, mas largamente utilizada pelas usinas de etanol.

3.3 Avaliação de toxicidade e genotoxicidade de efluentes

Segundo Herkovits et al. (1997) a crescente degradação do ambiente aquático por contaminantes produzidos pela atividade humana tem motivado esforços em avaliar os efeitos dos poluentes em diversos sistemas biológicos. Os seres vivos estão expostos à ação de numerosos agentes potencialmente tóxicos, que podem ser de natureza física, química ou biológica. A ação conjunta desses agentes pode provocar nos organismos, efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e, em alguns casos, genéticos (ARNAIZ, 1995).

De acordo com a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 1994) as substâncias tóxicas persistem e se acumulam no meio, comprometendo a fauna e a flora. A espécie humana pode ser afetada por meio da transferência dos contaminantes pela cadeia trófica ou pela água de abastecimento. Os efluentes industriais normalmente contêm misturas complexas de compostos químicos, que podem tornar-se perigosos para a saúde humana pela indução de alterações genéticas (DEWHURST et al., 2002).

Atualmente, sabe-se que diversas descargas industriais contêm muitas substâncias que podem não apresentar efeito agudo, mas que são capazes de comprometer em longo prazo, a sobrevivência de um organismo, por promover danos ao material genético de suas células somáticas e germinativas. Tais danos têm sido relacionados a desordens genéticas hereditárias e ao câncer (MORAES e JORDAO, 2002).

Os resíduos ou lodos produzidos pelas atividades industriais, contendo misturas complexas de compostos químicos desconhecidos, quando dispostos em aterros inadequados podem causar riscos a saúde, sendo essencial o tratamento dos resíduos antes de sua disposição final.

A interação entre diferentes métodos de avaliação de potenciais tóxicos e genotóxicos fornecem uma visão mais global e abrangente sobre o efeito de um agente químico. Os testes toxicológicos e genéticos fornecem dados compreensíveis sobre os efeitos prejudiciais em organismos teste, além de permitir a avaliação dos efeitos combinados de substâncias tóxicas e mutagênicas sobre os organismos (FISKESJO, 1988; LEME e MARIN-MORALES, 2009). Os testes de toxicidade estabelecem limites de concentração ou quantidade de substâncias químicas aceitáveis no ambiente, por meio de estudos sobre os efeitos tóxicos dessas substâncias nos organismos e nos ecossistemas. Desta forma, testes de toxicidade representam uma ferramenta para avaliações dos efeitos de agentes tóxicos sobre organismos vivos, fundamentando-se no princípio da resposta dos organismos ser proporcional à dose do tóxico a que foram submetidos (JARDIM, 2004; MOZETO e ZAGATTO, 2006). Deve-se considerar que o efeito tóxico sobre os sistemas biológicos é exercido pela ação combinada de todas as substâncias nocivas presentes no meio, incluindo aquelas que não são tóxicas por si mesmas, mas que afetam as propriedades físico-químicas do sistema e consequentemente as condições de vida dos organismos (RONCO et al., 2004).

Os efeitos de agentes tóxicos sobre espécies aquáticas podem ser avaliados mediante ensaios de toxicidade aguda, que são caracterizados por estimar a concentração do agente tóxico capaz de produzir uma resposta mensurável em um organismo-teste, em um período de tempo relativamente curto de seu ciclo de vida, geralmente de 24 a 96 horas. Normalmente, a resposta é medida em termos de letalidade ou imobilidade, sendo os resultados expressos como CE50, que é a concentração da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos, em determinado período de exposição, nas condições de ensaio (COSTA, 2008). Desse modo, destaca-se a utilização de microcrustáceos planctônicos do gênero *Daphnia* spp, devido às condições de cultivo em laboratórios e sua homogeneidade populacional conferida pela sua reprodução partenogenética (NOUR et al., 2014).

O emprego de bioensaios com plantas representa uma ferramenta importante para avaliar a toxicidade e genotoxicidade do material solubilizado dos resíduos (SAURABH CHANDRA et al., 2005). Ensaios utilizando plantas superiores têm sido utilizados em estudos sobre a fitotoxicidade de águas e de sedimentos contaminados (FERNANDES et al., 2007; CZERNIAWSKA-KUSZA; KUSZA, 2011). Dentre elas, destacam-se a alface (*Lactuca sativa*)

amplamente utilizada em testes de fitotoxicidade (DING et al., 2009). Devido à sua sensibilidade e amplo cultivo no mundo todo, além da ampla variedade de parâmetros de toxicidade que podem ser avaliados, como taxa de germinação e alongamento das raízes (ŽALTAUSKAITĖ; ČYPAITĖ, 2008) essa espécie é recomendada por agências internacionais para ensaios de fitotoxicidade. Segundo Silva (2012), testes com alongamento de raiz de sementes foi padronizado e validado pelo Canadá e Estados Unidos (USEPA, 1996), sendo utilizado por diversos órgãos de proteção ambiental, como por exemplo, a USEPA (United States Environmental Protection Agency) e a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) no Setor de Qualidade do Solo, como uma das ferramentas para complementar a avaliação físico-química das águas residuárias e dos resíduos que serão dispostos em solo.

Ainda dentre as plantas superiores, a cebola (*Allium cepa*) é rotineiramente utilizada para avaliar contaminações ambientais e os mecanismos de ação de compostos químicos mediante avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Esse organismo teste é usado para esse fim devido ao rápido crescimento de suas raízes, ao grande número de células em divisão, à alta tolerância a diferentes condições de cultivo, à disponibilidade durante o ano todo, ao fácil manuseio e por possuir poucos e longos cromossomos, o que os tornam facilmente reconhecidos após coloração (CARITÁ, 2010; LEME; MARIN-MORALES, 2009). A frequência de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa* possibilita a determinação dos mecanismos de ação de diversos compostos genotóxicos e mutagênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO, FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011), além do impacto provocado sobre ambientes aquáticos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; LEME, ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008) e sobre o solo (SOUZA et al., 2009; 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Meios de cultura e soluções

Os seguintes meios de cultura foram utilizados no presente trabalho:

- Meio Nutrient Agar (Difco®) para contagem de Bactérias Aeróbias/Facultativas;
- Meio Plate Count Agar (Difco®) para contagem de Bactérias Aeróbias/Facultativas;
- Meio Sabouraud Dextrose Agar (Difco®) para contagem de Fungos e Leveduras;
- Meio para contagem de bactérias Anaeróbias “Reinforced Clostridial Medium” (RCM), adaptado de Ni, Wang e Sun (2012).

O RCM foi preparado dissolvendo-se os ingredientes descritos na Tabela 1 em 900 mL de água destilada. A glicose foi dissolvida em 100 mL de água destilada e esterilizada separadamente. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm. A solução de vitaminas da Tabela 2 foi esterilizada por filtração em membrana e adicionada após esterilização do meio (1 mL/L de meio).

Acrescentou-se solução de actidiona (5 ppm) esterilizada em todos os meios para contagem de bactérias e cloranfenicol (400 ppm) no preparo dos meios para contagem de fungos e leveduras.

Tabela 1 - Composição do Reinforced Clostridial Medium (RCM)

Componente	Concentração (g/L)
Peptona	10,0
Extrato de carne	10,0
Extrato de levedura	3,0
Glicose	30,0
Amido solúvel	1,0
Cloreto de sódio	5,0
L-cisteína	0,5
Fosfato monobásico de potássio	1,0
Fosfato dibásico de potássio	1,0
Acetato de amônio	1,1
Sulfato de amônio	2,0
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,02
Sulfato de magnésio	0,2
Sulfato de ferro heptahidratado	0,05
Agar	15,0

Tabela 2 - Solução de vitaminas do Reinforced Clostridial Medium (RCM)

Vitamina	Massa (g)
Ácido p-aminobenzóico	0,1
Biotina	0,04
Ácido nicotínico	0,1
Piridoxina	0,2
Riboflavina	0,1
Tiamina	0,1
Água destilada q.s.p.	100 mL

O meio de cultura sintético (MCS) utilizado nos ensaios de fermentação foi preparado adicionando-se as soluções descritas nas tabelas 3 à 7. Corrigiu-se o pH durante o ensaio utilizando solução saturada de bicarbonato de sódio e NaOH 6M

Tabela 3 - Solução de micronutrientes utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS)

Componente	Massa (g)
MgSO ₄ .7H ₂ O	6
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,5
MnSO ₄	0,6
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Tabela 4 - Solução de macronutrientes utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS)

Componente	Massa (g)
KH ₂ PO ₄	30
K ₂ HPO ₄	30
C ₂ H ₇ NO ₂	33
(NH ₄) ₂ SO ₄	75
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Tabela 5 - Solução de vitaminas utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS)

Vitamina	Massa (g)
Ácido nicotínico (B3)	1
Piridoxina (B6)	2
Riboflavina (B2)	1
Tiamina (B1)	1
Ácido p-aminobenzóico	0,1
Água destilada q.s.p.	200 mL

A solução de vitaminas foi esterilizada por filtração em membrana.

Tabela 6 - Solução de agente redutor utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS)

L-cisteína	40 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Tabela 7 - Solução tampão utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS)

NaHCO ₃	90 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

4.2 Resíduos

Os resíduos foram chamados, no presente trabalho, como “Vinhaça da Fermentação Anaeróbia” (Vinhaça FA). Foram utilizadas duas vinhaças FA:

- **Vinhaça FA (FEAGRI):** obtida junto ao Laboratório de Saneamento da Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI/UNICAMP), proveniente da fermentação acetona-butanol-etanol (ABE), utilizando meio de cultura sintético suplementado com doses de vinhaça de indústria sucro-alcooleira, visando à produção de álcoois e ácidos orgânicos (SANTOS, 2015);
- **Vinhaça FA (UNESP):** obtida realizando-se ensaios de fermentação anaeróbia no Laboratório de Toxicidade de Águas, do Depto. de Bioquímica e Microbiologia da UNESP campus de Rio Claro. Estes ensaios foram baseados no trabalho de Santos (2015), com pequenas alterações.

4.2.1 Obtenção da Vinhaça FA

4.2.1.1 Vinhaça FA (FEAGRI)

A Vinhaça FA (FEAGRI) foi produzida mediante ensaios de fermentação anaeróbia utilizando meio de cultura sintético suplementado com vinhaça e açúcar demerara (SANTOS 2015).

A vinhaça bruta utilizada foi proveniente da Usina São Martinho, localizada no município de Pradópolis, SP, e foi armazenada em freezer a -15 °C. Antes do uso, a vinhaça foi centrifugada a 6000 rpm por 5 minutos para separação de parte dos sólidos suspensos. A digestão anaeróbia foi realizada utilizando inóculo proveniente de um reator anaeróbio compartimentado (03 câmaras) de fluxos ascendente e descendente, localizado na estação de tratamento de bovinocultura de leite do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais. Este inóculo passou por dois processos de pré-tratamento, objetivando o favorecimento da prevalência dos microrganismos formadores de esporos (espécies solventogênicas como *Clostridium* sp):

- Tratamento Térmico (TT): Uma alíquota de 300 mL do inóculo, previamente peneirado em peneira de nylon para remoção dos sólidos maiores, foi submetida ao aquecimento até ebulição

por 30 minutos. Após a fervura, resfriou-se em banho de gelo e armazenou-se em refrigerador a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

- Choque Ácido/Térmico (AT): Uma alíquota de 300 mL do inóculo, previamente peneirado em peneira de nylon, foi submetida ao aquecimento em banho-maria a 80°C por 30 minutos. Em seguida, resfriou-se em banho de gelo e o pH foi corrigido para 3,0 com a adição de HCl 0,1 M. O inóculo tratado foi armazenado em refrigerador a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Para garantir as condições de anaerobiose da fermentação, gás nitrogênio (N_2 100%) foi fluxionado no meio líquido e no headspace por 5 minutos. Nos ensaios de fermentação, a vinhaça foi utilizada como meio de cultivo e o açúcar demerara como suplemento de fonte de carbono. A vinhaça foi diluída na proporção 1:3 (v/v) em meio de cultura sintético (MCS). Os ensaios realizados por Santos (2015), em regime de batelada utilizando-se dois tipos de tratamento do inóculo, tiveram duração de 7 dias. Todo o resíduo proveniente da fermentação foi coletado e preparado para utilização no presente trabalho, como descrito no item a seguir.

4.2.1.1.1 Preparação para utilização da Vinhaça FA (FEAGRI)

Após plaqueamento para quantificação dos microrganismos, o resíduo proveniente do trabalho de Santos (2015) foi reunido em uma única amostra e centrifugado para remoção da biomassa microbiana.

Em seguida, para que fossem eliminados os solventes eventualmente produzidos durante a fermentação (acetona, butanol e etanol) o sobrenadante recuperado foi submetido à rotaevaporação em Evaporador Rotativo Marconi (MA-120). Considerou-se a pressão necessária (acima de -404 mmHg) para a evaporação dos três solventes em banho-maria com temperatura entre 45 a 50°C . A seguir o resíduo foi aquecido a 80°C por 15 minutos, para garantir a evaporação de álcoois e ácidos voláteis que pudessem ainda estar presentes. Dessa forma, a Vinhaça FA (FEAGRI) consiste basicamente de um meio de cultura sintético suplementado com vinhaça etanólica, após o processo de fermentação anaeróbia. Este resíduo é isento de biomassa bacteriana, solventes e ácidos orgânicos voláteis, consistindo em fração inorgânica e açúcar residual.

4.2.1.2 Vinhaça FA (UNESP)

A Vinhaça FA (UNESP) foi produzida no Laboratório de Toxicidade de Águas do Depto. de Bioquímica e Microbiologia da Unesp de Rio Claro. O ensaio de fermentação anaeróbia foi baseado no trabalho de Santos (2015).

4.2.1.2.1 Vinhaça bruta

A vinhaça bruta usada nos ensaios de fermentação anaeróbia foi obtida na Usina São João, localizada no município de Araras, SP, e mantida congelada antes de sua utilização.

4.2.1.2.2 Pré-tratamento do inóculo

A fermentação anaeróbia foi realizada utilizando-se o mesmo inóculo do trabalho de Santos (2015) para a obtenção da Vinhaça FA (FEAGRI), ou seja, inóculo proveniente de estação de tratamento de bovinocultura de leite. Este inóculo passou novamente pelo processo de pré-tratamento Ácido/Térmico (AT), objetivando selecionar os microrganismos termorresistentes (espécies solventogênicas como *Clostridium* sp). Para isso, 300 mL do inóculo proveniente da Vinhaça FA (FEAGRI) foi aquecido em banho-maria a 80°C por 30 minutos. Em seguida, resfriou-se em banho de gelo e o pH foi corrigido para 3 com a adição de HCl 0,1 M. O inóculo tratado foi armazenado em refrigerador a 5±2°C até o momento do uso.

4.2.1.2.3 Crescimento do inóculo

Adicionou-se 20 mL do inóculo pré-tratado à 180 mL de meio Reinforced Clostridial Medium (RCM) estéril (Tabelas 1 e 2) ajustado a pH 6,8. Para garantir as condições de anaerobiose, gás nitrogênio (N₂ ultrapuro) foi fluxionado no meio líquido e no headspace por 5 minutos. O frasco foi incubado a 35°C por cerca de 40 horas. Este processo foi repetido 3 vezes descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 180 mL de meio RCM estéril, para aumento da biomassa bacteriana. Após esse procedimento, o inóculo foi armazenado em refrigerador a 5±2°C até o momento do uso.

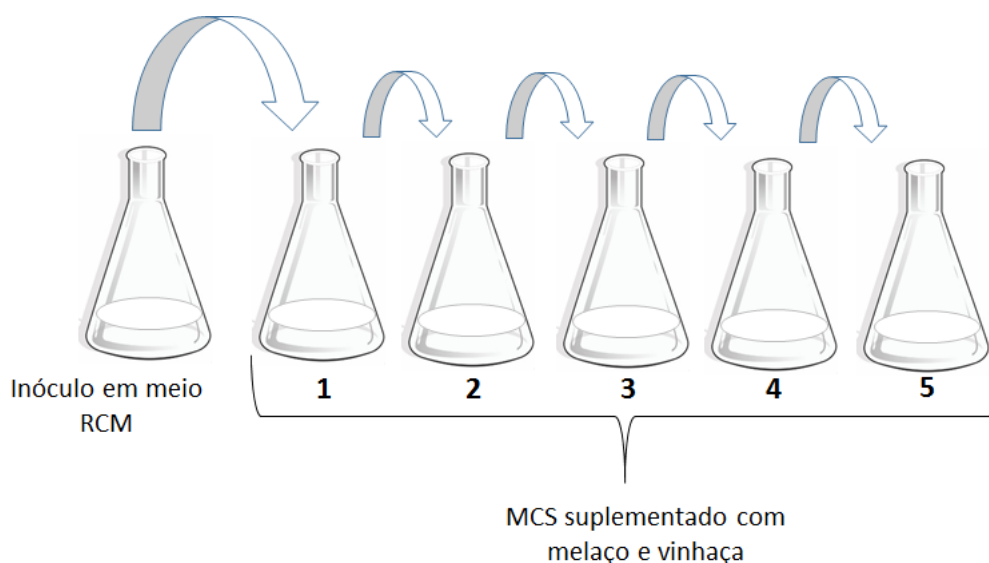
4.2.1.2.4 Adaptação do inóculo ao melaço e à vinhaça

Adicionou-se 15 mL do inóculo ao Meio de Cultura Sintético (MCS) suplementado com melaço e vinhaça bruta em concentrações crescentes, conforme protocolo da Tabela 8. Os frascos foram mantidos em condições de anaerobiose a 35°C por 24 horas em cada concentração utilizada. A transferência do inóculo dos frascos de menor concentração para maior concentração visou sua adaptação progressiva (Figura 2). Este processo foi repetido 4 vezes descartando-se o sobrenadante e adicionando-se cerca de 285 mL de MCS estéril, para aumento da biomassa bacteriana. Após o procedimento de adaptação, o inóculo foi armazenado em refrigerador a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

Tabela 8 - Protocolo do ensaio de adaptação do inóculo ao Meio de Cultura Sintético (MCS) suplementado com melaço e vinhaça bruta em concentrações crescentes

	Frascos				
	1	2	3	4	5
Melaço (% de ART)	1,0	2,0	4,0	6,0	6,0
Micronutrientes (mL)	10	10	10	10	10
Macronutrientes (mL)	10	10	10	10	10
Extrato de levedura (g)	1	1	1	1	1
Vitaminas (mL)	2	2	2	2	2
Tampão (mL)	10	10	10	10	10
Agente redutor (mL)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Vinhaça bruta (mL)	50	50	100	150	200
Inóculo (mL)	15	15	15	15	15
Volume total (mL)	300	300	300	300	300

Figura 2 - Fluxograma do ensaio de adaptação do inóculo ao melaço e à vinhaça



Fonte: Elaborado pelo autor

As concentrações de açúcar presentes no MCS foram calculadas a partir da determinação dos açúcares redutores totais (ART) presentes no melaço e na vinhaça.

4.2.1.2.4.1 Determinação de açúcares redutores totais (ART) presentes no melaço e na vinhaça.

Para que fosse adicionada a quantidade desejada de açúcar no ensaio de fermentação para a produção da Vinhaça FA (UNESP), determinou-se o teor de açúcares redutores totais (ART) presentes no melaço e na vinhaça bruta utilizados mediante o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). As amostras passaram por hidrólise ácida para quantificação de açúcares não redutores, ou seja, conversão da sacarose em açúcares redutores, glicose e frutose. A curva padrão foi obtida com solução de glicose (1mg/mL), e os cálculos foram realizados a partir da equação: $y = 2,455x - 0,062$ ($R^2 = 0,998$). Os resultados estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9 – Teor de açúcares redutores totais (ART) presentes nas amostras de melaço e vinhaça bruta utilizados no ensaio de fermentação

Amostra	ART (g/L)
Melaço	380,00
Vinhaça bruta	1,18

4.2.1.2.5 Ensaio de fermentação

Para a fermentação anaeróbia foram utilizados frascos de 500 mL adaptados para a entrada e saída de gases, bem como para amostragem com seringa, como apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Frasco reator com adaptação de dispositivo para entrada e saída de gases



Fonte: O autor

O ensaio de fermentação anaeróbia para a produção da vinhaça FA (UNESP) foi realizado utilizando o inóculo adaptado ao melaço e à vinhaça (frasco 5 da Figura 2). Meio de cultura sintético (MCS) foi suplementado com melaço e/ou vinhaça segundo o protocolo da Tabela 10, onde as soluções de melaço foram utilizadas calculando-se a porcentagem de ART presentes.

Tabela 10 - Protocolo do ensaio de fermentação anaeróbia para obtenção de vinhaça FA (UNESP)

	Ensaio									
	C	vinhaça	C	vinhaça + melaço 4%ART	C	vinhaça + melaço 6%ART	C	vinhaça + melaço 6%ART - macro e micro nutrientes	C	melaço 6%ART
Solução de melaço (mL)			75	60	60	45	87	72	260	245
Micronutrientes (mL)	10	10	10	10	10	10			10	10
Macronutrientes (mL)	10	10	10	10	10	10			10	10
Extrato de levedura (g)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vitaminas (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tampão (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Agente redutor (mL)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Vinhaça bruta (mL)	200	200	192	192	200	200	200	200		
Inóculo (mL)		15		15		15		15		15
Água destilada (mL)	67	52			7	7			7	7
Volume total (mL)	300,75	300,75	300,75	300,75	300,75	300,75	300,75	300,75	300,75	300,75

C = controle

O pH inicial de cada amostra foi ajustado para $6,90 \pm 0,05$ com soluções NaOH e HCl 6M. Os frascos contendo as amostras foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 minutos. As soluções de melaço e vitaminas foram esterilizadas separadamente e adicionadas após esterilização dos frascos em autoclave. Após adição do inóculo, gás N_2 foi fluxionado no meio líquido e no headspace por 5 minutos para manter as condições de anaerobiose dos ensaios. Em seguida as amostras foram incubadas em shaker a 37°C e 60 rpm por 72 horas. Após esse período, foi cessada a agitação e o ensaio prosseguiu com as amostras incubadas a 37°C até o sétimo dia.

4.2.1.2.5.1 Quantificação de bactérias anaeróbias

A quantificação de bactérias anaeróbias (inóculo) foi realizada no início e no final do ensaio de fermentação, conforme procedimento descrito no item 4.3.2 (Análises microbiológicas).

4.2.1.2.5.2 Densidade óptica

Para acompanhamento do crescimento do inóculo bacteriano, foram realizadas amostragens em dias alternados. Centrifugou-se 10 mL das amostras com 10 mL de solução NaCl (0,85%) durante 20 minutos a 8000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e a biomassa foi centrifugada novamente com 5 mL de solução NaCl (0,85%). O sobrenadante foi descartado e a biomassa ressuspensa em 10 mL de água destilada. A leitura da densidade óptica foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, com as amostras diluídas em água destilada. Os controles utilizados foram as respectivas amostras do ensaio de fermentação, que passaram pelo mesmo processo de centrifugação e ressuspensão dos sólidos dissolvidos.

4.2.1.2.5.3 Quantificação de solventes

A quantificação final dos solventes acetona, butanol e etanol eventualmente produzidos durante o processo de fermentação anaeróbia foi realizada mediante Cromatografia Gasosa. As amostras foram pré-tratadas misturando-se uma alíquota de 4 mL de cada amostra a 0,5 mL de uma solução saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,3 M e 0,5 mL de uma solução 5% de ZnSO_4 , centrifugando a 6000 rpm por 10 min. Este tratamento foi utilizado por Sydney (2013) para retirada dos sólidos em suspensão. O sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose com poro 0,2 μm .

Utilizou-se equipamento SHIMADZU® GC2014, equipado com detector de ionização em chama (FID = Flame Ionization Detector, 200°C), coluna RTX-5 (Restek) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm e nitrogênio como gás de arraste (1,19 mL/min; total 50mL/min; pressão 100 Kpa). Curvas de calibração foram obtidas utilizando-se padrões com no mínimo 99% de pureza (acetona e etanol, Synth®; 1-butanol, Êxodo Científica®) nas concentrações de 1.000 a 20.000 ppm. O volume de 1 μL de cada amostra foi injetado manualmente (modo de injeção Splitless) com temperatura do injetor de 200°C. Para as análises de acetona e butanol, a temperatura inicial do forno foi de 80°C/1 min, com rampa de aquecimento de 30°C/min até 140°C por 3 minutos. O tempo de corrida foi de 6 minutos, e os tempos de retenção foram de 2,020 e 2,379 minutos para acetona e butanol, respectivamente. Para análise de etanol, a rampa de aquecimento foi de 20°C/min até 140°C por 3 minutos. O tempo de corrida foi de 4 minutos e o tempo de retenção foi de 2,042 minutos.

4.2.1.2.5.4 Quantificação de ácidos orgânicos

Realizou-se quantificação dos seguintes ácidos orgânicos produzidos após o processo de fermentação anaeróbia, mediante Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): ácido succínico, ácido lático, ácido acético, ácido isobutírico e ácido butírico. Utilizou-se equipamento SHIMADZU[®], equipado com bomba LC-10Ai, amostrador automático Sil-10Ai, forno CTO-20A, dois detectores ligados em série: um detector de ultravioleta, do modelo SDP-10Ai e um detector por índice de refração RID-10A, além do controlador CBM-20A. Foi utilizada coluna Rezex ROA[®] (300 mm x 7,8 mm; Phenomenex), e o software LC Solution (SHIMADZU[®]) para análise dos resultados.

Curvas de calibração foram obtidas utilizando-se padrões com 99% de pureza (Sigma[®]). Utilizou-se como fase móvel H₂SO₄ (0,005M), sem gradiente de concentração, com fluxo de 0,5 mL/min. As condições operacionais foram: temperatura do forno de 43°C e comprimento de onda do detector de 210 nm. As amostras foram pré-tratadas como descrito no item 4.2.1.2.5.3 e o volume de injeção foi de 20 microlitros.

4.3 Ensaaios com a Vinhaça FA (FEAGRI)

4.3.1 Análises físico-químicas

Para a caracterização da vinhaça FA (FEAGRI), bem como a vinhaça bruta utilizada no processo de fermentação para obtenção da Vinhaça FA (UNESP), as amostras foram submetidas à análises físico-químicas baseadas na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) e também nos parâmetros exigidos pelo Decreto No. 8.468, de 8/9/1976, Governo do Estado de São Paulo, Artigo 19-A para lançamento de efluentes em esgoto (SÃO PAULO, 1976), conforme descrito nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos analisados baseados na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006)

Local: Laboratório de Toxicidade de Águas (UNESP/Rio Claro)		
Parâmetro	Método	Referência
Demanda Bioquímica de Oxigênio	5210 B	APHA (1998)
Demanda Química de Oxigênio	5220 D	
Nitrogênio Total	Kjeldahl 928.08	AOAC (1995)
Oxigênio dissolvido (OD)	4500-O G	APHA (1998)
Condutividade elétrica	2510 B	
Série de sólidos	2540 B-E	
Local: Laboratório Externo		
Sulfato	3030E; 6010 C	APHA (2012); USEPA (2007)
Sulfeto	4500-S2 D	APHA (2012)
Manganês	3030E; 6010 C	APHA (2012); USEPA (2007)
Cálcio	3030E; 6010 C	
Magnésio	3030E; 6010 C	
Sódio	3030E; 6010 C	
Potássio	3030E; 6010 C	
Fosfato total	4500P	APHA (2012)

Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos analisados baseados no Artigo 19-A do Decreto No. 8.468 (SÃO PAULO, 1976)

Local: Laboratório de Toxicidade de Águas (UNESP/Rio Claro)		
Parâmetro	Método	Referência
pH	4500 B	APHA (2012)
Sólidos sedimentáveis	2540 F	
Local: Laboratório Externo		
Arsênio	7062; 6010 C	USEPA (1994;2007)
Mercúrio	7470 A; 6010 C	
Prata	3030 E; 6010 C	APHA (2012); USEPA (2007)
Selênio	3030 E; 6010 C	
Estanho	3030 E; 6010 C	
Fluoretos	4500 F	APHA (2012)
Sulfeto	4500-S2 D	
Sulfato	3030 E; 6010 C	APHA (2012); USEPA (2007)

4.3.2 Análises microbiológicas

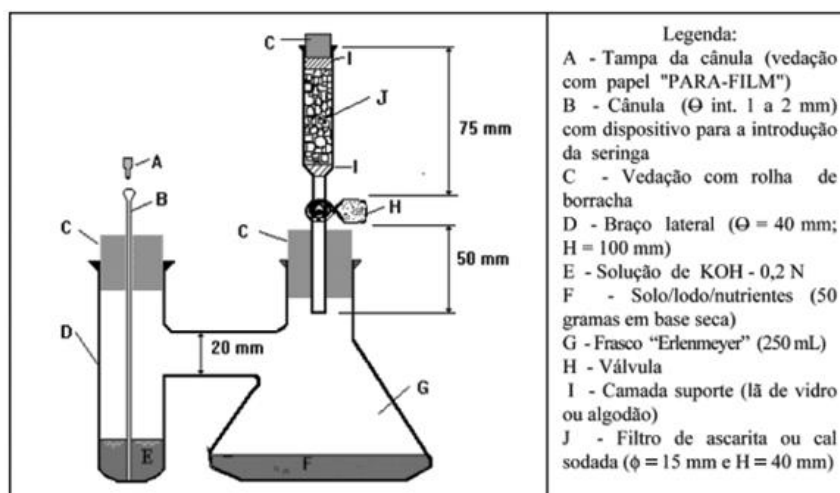
- Contagem de bactérias aeróbias/facultativas: as amostras foram plaqueadas mediante a técnica “Pour Plate” em meio “Nutrient Agar”, e incubadas a 35±2°C por 48 horas;

- Contagem de fungos e leveduras: as amostras foram plaqueadas mediante a técnica de superfície em meio Sabouraud, e incubadas a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 5 dias;
- Contagem de bactérias anaeróbias: as amostras foram plaqueadas mediante a técnica “Pour Plate” em meio para Anaeróbios RCM (Tabela 1). A incubação foi realizada em jarra contendo envelope gerador de anaerobiose Gaspak, a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas.

4.3.3 Avaliação de biodegradação em solo

Os ensaios de biodegradação foram realizados de acordo com OECD (2002), com temperatura de incubação de 28°C , para avaliar a evolução da produção de CO_2 em solo contendo o resíduo em estudo. Utilizou-se respirômetro de Bartha & Pramer (1965), que consiste em um sistema fechado, com duas câmaras interligadas, onde ocorrem a biodegradação do resíduo e a remoção do CO_2 produzido durante o processo (Figura 4).

Figura 4 - Respirômetro de Bartha



Fonte: ABNT 1999

Este método considera que existe uma correlação entre a produção de CO_2 e a biodegradação da matéria orgânica (amostra) presente no solo. A eficiência da degradação da amostra é determinada pela quantidade de CO_2 produzido, permitindo determinar o tempo de estabilização do resíduo em diferentes taxas de aplicação.

4.3.3.1 Solo utilizado no ensaio de respirometria

Solo argiloso foi coletado de acordo com a norma técnica L.6.245 da Cetesb (1984), de camadas superficiais de locais não contaminados, nas coordenadas geográficas: Latitude - 22.39624915/Longitude -47.5431633, localizados no município de Rio Claro, no Estado de São Paulo, Brasil. As Tabelas 13 e 14 mostram as características físico-químicas do solo, analisadas pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo Ltda. (ICASA).

Tabela 13 - Características físicas do solo controle utilizado no ensaio de respirometria

Composição granulométrica (%)						
Areias				Classe	Sub-classe	
	Grossa	Fina	Argila	Limo		
Solo	24,4	11,9	25,9	37,8	Argiloso	Argiloso

Tabela 14 - Características químicas do solo controle, macro e micronutrientes

Macronutrientes (mmolc/dm ³) IFSA								V	Relações	
	K	Ca	Mg	H ⁺ Al	Al	SB	CTC	%	Ca/Mg	Mg/K
Solo	4,9	43	15	34	1	63	97	64,9	2,86	3,06
Micronutrientes (mg/dm ³)								pH	MO	P res
	S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	CaCl ₂	g/dm ³	g/dm ³
Solo	8	3	19	26,2	1,4	1,9	0,18	5,5	34	3,0

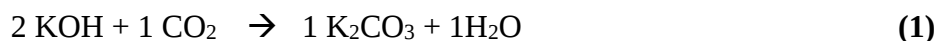
Determinações de: - P, K, Ca, Mg: Resina trocadora aniônica + catiônica; - Fe, Mn, Ca, Zn: Extrator DTPA-TEA; - B: Extrator cloreto de bário 0,125%.

4.3.3.2 Ensaio de respirometria

Avaliou-se 3 concentrações de Vinhaça FA (FEAGRI) no solo: 3; 6 e 12% na presença e ausência de um inóculo comercial (VCTEC/ ByoAct), que reúne um pool de microrganismos isolados do solo. Os controles negativos consistiram em amostras contendo somente solo e solo + inóculo. Cada um dos tratamentos foi realizado em triplicata. A cada um dos frascos respirométricos adicionou-se 50 g da mistura de solo + resíduo + inóculo. Ajustou-se o teor de umidade das misturas, utilizando-se 60% da capacidade de campo. Os respirômetros foram incubados em estufa a 28±2°C.

Nos respirômetros o CO₂ gerado pela atividade microbiana em seu interior foi absorvido pela solução de KOH (10 mL, 0,2 N) adicionada ao braço lateral do frasco. A reação do CO₂

com a solução de KOH no interior do respirômetro teve como resultado o consumo do KOH e produção estequiométrica do carbonato de potássio (K_2CO_3), como esquematizado na equação (1):



A geração de CO_2 no sistema é consequência da biodegradação do carbono orgânico presente na amostra. Entretanto, nem todo carbono biodegradado é diretamente convertido a CO_2 , sendo considerado que 50% do carbono biodegradado fica retido no solo, na forma de húmus e biomassa. Dessa forma a quantidade total de carbono biodegradado foi expressa pela equação (2):

$$\text{Quantidade total de carbono biodegradado } (\mu\text{mol}) = 2 \times \text{CO}_2 \text{ produzido } (\mu\text{mol}) \quad (2)$$

A partir da determinação da quantidade de carbono biodegradado durante o período de execução do ensaio, a eficiência da biodegradação (EB) foi calculada por meio da equação (3):

$$\text{EB\%} = \frac{\text{Quantidade total de carbono biodegradado } (\mu\text{mol})}{\text{Quantidade de carbono orgânico inicial no solo } (\mu\text{mol})} \times 100 \quad (3)$$

No cálculo da Eficiência de Biodegradação (EB) para cada amostra foi considerado somente a geração acumulada de CO_2 devido ao resíduo e ao resíduo + inóculo.

4.3.3.3 Análise microbiológica do ensaio de respirometria

Bactérias heterotróficas e fungos foram quantificados nas amostras contidas nos respirômetros no início e no final do ensaio, mediante plaqueamento em meio PCA contendo actidiona (5 ppm) e meio Sabouraud contendo cloranfenicol (400 ppm), respectivamente. A quantificação de bactérias foi realizada através da técnica “Pour Plate”, onde as placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas; e a quantificação de fungos e leveduras foi realizada pela técnica de espalhamento em superfície (“Spread-Plate”), onde as placas foram incubadas a 28 °C por 5 dias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g solo).

4.3.3.4 Ensaios de Toxicidade dos solubilizados

Solubilizados das amostras contidas nos respirômetros foram realizados no início e no final do ensaio, na concentração de 10% em água destilada, deixada sob agitação em shaker por 30 minutos e em seguida decantando por 7 dias. O sobrenadante foi utilizado para ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia similis*, de acordo com NBR 12713 (ABNT, 2009).

4.3.4 Ensaios toxicológicos

4.3.4.1 Ensaios de toxicidade com *Daphnia similis*

Os ensaios de toxicidade aguda com o microcrustáceo *D. similis* foram realizados no Laboratório de Toxicidade de Águas do Depto. de Bioquímica e Microbiologia, segundo NBR 12713 (ABNT, 2009). Os ensaios consistiram em expor 5 organismos jovens (neonatos) entre 6 e 24 horas de idade em 10 mL de cada amostra, em diferentes concentrações. Foram realizadas 4 réplicas. O controle foi realizado somente com água de diluição. Os tubos de ensaio contendo os organismos foram mantidos no escuro, a $20^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, sem alimentação. A leitura foi realizada verificando-se o número de organismos móveis e imóveis.

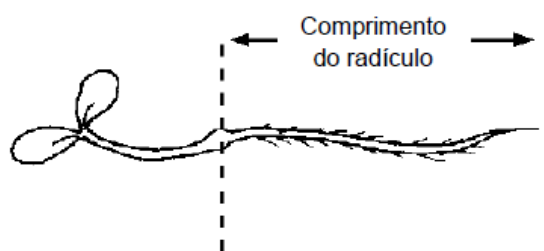
4.3.4.2 Ensaio de Germinação de sementes

Os ensaios foram conduzidos segundo OPPTS 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test (EPA, 1996), utilizando-se sementes de alface (*Lactuca sativa*), com as seguintes características:

- Alface Baba de verão (manteiga);
- Marca: ISLA PAK;
- Lote: 32135-S2;
- 96% de germinação;
- Validade: 08/2016;
- Pureza: 99,8%.

Os parâmetros utilizados foram a presença ou ausência de germinação e comprimento da raiz. A Figura 5 indica os pontos de referência para efetuar as medidas do comprimento da raiz.

Figura 5 - Indicação dos pontos de medição do comprimento da raiz de alface



Fonte: University Center for Environmental Inquiry at Cornell (2009)

Os resultados foram analisados mediante cálculos de acordo com as equações 4, 5 e 6.

Índice de Germinação

$$IG = \frac{\text{n}^\circ \text{sementes germinadas amostra} \times \text{comprimento médio raiz amostra}}{\text{n}^\circ \text{sementes germinadas controle} \times \text{comprimento médio raiz controle}} \times 100 \quad (4)$$

Germinação relativa

$$GR(\%) = \frac{\text{n}^\circ \text{sementes germinadas amostra}}{\text{n}^\circ \text{sementes germinadas controle}} \times 100 \quad (5)$$

Crescimento relativo

$$CR(\%) = \frac{\text{média do crescimento das raízes amostra}}{\text{média do crescimento das raízes controle}} \times 100 \quad (6)$$

4.3.4.3 Ensaio de Mutagenicidade com *Allium cepa*

Ensaio de genotoxicidade ambiental foi realizado com sementes de cebola (*A. cepa*), de acordo com metodologia descrita por Mazzeo et al. (2015). As sementes utilizadas foram “Cebola Baia Periforme”, adquiridas de Isla® (Isla Sementes Ltda., Brazil), Lote 42011-S2 com 89% de germinação e pureza de 100%. O ensaio foi realizado em triplicata, com 50 sementes em cada placa, utilizando vinhaça FA nas concentrações de 6; 12 e 20%. O controle negativo foi realizado com água ultrapura e o controle positivo com um agente genotóxico

conhecido, de ação clastogênica, o metanosulfonato de metilo (MMS - Sigma-Aldrich - CAS: 66-27-3), na concentração de 10 mg/L. A exposição das sementes às amostras foi realizada em placas de Petri com papel de filtro, mantidas em incubadora a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Quando as raízes atingiram cerca de 1,5 a 2,0 cm de comprimento (cerca de 120 h de exposição), as sementes foram colhidas e fixadas em Carnoy I (3:1 - etanol/ácido acético - v/v). As lâminas foram preparadas de acordo com Bianchi et al. (2011), em que as raízes fixas foram submetidas à hidrólise ácida com HCl (1 M), durante 10 min a 60°C , seguido por coloração com reagente de Schiff, durante 2 h. Em seguida, as regiões meristemáticas das raízes de *A. cepa* foram seccionadas em lâminas, contrastadas com carmim acético (2%), cobertas com lamínula e cuidadosamente esmagadas. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e, após secagem, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico. Observou-se 6000 células por tratamento. Os efeitos citotóxicos foram determinados pela frequência do Índice Mitótico (IM) e pelo Índice de Morte Celular (IMC). Os efeitos genotóxicos foram determinados por aberrações cromossômicas utilizando-se o Índice de Alterações Cromossômicas (IAC); enquanto os efeitos mutagênicos foram determinados pela ocorrência de micronúcleos (MN) e quebras cromossômicas (QC), através do Índice de Mutagenicidade (IMt), segundo as equações 7, 8, 9 e 10.

$$\text{IM (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células em divisão celular}}{\text{total de células observadas}} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{IMC (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células em morte celular}}{\text{total de células observadas}} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{IAC (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células alteradas}}{\text{total de células observadas}} \times 100 \quad (9)$$

$$\text{IMt (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células com MN e QC}}{\text{total de células observadas}} \times 100 \quad (10)$$

4.4 Análises Estatísticas

4.4.1 Ensaio de respirometria para avaliação de biodegradação em solo

O teste de Friedman (ZAR, 1999), que é um teste não-paramétrico, foi utilizado para avaliar os resultados do ensaio de biodegradação por respirometria, bem como a quantificação de microrganismos. O nível de significância foi de 95%.

4.4.2 Ensaio de toxicidade aguda com *D. similis*

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber, utilizando o software Jspear (HAMILTON et al., 1977).

4.4.3 Ensaio de mutagenicidade com *A. cepa*

No ensaio de genotoxicidade ambiental com *A. cepa* utilizou-se o software Bioestat 5.0. O teste estatístico paramétrico ANOVA foi utilizado para os dados que apresentaram distribuição normal (índice mitótico e germinação); enquanto o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para os dados que não apresentaram distribuição normal (morte celular, genotoxicidade e mutagenicidade).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Vinhaça FA (FEAGRI)

5.1.1 Análise Microbiológica

O resíduo obtido junto ao Laboratório de Saneamento da Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI/UNICAMP) foi submetido ao ensaio microbiológico para verificação da presença de microrganismos cujos resultados estão registrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Quantificação de bactérias e fungos presentes na vinhaça FA expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Amostra	UFC/mL		
	Bactérias aeróbias/ facultativas (10^8)	Bactérias anaeróbias (10^8)	Fungos/leveduras
AT	5,00	10,50	<1
TT	4,95	2,68	<1

AT: vinhaça FA gerada a partir de inóculo que passou por tratamento Ácido-Térmico

TT: vinhaça FA gerada a partir de inóculo que passou por tratamento Térmico

A quantificação de microrganismos na vinhaça FA mostrou que o tratamento ácido-térmico do inóculo utilizado na fermentação foi mais eficiente para selecionar maior quantidade de bactérias anaeróbias ($10,50 \times 10^8$ UFC/mL). Esse resultado está de acordo com os dados de Santos (2015), que obteve a maior produção de etanol utilizando este inóculo ($3,42 \pm 0,38$ g/L).

A ausência de fungos e leveduras é uma evidência de que a produção de etanol foi conduzida exclusivamente por fermentação bacteriana anaeróbia.

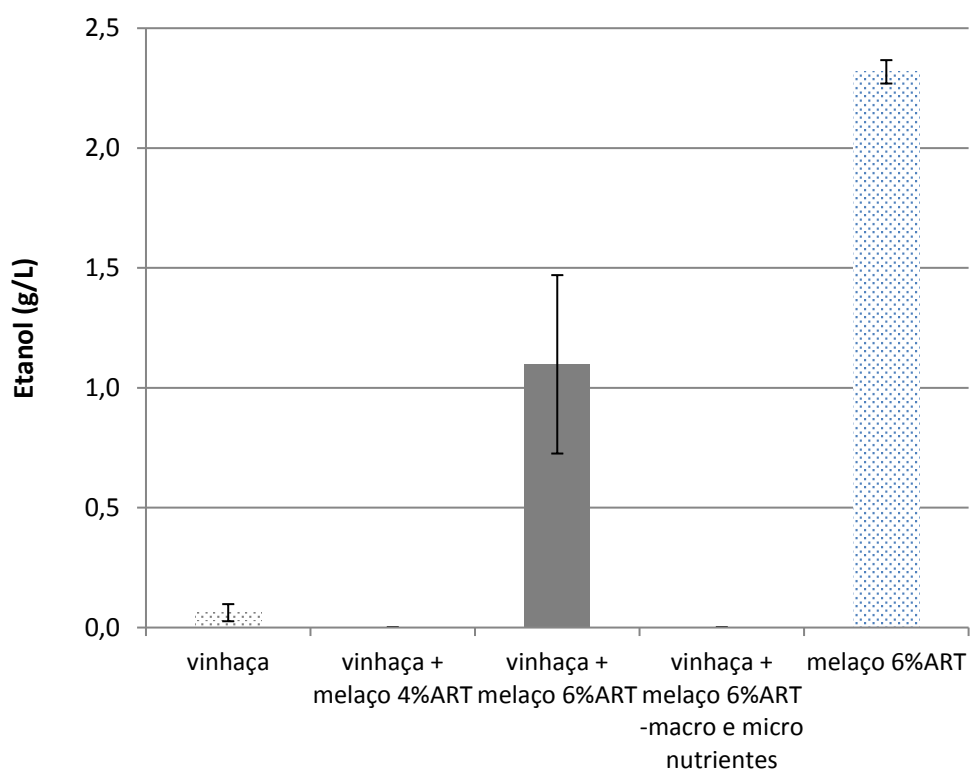
5.2 Vinhaça FA (UNESP)

5.2.1 Ensaio de fermentação

5.2.1.1 Quantificação de solventes

Mediante as análises de solventes por cromatografia gasosa, não foram detectados acetona e butanol em nenhum dos ensaios de fermentação realizados. Na Figura 6 verifica-se a produção de etanol nos diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.

Figura 6 - Quantificação final de etanol (g/L) produzido durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia



Fonte: Dados da pesquisa

No ensaio contendo MCS suplementado apenas com vinhaça praticamente não houve produção de etanol (0,06 g/L). Santos (2015) obteve cerca de $1,21 \pm 0,03$ g/L de etanol utilizando o mesmo MCS suplementado apenas com vinhaça (aproximadamente 17% do total do meio de cultura), sendo que a vinhaça bruta utilizada tinha no máximo 2,22 g/L de carboidratos totais. No presente trabalho, utilizou-se porcentagem maior de vinhaça (cerca de 67% do total do meio de cultura), e vinhaça bruta utilizada com 1,18 g/L de ART. Além da escassez de açúcares presentes na vinhaça, essenciais para o crescimento microbiano, a presença de maior quantidade de vinhaça pareceu inibir o metabolismo bacteriano, evidenciado pelo menor crescimento bacteriano no ensaio contendo somente vinhaça (Figura 8 e 9) e pela maior produção de etanol no ensaio contendo apenas melaço (2,32 g/L, Figura 6).

Não observou-se produção de etanol nos ensaios contendo MCS suplementado com vinhaça+melaço(4%ART) e vinhaça+melaço(6%ART) na ausência de macro e micronutrientes. Santos (2015) verificou produção de cerca de 5,16 g/L de etanol utilizando MCS suplementado com aproximadamente 67% de vinhaça, na ausência de macro e micronutrientes, utilizando açúcar demerara como fonte de carbono. Verificou-se 1,10 g/L de etanol produzido no ensaio contendo vinhaça+melaço(6%ART), quando macro e micronutrientes estavam presentes.

Sydney et al. (2014) avaliaram a produção de ácidos graxos voláteis e hidrogênio por consórcio microbiano originário de lagoa de estabilização de bovinocultura de leite, utilizando vinhaça e melaço como fonte de nutrientes em ensaios de fermentação anaeróbia. Os autores verificaram produção de hidrogênio e ácidos tais como ácido láctico e ácido butírico, no entanto não observou-se produção de etanol.

Diversos fatores podem ter afetado a produção de solventes pela cultura mista bacteriana. O processo de fermentação ABE se inicia pela fase acidogênica, com crescimento exponencial das bactérias e produção de gás carbônico, hidrogênio, ácido acético (acetato) e ácido butírico (butirato), dentre outros. Desse modo, o pH do meio de cultura diminui devido à produção dos ácidos orgânicos atingindo valores em torno de 4,5. Quando a concentração de ácidos se torna suficientemente alta, o crescimento celular atinge a fase estacionária e se inicia a solventogênese, onde os ácidos passam a ser consumidos junto com a fonte de carbono formando os solventes acetona, butanol e etanol ocorrendo aumento do pH do meio de cultura devido à reassimilação dos ácidos (JONES e WOODS, 1986).

Jones e Woods (1986) acreditavam que a transição da fase acidogênica para a solventogênica estivesse relacionada ao pH. No entanto estudos mais recentes afirmam que essa transição está associada a concentração de ácido butírico não dissociado e não ao pH (Visioli,

2014). Stephens et al. (1985) verificaram transição para solventogênese em batelada mesmo quando o pH foi mantido a 7,0 e altas concentrações de butirato foram adicionadas ao meio. Mudanças nas condições ambientais (temperatura, ausência temporária de nutrientes, presença temporária de compostos tóxicos) e operacionais (choques de carga orgânica ou hidráulica) podem resultar no acúmulo de ácidos graxos voláteis devido à limitações cinéticas ou termodinâmicas (Aquino e Chernicharo, 2005).

5.2.1.2 Quantificação de ácidos orgânicos

A Tabela 16 mostra os valores de ácidos orgânicos produzidos (g/L), durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia, quantificados por CLAE.

Tabela 16 – Quantificação final de ácidos orgânicos (g/L) produzidos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia

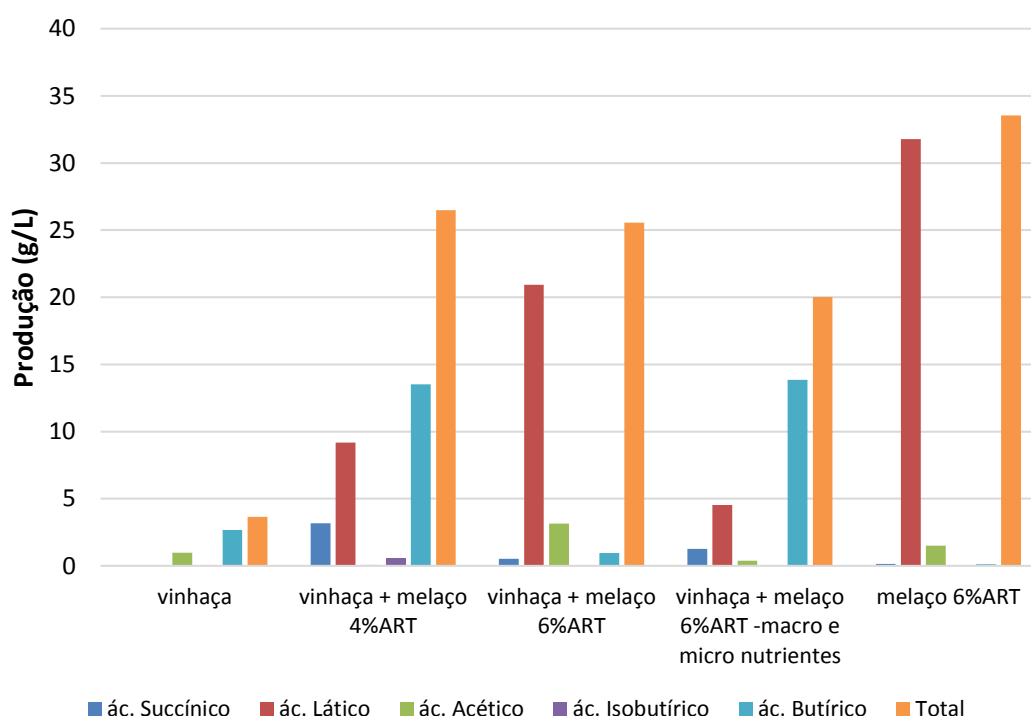
Ensaio	Ácidos (g/L)				
	Succínico	Lático	Acético	Isobutírico	Butírico
vinhaça	0,00	0,00	0,97	0,00	2,68
vinhaça + melaço (4%ART)	3,16	9,18	0,08	0,56	13,52
vinhaça + melaço (6%ART)	0,53	20,94	3,15	0,00	0,94
vinhaça + melaço (6%ART) -macro e micro nutrientes	1,26	4,53	0,38	0,00	13,86
melaço (6%ART)	0,13	31,77	1,51	0,00	0,12

Em MCS suplementado apenas com vinhaça a produção de ácido butírico foi de 2,68 g/L. No ensaio contendo vinhaça + melaço (4%ART) ocorre produção simultânea de ácido butírico, ácido láctico e ácido succínico (13,52; 9,18 e 3,16 g/L, respectivamente). Conforme o aumento da porcentagem de ART dos ensaios, devido ao acréscimo de maiores quantidades de melaço, verificou-se que a produção de ácido butírico diminui e a produção de ácido láctico aumenta. No ensaio contendo vinhaça + melaço (6%ART) a produção de ácido butírico cai e observa-se maior produção de ácidos láctico e acético (20,94 e 3,15 g/L). A presença de macro e micronutrientes mostrou-se essencial para a produção de ácido láctico, uma vez que no ensaio contendo vinhaça + melaço (6%ART) na ausência de macro e micro nutrientes verifica-se diminuição na produção desse ácido, sendo que ácido butírico volta a ser produzido. Finalmente, no ensaio contendo apenas melaço (6%ART), ocorre a maior produção de ácido láctico e praticamente não há produção de ácido butírico (31,77 e 0,12 g/L). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Santos (2015), em que ácido láctico foi o produto

com maior concentração em MCS contendo sacarose e ácido butírico o produto com maior concentração em MCS contendo vinhaça (8,8 e 6,4 g/L, respectivamente). Estes resultados indicam que provavelmente ocorrem mudanças na predominância das espécies de bactérias presentes no inóculo utilizado, de acordo com a composição do meio de cultura.

Com relação ao valor total dos ácidos orgânicos quantificados, a maior produção ocorreu no ensaio com MCS suplementado apenas com melaço (6%ART), seguido do ensaio vinhaça + melaço (4%ART) (33,53 e 26,49 g/L, respectivamente) (Figura 7).

Figura 7 - Quantificação final de ácidos orgânicos (g/L) produzidos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia



Fonte: Dados da pesquisa

No entanto, de acordo com a Tabela 17, verificou-se maior rendimento total no ensaio com MCS suplementado com vinhaça + melaço (4%ART), seguido do ensaio com melaço (6%ART) (56,7 e 55,9%, respectivamente). Apesar do ensaio somente com vinhaça ter apresentado baixa produção de ácidos, seu rendimento total foi de 54,3%, além de apresentar o maior rendimento na produção de ácido acético (14,5%). Ácido isobutírico teve produção somente na amostra contendo vinhaça + melaço (4%ART) e apresentou baixo rendimento (1,2%).

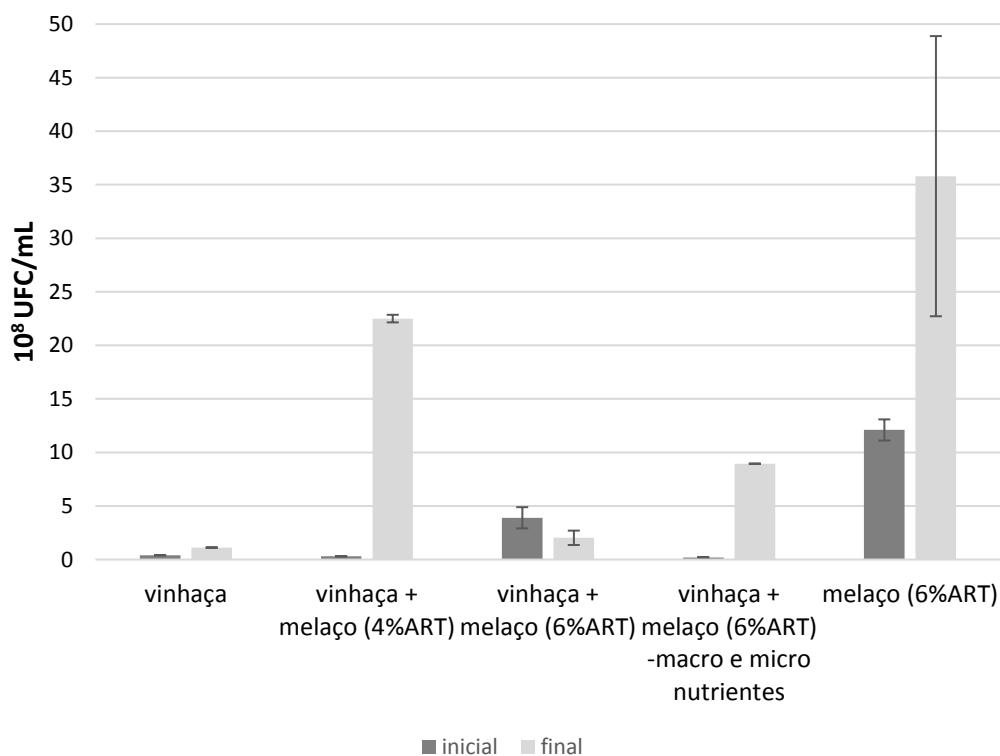
Tabela 17 – Rendimento da produção de ácidos orgânicos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia

Ensaio	Rendimento (%)					
	Succínico	Lático	Acético	Isobutírico	Butírico	Total
vinhaça	0,0	0,0	14,5	0,0	39,8	54,3
vinhaça + melaço (4%ART)	6,8	19,6	0,2	1,2	28,9	56,7
vinhaça + melaço (6%ART)	0,8	31,4	4,7	0,0	1,4	38,3
vinhaça + melaço (6%ART) -macro e micro nutrientes	1,9	6,8	0,6	0,0	20,8	30,0
melaço 6%ART	0,2	52,9	2,5	0,0	0,2	55,9

5.2.1.3 Quantificação de bactérias anaeróbias

O crescimento, bem como a adaptação do inóculo bacteriano ao melaço e à vinhaça descritos em 4.2.1.2.3 e 4.2.1.2.4 permitiram que os ensaios de fermentação tivessem início com uma concentração elevada de bactérias anaeróbias, na ordem de 10^8 UFC/mL, conforme registrado na Figura 8.

Figura 8 - Resultados da quantificação de bactérias anaeróbias presentes no início e no final do ensaio de fermentação, com duração de 7 dias, para produção da vinhaça FA (UNESP), expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/mL)



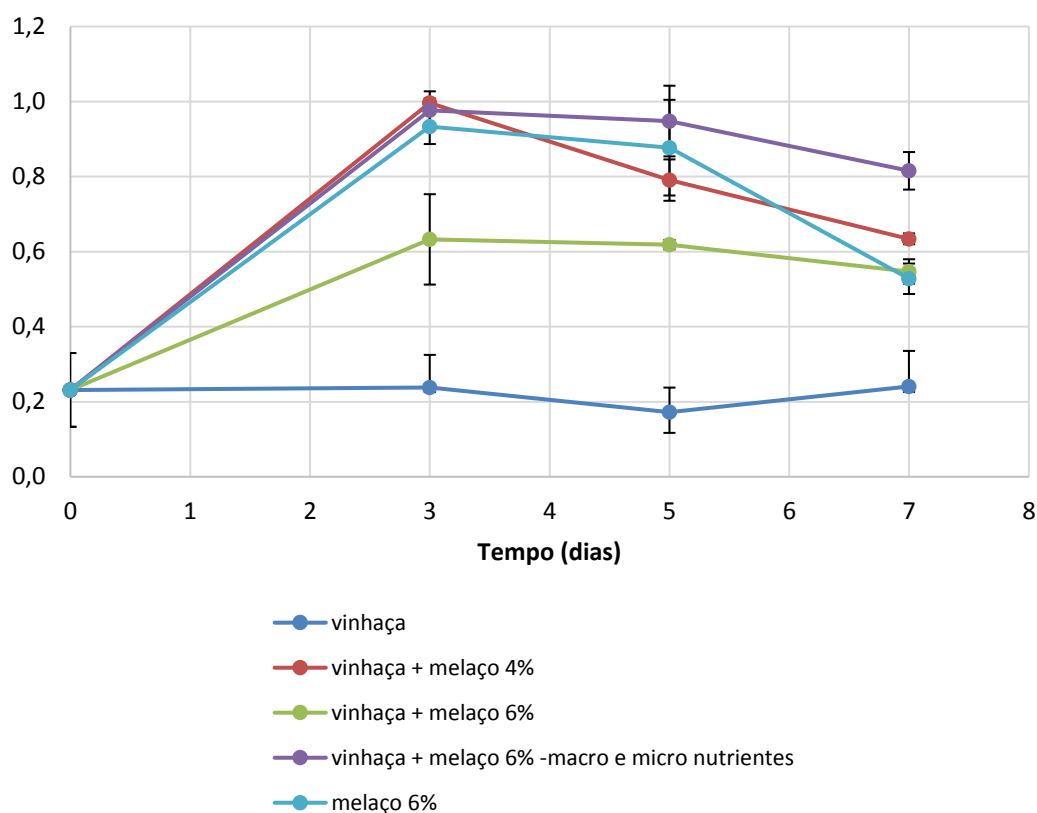
Fonte: Dados da pesquisa

Ao final dos ensaios, houve aumento da quantidade de microrganismos, exceto no ensaio contendo vinhaça + melaço (6%ART). A diminuição de bactérias neste ensaio pode ser atribuída ao valor de pH verificado ao final da fermentação, acima de 6,5 (Figura 10). Em geral, bactérias lácticas são acidófilas e seu crescimento diminui em valores de pH acima de 6.

5.2.1.4 Densidade óptica

A Figura 9 mostra os resultados do acompanhamento das medidas de densidade óptica, realizadas a 540 nm, durante os ensaios de fermentação. O ponto máximo de crescimento bacteriano ocorreu no 3º dia de fermentação, em todos os ensaios. Após esse período, encerra-se a fase exponencial de crescimento microbiano e tem início a fase estacionária e de declínio até o 7º dia. De acordo com estes dados, o tempo de fermentação de 7 dias mostrou-se adequado, uma vez que após o 5º dia a maioria dos nutrientes presentes no meio de cultura já foram consumidos. O menor crescimento ocorreu no ensaio contendo apenas vinhaça, devido a escassez de açúcares (1,18 g/L), conforme verificado na Tabela 9. Maior crescimento microbiano foi verificado no ensaio contendo vinhaça+melaço(4%ART) no 3º dia. Ao final da fermentação, o ensaio contendo vinhaça + melaço (6%ART) na ausência de macro e micro nutrientes foi o que apresentou maior crescimento.

Figura 9 – Resultados das medidas de densidade óptica em função do tempo de fermentação anaeróbia



Fonte: Dados da pesquisa

O inóculo utilizado nos ensaios de fermentação do presente trabalho foi proveniente da vinhaça FA (FEAGRI) produzida no trabalho de Santos (2015), conforme descrito no item 4.2.1.2.2 Pré-tratamento do inóculo. Em seu trabalho, a autora analisou o inóculo por técnica de pirosequenciamento onde foi possível identificar 6 espécies de bactérias presentes em ordem de abundância: *Lactobacillus zae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium intestinale*, *Bacillus firmus*, *Virgibacillus pantothenicus* e *Bacillus thermoamylovorans*.

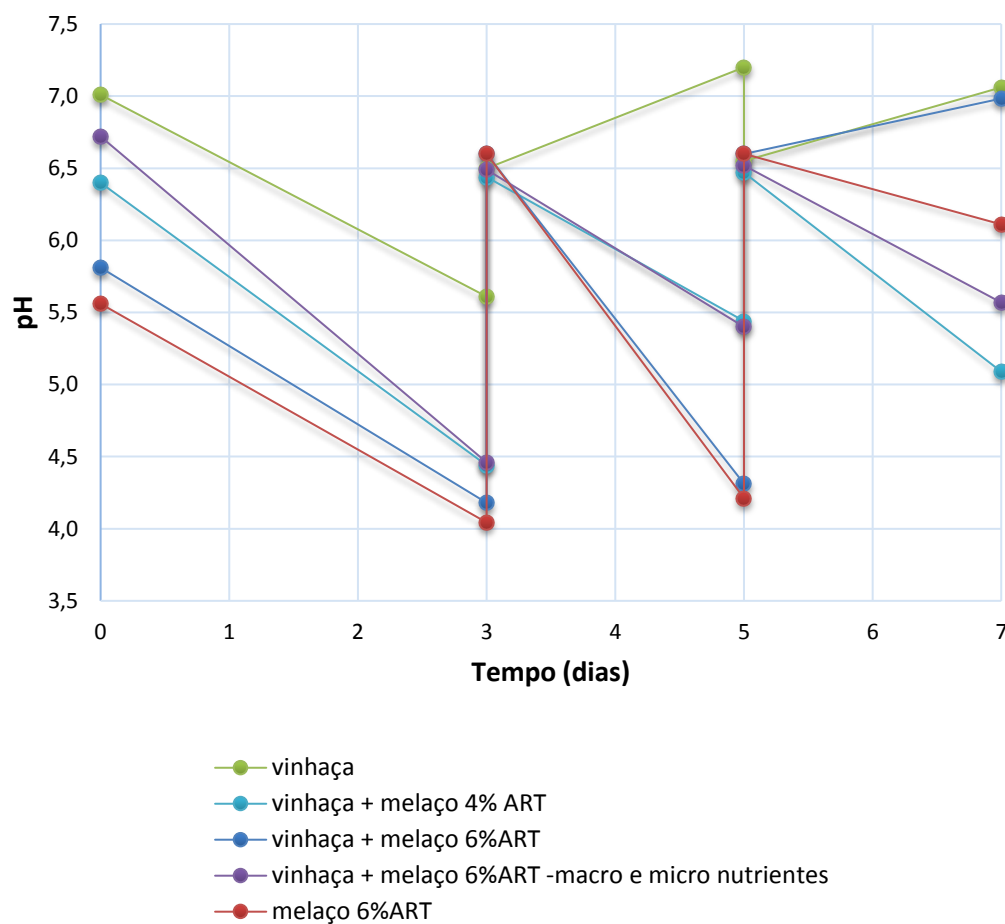
Os resultados encontrados no presente trabalho, com relação à produção de etanol e ácidos orgânicos são condizentes com as espécies presentes no inóculo. A maior produção de ácido láctico ocorreu devido à predominância de *Lactobacillus* sobre as demais espécies, nos ensaios em que as características do meio de cultura favoreceram seu crescimento, como por exemplo a presença do melaço. Provavelmente, *Lactobacillus* também foram responsáveis pela produção de etanol e ácido acético. As espécies de *Clostridium* foram favorecidas na presença de vinhaça, evidenciado pela produção de ácido butírico e isobutírico.

5.2.1.5 Acompanhamento do pH

Na Figura 10 é possível observar o acompanhamento dos valores de pH em função do tempo de fermentação anaeróbia. As diferenças nos valores iniciais das amostras deve-se ao fato de que o pH de cada amostra foi ajustado para $6,9 \pm 0,05$ antes da adição das soluções de melaço, vitaminas e do inóculo. No terceiro dia de ensaio, cessou-se a agitação em shaker com o objetivo de manter parte do gás hidrogênio produzido na forma dissolvida no caldo de fermentação, favorecendo o aumento da concentração de butirato e acetato (VAN ANDEL et al., 1985). Correções no pH foram realizadas no terceiro e no quinto dia de ensaio ($6,5 \pm 0,1$ com NaOH 6M e solução saturada de bicarbonato de sódio) com o objetivo de aumentar a concentração de butirato ou ácido butírico não dissociado, favorecendo assim a mudança para fase solventogênica evitando a queda no pH para valores inferiores a 4,5 (BRYANT; BLASCHEK, 1988).

Somente a amostra de MCS suplementado apenas com vinhaça não voltou a apresentar queda no pH após a correção realizada no terceiro dia do ensaio. No restante das amostras, o pH atingiu valores inferiores a 6,0 no quinto dia de ensaio, necessitando de nova correção com a adição de NaOH 6M e solução saturada de bicarbonato de sódio. No trabalho de Santos (2015) a adição de bicarbonato foi suficiente para manter o pH controlado até o final do ensaio.

Figura 10 – Resultados do valores de pH em função do tempo de fermentação anaeróbia



Fonte: Dados da pesquisa

5.2.2 Análises físico-químicas

As Tabelas 18 e 19 mostram os resultados das análises físico-químicas realizadas com a vinhaça bruta e os resíduos (vinhaça FA) produzidos após os ensaios de fermentação.

Tabela 18 - Resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta utilizada para a fermentação anaeróbia e do seu resíduo final (vinhaça FA/UNESP), baseadas na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) para caracterização de vinhaça

Análise	Unidade	Vinhaça Bruta	Vinhaça FA (UNESP)				
			1	2	3	4	5
DBO	mg O ₂ .L ⁻¹	534,5	287,5	302,5	344,3	315,7	176,0
DQO	mg O ₂ .L ⁻¹	19.796	10.560	10.560	15.840	14.080	15.840
Nitrogênio Total	mg N.L ⁻¹	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Oxigênio Dissolvido (OD)		6,9	1,1	3,3	1,2	1,9	2,6
Condutividade Elétrica	µS/cm	6,8	26,8	32,3	41,5	24,5	40,3
Sólidos Totais	mg.L ⁻¹	14.647	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Sólidos Fixos	mg.L ⁻¹	4.996	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Sólidos Voláteis	mg.L ⁻¹	9.651	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Cinzas (Sólidos Fixos)	%	0,5	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Umidade	%	98,5	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Sulfato	mg SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹	1.281	3.368	4.212	4.691	2.329	3.863
Sulfeto	mg S ²⁻ .L ⁻¹	<0,002	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Manganês	mg Mn.L ⁻¹	2,78	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Cálcio	mg Ca.L ⁻¹	354	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Magnésio	mg Mg.L ⁻¹	124	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Sódio	mg Na.L ⁻¹	12,2	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Potássio	mg K.L ⁻¹	1.812	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Fosfato Total	mg/L	84,1	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

n.r. = análise não realizada

1 = vinhaça

2 = vinhaça + melaço (4%ART)

3 = vinhaça + melaço (6%ART)

4 = vinhaça + melaço (6%ART)-macro e micro nutrientes

5 = melaço (6%ART)

Na Tabela 18, é possível verificar que após os ensaios de fermentação, o valor da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) diminuiu até 67,1% (ensaio com MCS suplementado com melaço 6%ART), e o valor da Demanda Química de Oxigênio (DQO) diminuiu até 46,7% nos ensaios com MCS suplementado com vinhaça e vinhaça + melaço (4%ART). Estes dados indicam que houve consumo de matéria orgânica pelas bactérias anaeróbias do processo fermentativo, diminuindo o potencial poluidor da vinhaça FA e condizem quando comparados com os resultados obtidos com a vinhaça FA (FEAGRI) (Tabela 3 do Artigo 2).

Os valores de Oxigênio Dissolvido (OD) da vinhaça FA diminuíram devido ao processo em anaerobiose. Os valores de condutividade elétrica mostraram um aumento expressivo (>500%) após o processo fermentativo, devido à adição de soluções de macro e micronutrientes

no MCS e solução saturada de bicarbonato de sódio e NaOH 6M para controle do pH durante o processo. Como verificado na Figura 10, a adição destas soluções não foram capazes de manter o pH em níveis elevados, além de aumentar o potencial poluidor do resíduo final.

Análises da série de sólidos, bem como demais análises da Tabela 18 não foram realizadas para a vinhaça FA devido à insuficiência de amostra. No entanto, estes valores estavam presentes em quantidades menores quando comparados com a vinhaça bruta utilizada por Santos (2015) para produção da vinhaça FA (FEAGRI) (Tabe

la 3 do Artigo 2).

Tabela 19 - Valores máximos permitidos (VMP) para lançamento de efluentes em esgoto segundo Decreto No. 8.468/76 (SÃO PAULO, 1976) e resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta e de seu resíduo final (vinhaça FA/UNESP)

Análise	VMP	Vinhaça Bruta	Vinhaça FA (UNESP)				
			1	2	3	4	5
pH	6,0 – 10,0	4,5	7,6	5,1	7,9	5,5	5,1
Materiais sedimentáveis	até 20mL/L	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Óleos e graxas	150 mg/L	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Arsênio	1,5 mg/L	<0,005	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Cádmio	1,5 mg/L	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Chumbo	1,5 mg/L	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Cobre	1,5 mg/L	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Cromo hexavalente	1,5 mg/L	<0,100	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Mercúrio	1,5 mg/L	<0,0002	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Prata	1,5 mg/L	<0,005	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Selênio	1,5 mg/L	<0,005	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Cromo total	5,0 mg/L	0,03	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Zinco	5,0 mg/L	0,351	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Estanho	4,0 mg/L	<0,005	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Níquel	2,0 mg/L	0,021	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Cianeto	0,2 mg/L	<0,002	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Fenol	5,0 mg/L	0,0392	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Ferro solúvel	15 mg/L	15,9	5,30	11,57	14,8	10,48	10,36
Fluoretos	10 mg/L	0,254	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Sulfeto	1,0 mg/L	<0,002	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Sulfato	1.000 mg/L	1.281	3.368	4.212	4.691	2.329	3.863

n.r. = análise não realizada

1 = vinhaça

2 = vinhaça + melaço (4%ART)

3 = vinhaça + melaço (6%ART)

4 = vinhaça + melaço (6%ART)-macro e micro nutrientes

5 = melaço (6%ART)

Na Tabela 19, verifica-se que os valores de pH das amostras de vinhaça FA provenientes dos ensaios 2, 4 e 5 encontram-se abaixo do VMP segundo Decreto No. 8.468/76 (SÃO PAULO, 1976) para lançamento de efluentes em esgoto, devido à dificuldade no controle do pH verificada durante o ensaio. Análises de arsênio, cromo hexavalente, mercúrio, prata, selênio, cromo total, zinco, estanho, níquel, cianeto, fenol, fluoretos e sulfeto não foram realizadas pois encontravam-se abaixo do VMP na vinhaça bruta utilizada. Demais análises não foram realizadas devido à insuficiência de amostras. Ferro solúvel encontrava-se presente na vinhaça bruta acima do VMP (15,9 mg/L). No entanto, os valores obtidos após o processo fermentativo se enquadraram no Decreto No. 8.468/76 (SÃO PAULO, 1976). O sulfato presente na vinhaça bruta acima do VMP (1.281 mg/L) teve aumento de até 266,2% na vinhaça FA (ensaio com MCS suplementado com vinhaça + melaço (6%ART). Isso ocorreu devido à adição de solução de macro e micronutrientes, agente redutor (L-cisteína) e provavelmente também à adição de melaço, que pode conter níveis elevados de sulfato (PRADA, 1998).

5.3 Artigos

Os demais resultados do presente trabalho foram divididos em dois artigos científicos, que são referentes aos resultados obtidos com a vinhaça FA obtida junto à FEAGRI (Unicamp).

5.3.1 ARTIGO 1 – Biodegradation and toxicity of waste from anaerobic fermentation of stillage (publicado).

MESSETTI, M. A., DA SILVA, A. J. E., DOS SANTOS, G. M., GOVONE, J. E. S., DE ANGELIS, D. F. Biodegradation and toxicity of waste from anaerobic fermentation of stillage. **African Journal of Biotechnology**, 16(37), 1863-1870, 2017.

Biodegradation and Toxicity of Waste from Anaerobic Fermentation of Stillage

Mariane Aparecida Messetti^{1*}, Ariovaldo José da Silva², Graciete Mary dos Santos², José Silvio Govone³ and Dejanira Franceschi de Angelis¹

¹Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, n. 1515, Bela Vista, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

²Department of Sanitation and Environment, Faculty of Agricultural Engineering, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

³Department of Statistics, Applied Mathematics and Computation, Institute of Geosciences and Exact Sciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Several studies have been carried out to produce biofuels by anaerobic digestion of stillage from ethanol fermentation. This type of process, known as ABE Fermentation, generates by-products such as acetone, butanol and ethanol. This fermentation can use pure or mixed cultures of anaerobic bacteria, mainly of the genus *Clostridium*. In this context, there is the need for deeper studies for proper disposal of the residue resulting from Anaerobic Fermentation of ethanolic stillage, hereinafter referred to as AF stillage (stillage from Anaerobic Fermentation), obtained after this fermentation. Thus, the aim of this study was to evaluate the biodegradation and toxicity of stillage from Anaerobic Fermentation. The biodegradation of AF stillage in soil samples in the presence and absence of commercial inoculum was evaluated using a respirometric method described by Bartha & Pramer, according to the standard NBR 14283 (ABNT, 1999). The production of CO₂ was evaluated for 57 days. Additionally, quantification of microorganisms was carried out at the beginning and end of the experiment. Toxicity tests were performed with the microcrustacean *Daphnia similis* using raw AF stillage and leachate from the respirometry test, according to the standard NBR 12713 (ABNT, 2009). The results of the respirometry test showed that, after 13 days of incubation, the biodegradation efficiency of all samples was above 30%. Using the Friedman statistical test, results showed that adding the inoculum caused no statistically significant difference in the biodegradation of AF stillage. The acute toxicity tests were performed on raw AF stillage and on the leachates showed that toxicity was removed after biodegradation in soil at all concentrations used. Thus, discharge of AF stillage into soil is an alternative viable disposal.

Keywords: biodegradation; stillage; anaerobic fermentation; toxicity.

1 INTRODUCTION

Taking into account that ethanol production in Brazil in 2015/2016 was 30.5 billion liters, the production of ethanol stillage was 305 billion liters. Ethanol stillage is characterized as a distillery effluent having a high polluting potential – approximately a hundred times more polluting than domestic sewage (Conab, 2016; Lelis Neto, 2008). Its chemical composition varies depending on the water content, sugarcane characteristics and fermentation and distillation processes that were used. In general, stillage presents increased turbidity and low pH, with high levels of organic matter, potassium, and calcium and moderate amounts of nitrogen and phosphorus (Ferraz et al., 1986; Rodella et al., 1983; Tauk, 1987; Gómez & Rodriguez, 2000). According to Fuess & Garcia (2014) currently almost the entire volume of stillage generated in Brazilian distilleries is directed to the fertigation of sugarcane fields, due to its fertilizer character. In reasonable amounts, fertigation has positive effects on agricultural productivity, acting as a partial or total replacement of mineral fertilizers – especially potassium. However, long-term intensive application of stillage can increase soil salinity (Corazza, 1999), affect sugarcane quality, and also contaminate groundwater (Gonçalves & Silva, 2000). According to Freire & Cortez (2000) stillage can present high levels of Chemical Oxygen Demand (COD) and Biochemical Oxygen Demand (BOD), reaching values up to 210.000 mg·L⁻¹ and 100.000 mg·L⁻¹, respectively.

According to Green (2011), Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation has been recently re-established in China. ABE fermentation is one of the oldest microbiological processes for the commercial production of solvents (Qureshi & Ezeji, 2008). In this type of fermentation, bacteria of the genus *Clostridium* are used to convert sugars into solvents, and fermentation takes place in two steps. The first step (acidogenesis) is a growth phase in which acetic and butyric acids are rapidly produced, lowering the pH. The second step (solventogenesis) is characterized by acid reassimilation for solvent production. Fermentation also produces carbon dioxide and hydrogen (Green, 2011). The average ABE fermentation time is 36–72 hours, when approximately 15–20 g/L of solvents accumulate, depending on the culture and raw materials used. One of the greatest technological challenges is associated with the low yield of solvents. Choosing microorganisms appropriately is crucial for successful ABE fermentation and for the production of the target solvents. Pure cultures (whether natural or mutant) are the most widely used for many scientific studies, since they present a rate of conversion of glucose into solvents within the maximum tolerance limits due to microbial inhibition caused by solvents (Liu; Qureshi, 2009). However, mixed cultures have proven more

advantageous when complex substrates are used, promoting their degradation by forming integrated communities, in which some species act in a balanced way, or even symbiotically (Santos, 2015).

Although Brazil finds itself in an advantageous position, especially when it comes to ethanol from sugarcane, the country needs to consolidate its position in the world energy market in a sustainable way, taking into account environmental, economic, and social issues (Santos et al., 2011). According to Mello et al. (2007), in the coming years, Brazil will maintain its leading position in the production of ethanol as a consequence of the natural characteristics of its territory, its large agricultural and industrial experience in the sugar and alcohol sector, and the recent development of biodiesel agribusiness. The expansion of biofuels in Brazil offers great environmental challenges and opportunities, especially for one of the main sources of pollutants from plants, namely stillage. Since there are limits to the use of stillage in fertigation, one of the alternatives is its biodigestion through ABE fermentation.

Improvements in the refining process over time will enable the use of more economical sources of raw materials, such as lignocellulosic biomass and even sugars currently used in ethanol plants. In the latter, only minor modifications would be needed, since bacteria of the genus *Clostridium* are well adapted to utilize sugars derived from cellulosic materials. The production of low cost butanol using lignocellulosic biomass, such as agricultural and forestry waste from biorefineries, has been regarded as a necessary change in order to improve process economy.

Solutions for the stillage generated during the production of ethanol from conventional and cellulosic raw materials were discussed by Wilkie et al. (2000), who supported anaerobic digestion of stillage followed by fertigation. Corazza (1999) described alternative technology that allows stillage to be recycled in the fermentation process, treated in anaerobic reactors, or used in yeast production, animal feed, and even in construction. In this context, reuse of ethanol stillage has been considered as an alternative for the production of biofuels or their byproducts.

Ahn et al. (2011) investigated fermentation for butanol production by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 using stillage containing glycerol as a substrate. Glycerol is a byproduct of ethanol fermentation and its concentration in thin stillage ranges from 5.1 to 24.6 g/L (Dowd et al., 1994; Gonzalez et al., 2010; Kim et al., 2008). *C. pasteurianum* DSM 525 is capable of producing butanol using glycerol as the sole source of carbon and energy (Biebl, 2009). Other organic compounds present in thin stillage are lactic and acetic acids, which are mainly produced by bacterial contamination in the ethanol fermentation process (Skinner & Leathers, 2004). The authors found that *C. pasteurianum* DSM 525 produced from 6.2 to 7.2

g/L of butanol, using glycerol present in stillage as the main source of carbon. The lactic acid in stillage acted as a buffering agent, maintaining the pH of the medium in the range of 5.7 to 6.1. The results of the study showed the economic viability of butanol production using stillage as a substrate, with the potential to provide all the nutrients that are necessary for fermentation.

In the context of anaerobic digestion of stillage aiming to obtain by-products (ABE fermentation), deeper studies focusing on the final residue obtained after fermentation (AF stillage) are necessary. After removal of the bacterial biomass and separation of the solvents generated in the process, AF stillage is disposed of. Thus, it is appropriate to discuss solutions for proper disposal of AF stillage. Among them, fertigation is a viable alternative. Nonetheless, studies on biodegradation / bioremediation and toxicity are needed for its correct disposal on soil.

Bioremediation is the use of living organisms, especially microorganisms, to degrade environmental contaminants into less toxic products. The bioremediation process can occur *in situ*, where microorganisms originate from a contaminated area, or *ex situ*, where microorganisms are isolated and transferred to the contaminated site. Contaminating compounds are transformed through the metabolic activity of microorganisms (Vidali, 2001). Microbial diversity in soil plays a key role in this ecosystem. Several scientific papers have demonstrated the role of soil bacteria and fungi in the bioremediation of contaminated areas or even of industrial waste. Bioaugmentation involves using microbial consortia capable of degrading the target pollutant. In intrinsic or natural bioremediation, the microorganisms used are autochthonous, that is, native to the site, without any interference of active remediation technologies (Bento et al., 2003).

The respirometric method by Bartha & Pramer (1965) is a technique that is used to determine the biodegradation of organic matter in soil by measuring the amount of CO₂ released into the system. A respirometer acts as a closed system consisting of two interconnected chambers, in which biodegradation of waste and removal of the CO₂ generated during the process take place. This method assumes a correlation between CO₂ production and biodegradation of organic matter (sample) in soil. The efficiency of sample degradation is determined by the amount of CO₂ produced, which allows determining waste stabilization time at different application rates.

Ecotoxicological tests with standard organisms have been used to estimate the toxic effects of certain compounds, providing data for risk assessments in aquatic environments. Among these organisms, microcrustaceans of the genus *Daphnia* spp stand out not only because

they are easy to grow in a well-controlled laboratory, but also because of their population homogeneity resulting from parthenogenetic reproduction (Nour et al., 2014).

The aims of this work were: 1) to study the application of AF stillage to soil through respirometry; 2) to carry out microbial quantification at the beginning and end of the test; and 3) to perform toxicity tests using *Daphnia similis*.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Anaerobic fermentation (AF Stillage)

The AF stillage is the residue or stillage generated by anaerobic fermentation of ethanol stillage. It was obtained from the Sanitation Laboratory of the Faculty of Agricultural Engineering (FEAGRI/UNICAMP) and resulted from Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation intended for the production of alcohols and organic acids. For this fermentation, synthetic culture medium was used (Monot et al., 1982 modified by Santos, 2015), supplemented with ethanol stillage and molasses, as well as 1 N NaOH for pH control.

The AF stillage was centrifuged to remove the bacterial biomass. Afterwards, the supernatant recovered was subjected to rotoevaporation in a Marconi rotary evaporator (MA-120) to eliminate the solvents produced during fermentation (acetone, butanol, and ethanol). The pressure that was necessary for the evaporation of the three solvents in a water bath at a temperature between 45–50 °C (over 404 mm Hg) was taken into account. The AF stillage was then heated at 80°C for 15 minutes.

The physicochemical properties of the stillage used in this study was characterized according to APHA (1998, 2012) and are shown in Table 1.

Table 1 - Physicochemical composition of the AF stillage

Parameters	Results
pH	7.21
Electrical Conductivity (mS/cm)	18.96
Biochemical Oxygen Demand (BOD) (mg/L)	654
Chemical Oxygen Demand (COD) (mg/L)	17616
Total Organic Carbon (TOC) (%)	0.82
Total Nitrogen (Kjeldahl) (mg N/L)	0.3
Dissolved oxygen (mg O ₂ /L)	5.03
Total solids (mg/L)	29288
Fixed solids (mg/L)	15048
Volatile solids (mg/L)	14240
Ashes (%)	1.54
Humidity (%)	97.05
Sulfate (mg SO ₄ ⁻² /L)	1525
Sulfide (mg S ⁻² /L)	<0.002
Manganese (mg Mn/L)	0.958
Calcium (mg Ca/L)	254
Magnesium (mg Mg/L)	86
Sodium (mg Na/L)	4823
Potassium (mg K/L)	1827
Total phosphate (mg PO ₄ /L)	156

2.2 Soil Sample

The soil used in the respirometry test was collected according to the technical rule L.6.245 from Cetesb (1984), in the geographic coordinates: Latitude -22.39624915/Longitude -47.5431633, localized in the municipality of Rio Claro, in the State of São Paulo, Brazil. These samples were taken from the soil superficial layer of non-contaminated places. Table 2 and 3 shows the physic-chemical characteristics of soil.

Table 2 - Physical characteristics of control soil

Grain size distribution (%)						
Parameter	Sand				Class	Sub-class
	Thick	Fine	Clay	Loam		
Soil	24.4	11.9	25.9	37.8	Clay	Clay

Table 3 - Chemical characteristics of control soil (macro and micronutrientes)

Macronutrients (mmolc/dm ³) IFSA								V	Relations	
Parameter	K	Ca	Mg	H ⁺ Al	Al	SB	CTC	%	Ca/Mg	Mg/K
Soil	4.9	43	15	34	1	63	97	64.9	2.86	3.06
Micronutrients (mg/dm ³)								pH	OM	P res
	S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	CaCl ₂	g/dm ³	g/dm ³
Soil	8	3	19	26.2	1.4	1.9	0.18	5.5	34	3,0

P, K, Ca, Mg: exchange resin anionic + cationic; Fe, Mn, Ca, Zn: Extractor DTPA-TEA; B: Barium chloride extractor 0.125%; Soil sample was analyzed by Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo Ltda. (ICASA).

2.3 Biodegradation Test

The biodegradation tests, performed according to the standard NBR 14283 (ABNT, 1999), evaluated changes in CO₂ production in the soil containing AF stillage. We evaluated three concentrations of AF stillage in soil (3, 6, and 12%) in the presence and absence of 0.2% commercial inoculum (VCTEC/ ByoAct), consisting of a pool of microorganisms isolated from soil. Each treatment included three replicates, according to protocol: soil; soil + 3% AF stillage; soil + 6% AF stillage; soil + 12% AF stillage; soil + 0.2% inoculum; soil + 0.2% inoculum + 3% AF stillage; soil + 0.2% inoculum + 6% AF stillage and soil + 0.2% inoculum + 12% AF stillage. The respirometers were incubated at 28±2 °C and produced CO₂ measurements were performed daily for the first 7 days and at longer intervals over 57 days.

From the determination of the amount of biodegradable carbon during the test, the efficiency of biodegradation (EB) was calculated by the equation:

$$EB\% = \frac{\text{Total amount of biodegradable carbon } (\mu\text{mol})}{\text{Amount of initial organic carbon in soil } (\mu\text{mol})} \times 100$$

2.4 Microbiological Analysis of Biodegradation Test

Heterotrophic bacteria and fungi in the respirometer samples were quantified at the beginning and end of the test. The quantification was performed by plating on Plate Count Agar (PCA) containing Actidione (5 ppm) and Sabouraud broth containing chloramphenicol (400 ppm), respectively. Bacterial counts were carried by the Pour Plate technique, and plates were incubated at 35 °C for 48 hours. Counts for yeasts and molds were performed by Spread-plating, and plates were incubated for 5 days at 28 °C. The results are given in CFU/g of dry soil.

The same procedure for microbial quantification was carried out for the commercial inoculum and for AF stillage. The results obtained are expressed as CFU/ml.

2.5 Toxicity Tests

Leachates from the samples in the respirometers were prepared at the beginning and end of the test, at a concentration of 10% in distilled water. The solutions were stirred in a shaker for 30 minutes and then decanted for 7 days, at room temperature. The supernatant was used in acute toxicity tests with the microcrustacean *Daphnia similis* according to the standard NBR 12713 (ABNT, 2009), as well as raw AF stillage.

2.6 Statistical Analysis

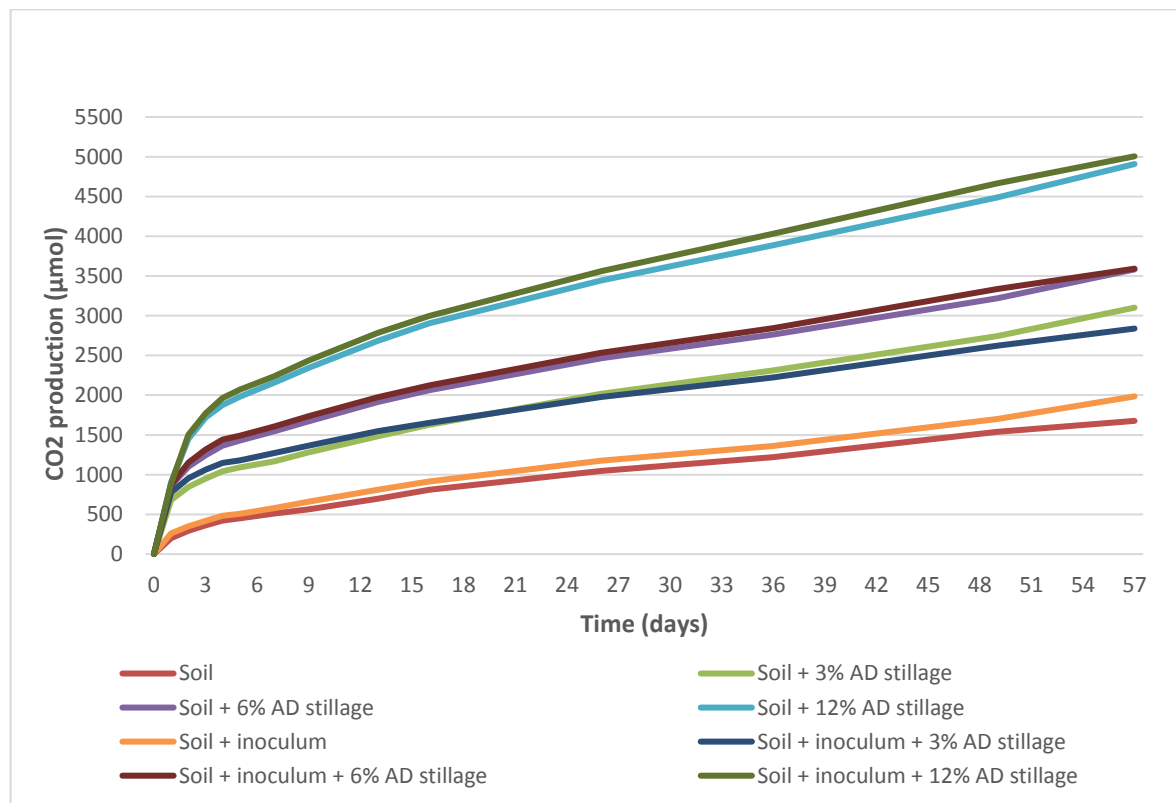
The Friedman test (Zar, 1999), which is a nonparametric test, was used to analyze the results from the respirometric biodegradation test and the quantification of microorganisms. The level of significance was 5%. The results of the toxicity tests with *D. similis* were calculated from statistical analysis carried out by the Trimmed Spearman-Kärber Method using the software JSPEAR (Hamilton et al., 1977).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Biodegradation Test

The occurrence of biodegradation was observed in all respirometers, which was evidenced by the production of CO₂. It was observed that microbial activity was not affected by the addition of AF stillage, since the amount of cumulative CO₂ increased as the concentration of residue (AF stillage) increased (Figure 1).

Figure 1 - Cumulative production of CO₂ between different treatments in the respirometry test with AF stillage.



Source: research data

The statistical analysis of the data on the daily production of CO₂ (μmol) using the Friedman test revealed that adding the inoculum did not cause significant differences (with a significance level of 5%) when compared to control soil and to AF stillage at the concentrations of 6 and 12% (P-values of the probability tests: p=0.13; 0.78; and 0.98, respectively). There

was statistical difference only between soil with 3% AF stillage and the same sample supplemented with inoculum ($p=0.047$).

Almeida et al. (2013) also found similar results in a respirometry test, in which a commercial inoculum was added to help with the biodegradation of ethanol stillage. The results for clayey soil showed that the curves of CO_2 production were very similar in the presence and absence of inoculum. The authors concluded that the addition of the inoculum did not affect stillage biodegradation positively.

Adding the three concentrations of AF stillage into the soil had a significant effect ($p<0.0001$) with respect to the daily production of CO_2 (μmol), as well as adding 6 and 12% AF stillage into the soil containing inoculum ($p=0.0039$ and $p<0.0001$, respectively). There was no difference between adding AF stillage into the soil at the concentrations of 3 and 6% ($p=0.47$), but both were different from adding 12% AF stillage ($p=0.003$ and 0.0041 , respectively). For the soils supplemented with inoculum, the three concentrations of AF stillage were different from each other ($p=0.0154$; $p<0.0001$; and $p=0.0015$, respectively, for comparisons between 3 and 6%; 3 and 12%; and 6 and 12%).

3.2 Efficiency of Biodegradation

Table 4 shows that after 13 days all samples presented biodegradation efficiency above 30%. This result is significant, since there is a Brazilian technical standard that establishes a minimum biodegradation efficiency of 30% for waste disposal on soil (NBR 14283 – ABNT,1999). At the end of 57 days, the highest efficiency was observed for the sample containing soil with 3% AF stillage (92.64%), followed by the sample containing soil + inoculum + 3% AF stillage (75.52%). In Figure 1, the same samples presented the lowest amount of cumulative CO_2 ; however, their efficiency at the start of incubation was above 30%. The samples containing soil + 6% AF stillage reached this value on the 3rd and 4th day in the presence and absence of inoculum, respectively. As for the samples containing soil + 12% AF stillage, they reached this value on the 9th and 13th day in the presence and absence of inoculum, respectively. Although its addition did not lead to statistically significant differences, samples with inoculum reached 30% biodegradation efficiency in a shorter time.

Table 4 - Efficiency of biodegradation of AF stillage in the respirometry test for 57 days

Days	Samples					
	Soil + 3% AF stillage	Soil + 6% AF stillage	Soil + 12% AF stillage	Soil + inoculum + 3% AF stillage	Soil + inoculum + 6% AF stillage	Soil + inoculum + 12% AF stillage
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	31.32	21.44	11.42	37.46	21.70	11.18
2	35.88	26.14	18.80	42.81	27.91	19.61
3	38.46	28.76	22.09	45.82	31.13	22.94
4	40.30	30.64	23.65	47.21	33.20	25.12
5	41.59	31.75	24.89	47.42	33.80	26.31
7	42.69	33.60	26.73	49.41	35.52	28.07
9	46.61	35.98	28.94	51.99	38.09	30.42
13	50.95	39.53	32.25	55.18	41.48	33.89
16	53.15	40.77	34.07	54.69	42.70	35.58
26	63.09	46.11	39.00	60.62	48.34	40.89
36	71.18	50.16	43.38	65.27	52.82	45.73
49	78.20	54.66	47.95	70.31	58.43	50.81
57	92.64	61.95	52.54	75.52	62.27	54.12

3.3 Microbiological Analysis of Biodegradation Test

Table 5 indicates that the initial bacterial and fungal counts in control soil were 3.4×10^5 and 4.7×10^2 CFU/g, respectively, while adding inoculum increased these values. In the inoculum, the load of bacteria was 1.5×10^7 CFU/ml, and the concentration of fungi was 3×10^2 CFU/ml.

Table 5 - Initial and final counts of heterotrophic bacteria and fungi from the respirometry test, expressed in Colony Forming Units per gram of soil (CFU/g)

Samples	Bacteria 10^5 CFU/g		Fungi 10^2 CFU/g	
	Initial	Final	Initial	Final
Soil	3.4	23.5	4.7	36.0
Soil + 3% AF stillage	35.7	26.5	7.9	33.0
Soil + 6% AF stillage	67.5	44.5	11.1	31.5
Soil + 12% AF stillage	132.4	45.0	17.6	38.0
Soil + inoculum	153.4	11.0	7.7	49.0
Soil + inoculum + 3% AF stillage	185.7	39.5	10.9	41.0
Soil + inoculum + 6% AF stillage	217.9	18.5	14.1	25.5
Soil + inoculum + 12% AF stillage	282.4	109.5	20.6	33.0

The number of microorganisms was also proportionally higher with the addition of 3, 6, and 12% AF stillage, in which the number of bacteria was 1.08×10^8 and that of fungi was 1.08×10^4 CFU/ml. There was some variation in the final quantification. At the end of the test, the overall number of bacteria was lower than in the initial plating. This was probably due to the intense metabolic activity of microorganisms during the test, with consequent depletion of the nutrients present. On the other hand, there was an increase in the fungal count (CFU/g) at the end of the experiment. It is worth noticing that fungi were present in a smaller amount at the beginning of the test. The Friedman test showed significant differences between the initial and final number of microorganisms, both for bacteria and fungi ($p < 0.05$).

3.4 Toxicity Tests

The acute toxicity test on *D. similis* was performed according to NBR 12713 (ABNT, 2009). The results showed acute toxicity, with an EC₅₀ of 9.10% and approximately 11 Toxic Units (TU) for the raw AF stillage studied (Table 6). This result indicates that AF stillage at a concentration of 9.10% is potentially toxic to aquatic organisms.

Table 6 - Results of the acute toxicity test on *D. similis* for raw AF stillage

EC(50) (%)	Toxic Units (TU)
9.10	10.99

EC(50): Median Effective Concentration = sample concentration that causes acute effects (mortality or immobility) to 50% of the organisms within a given period of exposure under the test conditions. TU = Toxic Units = $100/\text{EC}(50)$

The same test was carried out with leachate from the samples in the respirometers, at the beginning and end of the test, for both experiments. In Table 7, we can see that leachate from the controls used in the respirometry test showed no acute toxicity to *D. similis* (soil and soil + inoculum), at the beginning and at the end of the test.

Table 7 - Results of the acute toxicity test on *D. similis* performed with leachate from the respirometry test

Samples	Toxicity (Toxic Units)	
	Initial	Final
Soil	NT	NT
Soil + 3% AF stillage	1.0	NT
Soil + 6% AF stillage	1.2	NT
Soil + 12% AF stillage	NT	NT
Soil + inoculum	NT	NT
Soil + inoculum + 3% AF stillage	1.2	NT
Soil + inoculum + 6% AF stillage	1.7	NT
Soil + inoculum + 12% AF stillage	NT	NT

NT = non-toxic

In the beginning of respirometry test, changing AF stillage addition from 3 to 6% increased the toxicity of the samples both in the presence and absence of inoculum, that can be verified by the increase of UT values. However, samples containing AF stillage 12% showed no toxicity, in the presence and absence of inoculum.

One possible explanation would be that the leachates were decanted for 7 days at room temperature, and during that time existing microorganisms in AF stillage were able to biodegrade compounds that could be toxic to *D. similis*. Thus, the supernatant of these leachates showed no toxicity since the amount of microorganisms present in the soil after addition of 12% AF stillage was higher than that present in the other concentrations (Table 5).

At the end of the respirometry test, in which AF stillage underwent biodegradation, the leachate samples showed no toxicity. These results are similar to those found by Quiterio (2013), who found that raw ethanol stillage was extremely toxic to *D. similis*. However, after biodegradation in soil quantified with the respirometric technique, toxicity was removed.

4 CONCLUSION

In the respirometry test, we observed that adding the commercial inoculum caused no statistically significant difference in the biodegradation of AF stillage. In the absence of inoculum, the two lowest concentrations were not different from each other; there were differences only with the addition of AF stillage at a concentration of 12%. This shows that it may be necessary to use the minimum concentration for the biodegradation process to be more efficient, since the minimum efficiency of 30% was reached by the 13th day when 12% AF

stillage was used, while the same efficiency was reached in the 1st day when 3% AF stillage was used.

The acute toxicity tests showed that raw AF stillage was extremely toxic to *D. similis*. However, after the biodegradation process, toxicity was removed. Thus, disposal of AF stillage on soil becomes a viable option, since it did not show potential toxicity to aquatic organisms in case of groundwater contamination and it presented a minimal biodegradation efficiency of 30%, as recommended by the Brazilian technical standard for waste disposal on soil.

5 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

6 REFERENCES

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (1999). **NBR 14.283** Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas (2009). **NBR 12713** Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera).
- APHA **Standard methods for the examination of water and wastewater** (1998). Washington, DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation. 20. ed.
- APHA **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, 2012. 22. ed.
- Ahn JH, Sang BI, Um Y (2011). Butanol production from thin stillage using *Clostridium pasteurianum*. **Bioresour. Technol.** 102:4934-4937.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.046>
- Almeida NC, Tomasella RC, Govone S, Kinjo S, Angelis DF (2013). Study of stillage biodegradation by respirometry in sandy and clay soils. **Afr. J. Agric. Res.** 8(35): 4506-4513
<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR12.1555>
- Bartha R, Pramer D (1965). Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Sci.** 100(1): 68-70.
- Bento FM, Camargo FAO, Okeke B (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Braz. J. Microbiol.** 34(1): 65-68.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000500022>

Biebl H (2001). Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 27(1): 18-26
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000155>

Cetesb (Companhia Ambiental Do Estado De São Paulo) (1984). **Norma técnica L. 6.245** – Coleta e preparação de amostras. Procedimentos, São Paulo, 25p.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO) (2016). Acomp. safra bras. cana. **Quarto levantamento, Brasília**, 2(4): 1-76.

Corazza RI (1999). Reflexões sobre o papel das políticas ambientais de ciência e tecnologia na modelagem de opções produtivas ‘mais limpas’ numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre o problema da disposição da vinhaça. **In: III Encontro Nacional da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**, Recife.

Dowd MK, Johansen SL, Cantarella L, Reilly PJ (1994). Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. **J. Agric. Food Chem.** 42(2): 283-288 <http://dx.doi.org/10.1021/jf00038a011>

Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP (2007). Bioproduction of butanol from biomass: From genes to bioreactors. **Curr. Opin. Biotechnol.** 18: 220-227
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.002>

Ferraz CAM., Aquarone E, Krauter M, Balloni W, Florenzano G (1986). Utilização de subprodutos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II. Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Rev. Microbiologia.** 17:15-25

Freire WJ, Cortez LAB (2000). Vinhaça de cana-de-açúcar. Guaíba: **Agropecuária**, 203p
 Gomes MTMS, Eça KS, Viotto LA (2011). Concentração da vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração com membranas. **Pesqui. Agropecu. Bras.** 46(6): 633-638.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600009>

Gómez J, Rodríguez O. Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity (2000). **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**. 17: 318-326

Gonçalves CAS, Silva EL (2000). Tratamento Físico-Químico da Vinhaça. **In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES. Fortaleza - CE, Brazil.

Gonzalez R, Campbell P, Wong M (2010). Production of ethanol from thin stillage by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.** 32(3): 405–411.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10529-009-0159-2>

Green EM (2011). Fermentative production of butanol - the industrial perspective. **Curr. Opin. Biotechnol.** 22: 1-7.<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.004>

Hamilton SL, McLaughlin M, Karlin A (1977). Disulfide bond cross-linked dimmer in acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 79: 692-699. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)91167-6](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(77)91167-6)

Kim Y, Mosier NS, Hendrickson R, Ezeji T, Blaschek H, Dien B, Cotta M, Dale B, Ladisch MR (2008). Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. **Bioresour. Technol.** 99(12): 5165-5176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.028>

Lelis Neto JA (2008). **Monitoramento de componentes químicos da vinhaça aplicados em diferentes tipos de solo**. 88p. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Área de concentração: Irrigação e Drenagem – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Liu S, Qureshi N (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. **New Biotechnol.** 26(3-4): 117–21,31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.984>

Mello EB, Canepa EL, Costa MM (2007). Visões Ambientais para o Financiamento de Biocombustíveis no Brasil. **In: A Expansão da Agroenergia e seus Impactos sobre os Ecossistemas Naturais Brasileiros**, Anais. Rio de Janeiro: FBDS, CIB, BNDES. Disponível em: http://www.conservation.org.br/publicacoes/files/15_Finaciamento_Biocombust_BNDES.pdf >Acesso em: abr 2013.

Monot F, Martin J, Petitdemange H, Gay R (1982). Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. **Appl. Environ. Microbiol.** 44(6): 1318–1324.

Nour EAA, Candello FP, Dos Santos EMR, Barretto AS, Domingues LM (2014). Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com *Daphnia similis*. **Ecotoxicol. Environ. Contamin.** 9(1). <http://dx.doi.org/10.5132/eec.2014.01.010>

Quiterio GM (2013). **Avaliação do processo de biodegradação da vinhaça no solo mediante adição do biofertilizante**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia, Área de concentração: Tecnologia e Inovação - Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, Limeira.

Qureshi N, Ezeji TC (2008). Butanol, “a superior biofuel” production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.85>

Rodella AA, Zambello Júnior E, Orlando Filho J (1983). Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminum content. **In: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists**, 1983, Havana. **Proceedings**. Havana: Universidad de La Habana: 189-214

Santos MFRF, Borschiver S, Couto MAPG (2011). O complexo agroindustrial da cana-de-açúcar no Brasil: uma discussão sobre aspectos atuais relacionados ao etanol biocombustível. **In: Economia & Tecnologia/ Centro de Pesquisas Econômicas (CEPEC); Programa de Pós-**

Graduação em Desenvolvimento Econômico (PPGDE); Universidade Federal do Paraná (UFPR). 24: 145-158

Santos GM (2015). **Efeito da vinhaça na produção biológica de álcoois e ácidos orgânicos voláteis por meio de consórcio microbiano**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola, Área de concentração: Água e Solo – Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Skinner KA, Leathers TD (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 31(9): 401–408. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-004-0159-0>

Tauk SM (1987) **Efeito de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de culturas do milho e cana-de-açúcar no município de Corumbataí, SP**. Tese (Livre-docência), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Vidali M (2001). Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, 73(7): 1163–1172.

Zar JH (1999). **Biostatistical Analysis**, Prentice Hall, EUA, 4^a ed.

Wilkie AC, Riedesel KJ, Owens JM (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass Bioenergy**, 19: 63-102. [http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00017-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9)

5.3.2 ARTIGO 2 - Ensaios ecotoxicológicos e genotóxicos com o resíduo gerado pela fermentação anaeróbia da vinhaça etanólica

Mariane Aparecida Messetti¹, Lais Roberta Deroldo Sommaggio², Ariovaldo José da Silva³, Maria Aparecida Marin-Morales², Dejanira Franceschi de Angelis¹

¹Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, no 1515, Bela Vista, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil. marime7ferreira@gmail.com; dangelis@rc.unesp.br

²Department of Biology, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brazil. rds.lais@gmail.com

³School of Agricultural Engineering, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil. ariovaldo.silva@feagri.unicamp.br

RESUMO

O descarte da vinhaça etanólica é uma grande preocupação para o setor industrial brasileiro, pois sua produção anual é de cerca de 305 bilhões de litros (safra 2015/2016). Sua utilização como fertilizante agrícola é uma opção viável, mas sua aplicação a longo prazo pode trazer danos ao solo e comprometer as águas subterrâneas. Diversos estudos tem avaliado a utilização desse abundante resíduo agroindustrial em uma nova fermentação, visando a obtenção de subprodutos mediante a fermentação ABE (acetona-butanol-etanol). Nesta fermentação, bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium* podem converter matéria orgânica presente na vinhaça em acetona, butanol e etanol, que são recuperados do caldo fermentado mediante técnicas de separação de solventes. Esta aplicação dada à vinhaça etanólica traz a tona uma nova questão que envolve o correto descarte do resíduo, após o processo de separação dos subprodutos de interesse, chamado neste trabalho de Vinhaça FA (Fermentação Anaeróbia). O presente trabalho avaliou a ecotoxicidade e genotoxicidade da vinhaça FA. A toxicidade aguda foi avaliada mediante ensaios com o microcrustáceo *Daphnia similis* e pela fitotoxicidade sobre *Lactuca sativa*. Ensaio de genotoxicidade ambiental foi realizado com *Allium cepa*. Vinhaça FA apresentou elevada toxicidade aguda para *D. similis* (EC(50)= 9,10%). O crescimento relativo de *L. sativa* foi comprometido com o aumento da concentração de vinhaça FA; e a germinação foi inibida na concentração de 50%. Nos ensaios com *A. cepa* a citotoxicidade da amostra aumentou, conforme o aumento da concentração de vinhaça FA, e as concentrações 12

e 20% apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparadas ao controle negativo. Estas concentrações inibiram a divisão celular, dificultando a germinação e crescimento da radícula. Não observou-se resultados genotóxicos e mutagênicos estatisticamente significativos para as amostras analisadas. Com a análise dos resultados obtidos mediante os ensaios toxicológicos, é possível inferir que o descarte de vinhaça FA não deve ser feito na rede hídrica, pois pode comprometer os organismos aquáticos. Sua aplicação como fertilizante agrícola também pode não ser benéfica para o desenvolvimento de espécies vegetais. Assim, torna-se necessário o tratamento da vinhaça FA para diminuição da sua toxicidade, sendo recomendados, dentre outros, tratamentos biológicos como a biodegradação em solo.

Keywords: vinhaça; toxicidade; *Daphnia similis*; *Lactuca sativa*; *Allium cepa*.

1 INTRODUÇÃO

A vinhaça etanólica é caracterizada como sendo um efluente líquido proveniente de destilaria que possui alto poder poluente, devido à elevada concentração de matéria orgânica. Em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO), a vinhaça pode atingir valores superiores a 100 vezes a DQO do esgoto sanitário, que varia entre 250 e 1000 mg.L⁻¹ (AISSE et al., 2001; METCALF; EDDY, 2003). Sua composição química é variável, devido às características da cana-de-açúcar, dos processos de fermentação e de destilação empregados. A vinhaça também apresenta turbidez elevada e pH baixo, com níveis variáveis de matéria orgânica, potássio, cálcio e quantidades moderadas de nitrogênio e fósforo (FERRAZ et al., 1986; RODELLA et al., 1983; TAUKE, 1987; GÓMEZ; RODRIGUEZ, 2000). Além destes componentes, possui também em menor concentração os micronutrientes cálcio, cobre, manganês e zinco (MOHANA et al., 2009).

No Brasil, sua produção na safra 2015/2016 foi de 305 bilhões de litros (CONAB, 2016). Uma alternativa viável para o seu descarte tem sido a sua utilização como fertilizante em campos agrícolas, principalmente no próprio cultivo de cana-de-açúcar, em processo chamado fertirrigação. Em quantidades racionais, a fertirrigação apresenta efeitos positivos sobre a produtividade agrícola, atuando como substituto parcial ou total dos fertilizantes minerais, principalmente dos que contém potássio. No entanto, a aplicação intensiva de vinhaça pode, em longo prazo, aumentar a salinidade do solo, diminuir a atividade microbiana, desestabilizar a

estrutura do solo, alterar permanentemente o pH, afetar a qualidade da cana-de-açúcar, contaminar as águas subterrâneas e diminuir o oxigênio dissolvido em corpos d'água, além de eventuais riscos à saúde humana (GONÇALVES e SILVA, 2000; FUESS e GARCIA, 2014). Desse modo, tem sido propostas outras alternativas para a disposição final da vinhaça, como sua combustão, produção de levedura, obtenção de ração animal, adição à massa de cimento, fabricação de tijolos e a sua biodigestão anaeróbia para a geração de biogás (LAIME et al., 2011; MACHADO e FREIRE, 2009 e ROGRIGUES et al, 2012).

Wilkie et al. (2000) discutiram em seus estudos soluções para a vinhaça gerada durante a produção de etanol a partir de matérias-primas convencionais e celulósicas. Os autores sugeriram a aplicação do processo de digestão anaeróbia neste resíduo agroindustrial, seguido de fertirrigação. Neste contexto, tem-se considerado também o reaproveitamento da vinhaça etanólica como alternativa para a produção de biocombustíveis ou sub-produtos. A fermentação ABE (acetona-butanol-etanol) é um dos processos microbiológicos mais antigos para a produção comercial de solventes (QURESHI; EZEJI, 2008); e neste tipo de fermentação são utilizadas bactérias do gênero *Clostridium* para converter açúcares em solventes. Esta fermentação ocorre em duas etapas: a primeira etapa (acidogênica) é uma fase de crescimento em que os ácidos acético e butírico são produzidos rapidamente, diminuindo o pH; a segunda etapa (solventogênica) é caracterizada pela reassimilação do ácido para produção de solventes. A fermentação ABE também produz dióxido de carbono e hidrogênio (GREEN, 2011). O tempo médio deste processo é de 36 a 72 horas, quando cerca de 15 a 20 g/L de solventes são acumulados, dependendo da cultura e das matérias-primas utilizadas. Um dos maiores desafios tecnológicos está relacionado com o baixo rendimento de solventes; e a escolha adequada do(s) microrganismo(s), que é crucial para que a fermentação ABE tenha sucesso. As culturas puras (naturais ou mutantes) são muito utilizadas em diversos trabalhos científicos, por apresentarem taxa de conversão de glicose em solventes dentro dos limites de tolerância máximos, devido a inibição microbiana causada pelos solventes (LIU e QURESHI, 2009). Entretanto, para a degradação de substratos complexos, as culturas mistas tem se mostrado mais vantajosas, pois favorecem a degradação dos mesmos, devido à sua atuação de forma integrada (SANTOS, 2015).

No contexto da fermentação anaeróbia da vinhaça para a obtenção de sub-produtos, tornam-se necessário estudos mais aprofundados com relação ao resíduo final obtido deste processo (vinhaça FA). Após a remoção da biomassa bacteriana e separação dos solventes gerados no processo, a vinhaça FA é descartada. Desse modo, torna-se apropriado discutir soluções para o correto descarte deste resíduo. Isto implica em conhecer suas características

físico-químicas e biológicas, bem como sua toxicidade tanto na água como no solo, uma vez que a fertirrigação está sendo proposta como a opção mais viável para sua disposição no ambiente.

Atualmente, ensaios ecotoxicológicos vêm sendo amplamente utilizados em todo o mundo para avaliação da qualidade ambiental, sendo utilizados para produtos químicos em geral, efluentes industriais e domésticos. Individualmente, muitas substâncias podem não ter potencialidade para causar danos. No entanto, a ecotoxicidade avalia o resultado não somente da ação de um componente químico, mas sim das influências integradas que as várias substâncias presentes em determinado meio exercem sobre o sistema em que se encontram, compreendendo entre elas as interações dos efeitos físico-químicos das substâncias com os organismos desse ambiente (FERNICOLA et al., 2003; BERTOLETTI e ZAGATTO, 2006). Desse modo, ensaios ecotoxicológicos com organismos padronizados tem sido empregados para estimar o efeito tóxico de determinados compostos, fornecendo dados para avaliações de riscos aos diferentes tipos de ambientes.

Para o ambiente aquático, destaca-se a utilização de microcrustáceos do gênero *Daphnia* spp, devido às condições de cultivo em laboratórios e sua homogeneidade populacional conferida pela sua reprodução partenogenética (NOUR et al., 2014). Ensaios utilizando plantas superiores têm sido utilizados em estudos sobre a fitotoxicidade de águas e de sedimentos contaminados (FERNANDES et al., 2007; CZERNIAWSKA-KUSZA e KUSZA, 2011). Dentre elas, destacam-se a alface (*Lactuca sativa*) amplamente utilizada em testes de fitotoxicidade (DING et al., 2009). Devido à sua sensibilidade e amplo cultivo no mundo todo, além da ampla variedade de parâmetros de toxicidade que podem ser avaliados, como taxa de germinação e alongamento das raízes (ŽALTAUSKAITĖ e ČYPAITĖ, 2008) essa espécie é recomendada por agências internacionais para ensaios de fitotoxicidade. Ainda dentre as plantas superiores, a cebola (*Allium cepa*) é rotineiramente utilizada para avaliar contaminações ambientais e os mecanismos de ação de compostos químicos mediante avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Esse organismo teste é usado para esse fim devido ao rápido crescimento de suas raízes, ao grande número de células em divisão, à alta tolerância a diferentes condições de cultivo, à disponibilidade durante o ano todo, ao fácil manuseio e por possuir poucos e longos cromossomos, o que os tornam facilmente reconhecidos após coloração (CARITÁ, 2010; LEME e MARIN-MORALES, 2009). A frequência de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa* possibilita a determinação dos mecanismos de ação de diversos compostos genotóxicos e mutagênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO e FERNANDES; MARIN-MORALES,

2011), além do impacto provocado sobre ambientes aquáticos (CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA e MARIN-MORALES, 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2008) e sobre o solo (SOUZA et al., 2009; 2013).

Esse trabalho teve como objetivo estudar a toxicidade da vinhaça FA, tanto em ambientes aquáticos como no solo, mediante ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, fitotoxicidade com *Lactuca sativa* e efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos com *Allium cepa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vinhaça FA

A vinhaça FA estudada foi obtida junto ao Laboratório de Saneamento da Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI/UNICAMP), proveniente da fermentação acetona-butanol-etanol (ABE), utilizando meio de cultura sintético suplementado com doses de vinhaça de indústria sucro-alcooleira, visando à produção de álcoois e ácidos orgânicos (SANTOS, 2015). Centrifugou-se a vinhaça FA para remover a biomassa bacteriana e, posteriormente, o sobrenadante recuperado foi submetido a rotaevaporação em evaporador rotativo Marconi (MA-120) para eliminar os solventes produzidos durante a fermentação (acetona, butanol e etanol). Utilizou-se pressão acima de 404 mm Hg em banho maria com temperatura entre 45-50°C para garantir a evaporação dos três solventes. Em seguida, a vinhaça FA obtida foi submetida a aquecimento a 80°C durante 15 minutos.

2.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas da vinhaça FA foram baseadas na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) para caracterização de vinhaça e também nos parâmetros exigidos pelo Decreto No. 8.468, de 8/9/1976, Governo do Estado de São Paulo, Artigo 19-A para Lançamento de efluentes em esgoto (SÃO PAULO, 1976). As Tabelas 1 e 2 descrevem as metodologias utilizadas.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos analisados, baseados na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006)

Local: Laboratório de Toxicidade de Águas (UNESP/Rio Claro)		
Parâmetro	Método	Referência
Demanda Bioquímica de Oxigênio	5210 B	APHA (1998)
Demanda Química de Oxigênio	5220 D	
Nitrogênio Total	Kjeldahl 928.08	AOAC (1995)
Oxigênio dissolvido (OD)	4500-O G	APHA (1998)
Condutividade elétrica	2510 B	
Série de sólidos	2540 B-E	
Local: Laboratório Externo		
Sulfato	3030E; 6010 C	APHA (2012); USEPA (2007)
Sulfeto	4500-S2 D	APHA (2012)
Manganês	3030E; 6010 C	APHA (2012); USEPA (2007)
Cálcio	3030E; 6010 C	
Magnésio	3030E; 6010 C	
Sódio	3030E; 6010 C	
Potássio	3030E; 6010 C	
Fosfato total	4500P	APHA (2012)

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos analisados, baseados no Artigo 19-A do Decreto No. 8.468 (SÃO PAULO, 1976)

Local: Laboratório de Toxicidade de Águas (UNESP/Rio Claro)		
Parâmetro	Método	Referência
pH	4500 B	APHA (2012)
Sólidos sedimentáveis	2540 F	
Local: Laboratório Externo		
Arsênio	7062; 6010 C	USEPA (1994;2007)
Mercúrio	7470 A; 6010 C	
Prata	3030 E; 6010 C	APHA (2012); USEPA (2007)
Selênio	3030 E; 6010 C	
Estanho	3030 E; 6010 C	
Fluoretos	4500 F	APHA (2012)
Sulfeto	4500-S2 D	
Sulfato	3030 E; 6010 C	APHA (2012); USEPA (2007)

2.3 Ensaios de toxicidade

2.3.1 *Daphnia similis*

Realizou-se ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis*, segundo norma ABNT NBR 12713:2009.

2.3.2 *Lactuca sativa* (alface)

O ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de *L. sativa* foi realizado de acordo com Ecological Effects Test Guideline - Seed Germination/Root Elongation Toxicity Teste (OPPTS 850.4200), desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, 1996). As sementes utilizadas foram “Alface Baba de verão (Manteiga)”, adquiridas de Isla[®] (Isla Sementes Ltda., Brazil), Lote 32135-52 com 96% de germinação e pureza de 99,8%. Foram feitas 3 replicatas com 10 sementes cada, utilizando vinhaça FA nas concentrações de 3,0; 6,0; 12,0; 25,0 e 50,0 %. No controle negativo utilizou-se água destilada. O teste foi incubado em BOD e teve duração de 10 dias. Após este período, observou-se o número de sementes germinadas em cada placa bem como o comprimento das radículas. Com os dados de germinação e comprimento da radícula calculou-se germinação relativa (GR), crescimento relativo das raízes (CR) e índice de germinação (GI), segundo as equações 1, 2 e 3.

$$GR (\%) = \frac{\text{n}^{\circ}\text{sementes germinadas no efluente} \times 100}{\text{n}^{\circ}\text{sementes germinadas no controle}} \quad (1)$$

$$CR (\%) = \frac{\text{média do crescimento das raízes com efluente} \times 100}{\text{média do crescimento das raízes no controle}} \quad (2)$$

$$GI (\%) = \frac{\text{n}^{\circ}\text{sementes germinadas no efluente} \times \text{comprimento médio raiz com efluente} \times 100}{\text{n}^{\circ}\text{sementes germinadas no controle} \times \text{comprimento médio raiz no controle}} \quad (3)$$

2.3.3 *Allium cepa* (cebola)

Os ensaios de genotoxicidade ambiental foram realizados com sementes de cebola (*A. cepa*), de acordo com metodologia descrita por Mazzeo *et al.* (2015). Utilizou-se sementes “Cebola Baía Periforme”, adquiridas de Isla[®] (Isla Sementes Ltda., Brazil), Lote 42011-S2 com 89% de germinação e pureza de 100%. Os testes com esse organismo foram realizados em triplicata, com 50 sementes cada, utilizando vinhaça FA nas concentrações de 6,0; 12,0 e 20,0%. O controle negativo (CN) foi realizado com água ultrapura e o controle positivo (CP) com metil metanosulfonato (MMS - Sigma-Aldrich - CAS: 66-27-3) na concentração de 10 mg/L, por ser esta substância um agente genotóxico de reconhecida ação clastogênica.

A exposição das sementes às amostras foi realizada em placas de Petri com papel de filtro, mantidas em incubadora a $22,0 \pm 2,0$ °C. Quando as raízes atingiram cerca de 1,5 a 2,0 cm de comprimento (cerca de 120 h de exposição), as sementes foram coletadas e fixadas em Carnoy I (3:1 - etanol/ácido acético - v/v). As lâminas foram preparadas de acordo com Bianchi *et al.* (2011), em que as raízes fixadas foram submetidas à hidrólise ácida com HCl (1 M), durante 10 min a 60 °C, seguido por coloração com reagente de Schiff, durante 2 h. Em seguida, as regiões meristemáticas das raízes de *A. cepa* foram seccionadas em lâminas, contrastadas com carmim acético (2%), cobertas com lamínula e, cuidadosamente, esmagadas. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e, após secagem, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico. Observou-se 6000 células por tratamento. Os efeitos citotóxicos foram determinados pela frequência do Índice Mitótico (IM) e pelo Índice de Morte Celular (IMC). Os efeitos genotóxicos foram determinados pela presença de aberrações cromossômicas (AC), mediante análise do Índice de Alterações Cromossômicas (IAC); enquanto os efeitos mutagênicos foram determinados pela ocorrência de micronúcleos (MN) e quebras cromossômicas (QC), avaliando-se o Índice de Mutagenicidade (IMt), segundo as equações 4, 5, 6 e 7.

$$\text{IM (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células em divisão celular}}{\text{total de células observadas}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{IMC (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células em morte celular}}{\text{total de células observadas}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{IAC (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células alteradas}}{\text{total de células observadas}} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{IMt (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células com MN e QC}}{\text{total de células observadas}} \times 100 \quad (7)$$

2.4 Análises estatísticas

Os resultados do ensaio de toxicidade com *D. similis* foram calculados por análises estatísticas, utilizando o método Trimmed Spearman-Kärber, mediante o software Jsphear (HAMILTON et al., 1977).

No ensaio de genotoxicidade ambiental com *A. cepa* utilizou-se o software Bioestat 5.0. O teste estatístico paramétrico ANOVA foi utilizado para os dados que apresentaram distribuição normal (índice mitótico e germinação); enquanto o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para os dados que não apresentaram distribuição normal (morte celular, genotoxicidade e mutagenicidade).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises físico-químicas

Na Tabela 3 é possível verificar que houve diminuição de 95,7% de DBO e 37,9% de DQO do resíduo final (vinhaça FA) comparado com a vinhaça bruta utilizada inicialmente, indicando que houve consumo de matéria orgânica inicialmente presente na vinhaça pelas bactérias anaeróbias do processo fermentativo. Segundo Rocha et al. (2012) o valor médio da DBO da vinhaça é de 16000 mg.L⁻¹, considerado extremamente alto se comparado a outros efluentes como por exemplo esgotos domésticos (cerca de 300 mg.L⁻¹). Sendo assim, a diminuição dos valores de DBO e DQO após o processo de fermentação anaeróbia é um dado interessante uma vez que diminui o potencial poluidor da vinhaça.

Tabela 3 - Resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta utilizada para a fermentação anaeróbia e do seu resíduo final (vinhaça FA), baseadas na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) para caracterização de vinhaça

Análise	Unidade	Vinhaça Bruta	Vinhaça FA
DBO (20°C, 5 dias)	mg O ₂ .L ⁻¹	15.140	654
DQO	mg O ₂ .L ⁻¹	28.390	17.616
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg N .L ⁻¹	836	0,3
Oxigênio Dissolvido (OD)	mg O ₂ .L ⁻¹	n.r.	5,03
Condutividade Elétrica	mS/cm	n.r.	18,96
Sólidos Totais	mg .L ⁻¹	26.632	29.288
Sólidos Fixos	mg .L ⁻¹	7.686	15.048
Sólidos Voláteis	mg .L ⁻¹	18.946	14.240
Cinzas (Sólidos Fixos)	%	n.r.	1,54
Umidade	%	n.r.	97,05
Sulfato	mg SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹	900	1525
Sulfeto	mg S ²⁻ .L ⁻¹	6,98	<0,002
Manganês	mg Mn .L ⁻¹	2,36	0,958
Cálcio	mg Ca .L ⁻¹	509	254
Magnésio	mg Mg .L ⁻¹	255,8	86
Sódio	mg Na .L ⁻¹	47,5	4.823
Potássio	mg K .L ⁻¹	2.650	1.827
Fosfato Total	mg PO ₄ L ⁻¹	n.r.	156

n.r. = análise não realizada

A quantidade de nitrogênio diminuiu 99,9% na vinhaça FA em comparação com a vinhaça bruta. Embora o meio de cultivo tenha sido suplementado com fontes de nitrogênio, como extrato de levedura e solução de macronutrientes, a diminuição registrada indica que houve alta assimilação do nitrogênio pelas bactérias anaeróbias durante a fermentação. Este resultado é importante, uma vez que na busca de soluções ambientais um dos requisitos mais desejáveis é a diminuição do teor de nitrogênio dos resíduos.

Independentemente da matéria-prima, a vinhaça é conhecida por conter altas concentrações de material orgânico, de potássio e sulfatos, bem como características ácidas e corrosivas. A quantidade de sulfato da vinhaça FA aumentou consideravelmente quando comparada à vinhaça bruta (aumento de 170%), provavelmente devido à suplementação do meio de cultivo com macro e micronutrientes.

Uma das formas mais tóxicas do enxofre é o sulfeto, e este foi praticamente removido após o processo de fermentação anaeróbia (<0,002 mg.L⁻¹).

Na vinhaça bruta existiam minerais importantes para a produção de solventes, tais como o manganês, magnésio, potássio e ferro. Além disso, houve adição de açúcar demerara ao meio de cultivo, açúcar proveniente da cana-de-açúcar que não é tratado quimicamente. A composição nutricional deste açúcar era de aproximadamente (mg/100 g-1): 85 de cálcio, 29 de magnésio, 22 de fósforo e 346 de potássio, segundo informações do produto comercial.

Também verificou-se diminuição de manganês, magnésio e potássio na vinhaça FA.

O aumento expressivo na quantidade de sódio após a fermentação pode ser atribuído à necessidade de volumes grandes de soluções para o controle do pH do processo, tais como soluções de bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio. Apesar de serem necessárias para o bom andamento da fermentação anaeróbia, a adição destas soluções alteram o resíduo final, fazendo com que a alternativa de disposição da vinhaça FA em solo seja prejudicada devido à potencial salinização do solo uma vez que o sódio está presente em grandes quantidades.

De acordo com a Tabela 4, o único parâmetro que se encontra fora do VMP para eventual lançamento desse tipo de resíduo para tratamento em esgotos foi o sulfato. Houve aumento de 170% provavelmente devido à suplementação do meio de cultivo com solução de macro e micronutrientes. Valores de pH e sulfeto, que se encontravam acima do VMP na vinhaça bruta, apresentaram valores na vinhaça FA que se enquadram no limite estabelecido pela norma ambiental vigente. Para os parâmetros que se encontravam abaixo do VMP na vinhaça bruta, não foi realizada análise para a vinhaça FA. Não foram realizados ensaios de óleos e graxas, cromo hexavalente e cianeto.

Tabela 4 - Valores máximos permitidos (VMP) para lançamento de efluentes em esgoto segundo Decreto No. 8.468/76 (SÃO PAULO, 1976) e resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta e de seu resíduo final (vinhaça FA)

Parâmetros	VMP	Vinhaça Bruta	Vinhaça FA
pH	6,0 – 10,0	4,49	7,21
Materiais sedimentáveis	até 20mL/L	n.r.	3,1
Óleos e graxas	150 mg/L	n.r.	n.r.
Arsênio	1,5 mg/L	n.r.	<0,005
Cádmio	1,5 mg/L	0,09	n.r.
Chumbo	1,5 mg/L	0,25	n.r.
Cobre	1,5 mg/L	0,33	n.r.
Cromo hexavalente	1,5 mg/L	n.r.	n.r.
Mercurio	1,5 mg/L	n.r.	<0,0002
Prata	1,5 mg/L	n.r.	<0,005
Selênio	1,5 mg/L	n.r.	<0,005
Cromo total	5,0 mg/L	0,04	n.r.
Zinco	5,0 mg/L	0,36	n.r.
Estanho	4,0 mg/L	n.r.	<0,005
Níquel	2,0 mg/L	0,15	n.r.
Cianeto	0,2 mg/L	n.r.	n.r.
Fenol	5,0 mg/L	2,05	n.r.
Ferro solúvel	15 mg/L	9,57	n.r.
Fluoretos	10 mg/L	n.r.	0,259
Sulfeto	1,0 mg/L	6,98	<0,002
Sulfato	1.000mg/L	900	1525

n.r. = análise não realizada

3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

O ensaio mostrou que a vinhaça FA apresentou toxicidade aguda para *D. similis*, apresentando EC(50) de 9,10% e 10,99 Unidades Tóxicas (UT) (Tabela 5). Esse resultado indica que vinhaça FA possui potencial tóxico aos organismos aquáticos mesmo em baixa concentração.

Tabela 5 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia similis*

CE(50) (%)	Unidades Tóxicas (UT)
9,10	10,99

CE(50) (%) = Concentração Efetiva Média: concentração da amostra que causa efeito agudo (letalidade ou imobilidade) a 50% dos organismos, em determinado período de exposição, nas condições de ensaio.
 UT = Unidades Tóxicas = 100/EC(50)

Campos (2009) avaliando vinhoto proveniente da produção de cachaça verificou CE(50) de 0,36 e 6,54 em ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* referentes ao vinhoto antes e após 1 ano de armazenamento para depuração. Os resultados do ensaio de toxicidade com *D. similis* para vinhaça FA mostram que a toxicidade desse resíduo é somente pouco menor que a verificada no trabalho de Campos (2009), ou seja, somente o processo de fermentação ou mesmo digestão anaeróbia da vinhaça não remove sua toxicidade. Messetti et al. (2017) avaliaram a toxicidade aguda da vinhaça FA sob *D. similis* e verificaram que a toxicidade foi removida ao final do processo de biodegradação em solo pelo método respirométrico de Bartha & Pramer, ao longo de 57 dias, nas concentrações utilizadas (3, 6 e 12%).

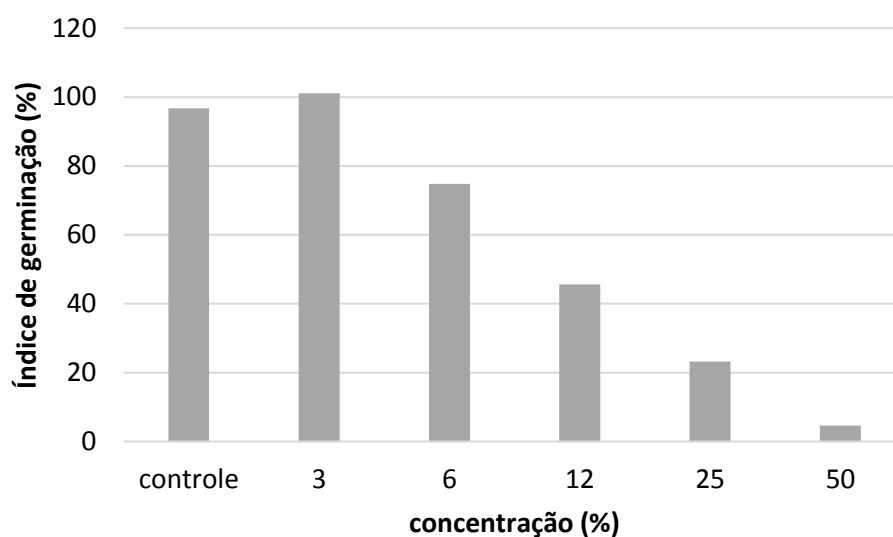
3.3 Ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa* (alface)

Em estudos toxicológicos utilizando sementes mediante avaliação do processo de germinação a água é um dos fatores do ambiente que mais exerce influência. A absorção de água, por embebição, promove a reidratação dos tecidos e intensifica as atividades metabólicas, fornecendo energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento por parte do embrião (Nassif et al., 1998).

Segundo RUDNIK (2008), a fitotoxicidade pode ser expressa como atraso de germinação, inibição de crescimento e de germinação, e qualquer outro efeito adverso causado por substâncias específicas ou condições ambientais.

O índice de germinação mostrou que vinhaça FA possui efeito inibitório na germinação e no crescimento da raiz de *L. sativa* somente a partir da concentração 6%, ficando abaixo de 80% (Figura 1).

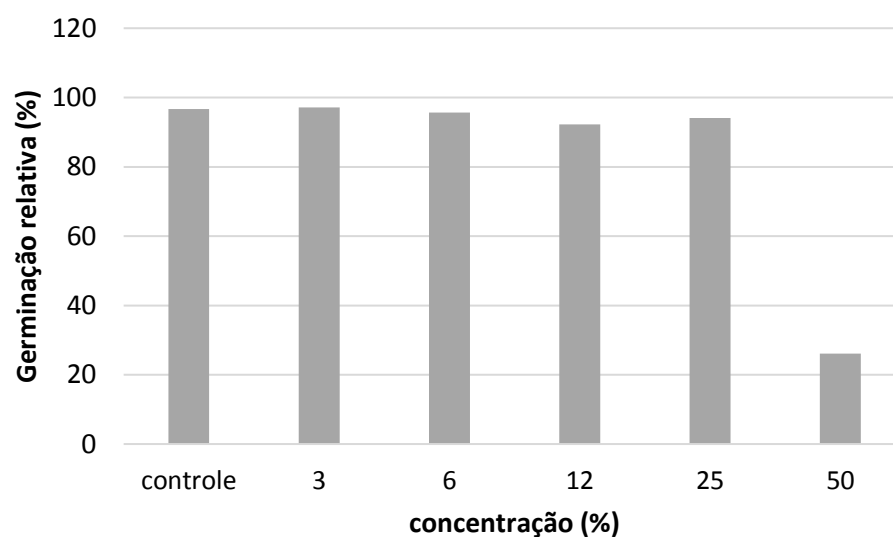
Figura 1 - Índices de germinação (%) de sementes de *Lactuca sativa* desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA



Fonte: dados da pesquisa

A germinação relativa permaneceu acima de 80 até 25% da concentração de vinhaça FA. Apenas na concentração de 50% houve inibição da germinação (Figura 2).

Figura 2 - Germinação relativa (%) de sementes de *Lactuca sativa* desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA

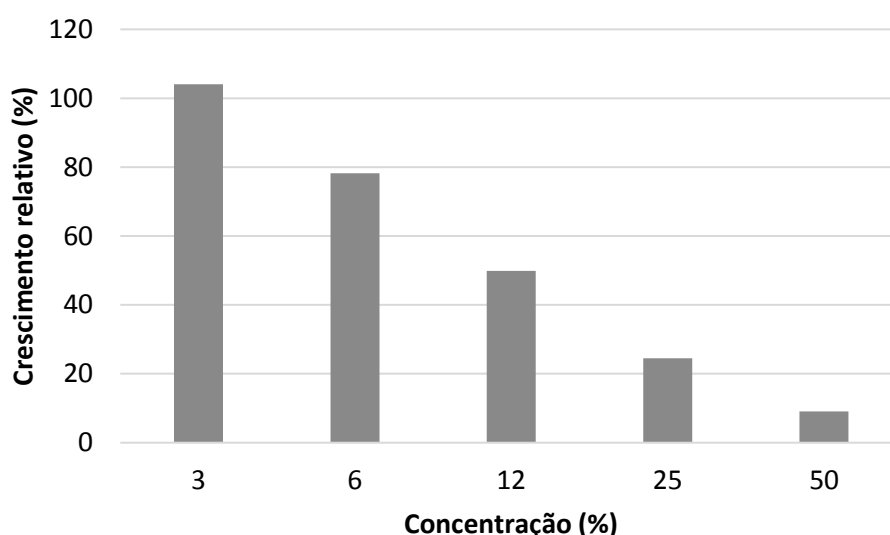


Fonte: dados da pesquisa

Vilar (2017) avaliaram a germinação relativa e absoluta de sementes de alface na presença de vinhaça de cana-de-açúcar in natura e após tratamento biológico com fungo *Pleurotus sajor-caju* e subsequente oxidação eletroquímica. Os índices de germinação ficaram abaixo de 75% mesmo na menor concentração de vinhaça in natura (12,5%), e diminuíram com o aumento da concentração de vinhaça. O tratamento biológico combinado com o tratamento eletroquímico mostrou-se mais eficaz, onde os índices de germinação permaneceram próximos a 100% até a concentração de 50% de vinhaça.

O crescimento relativo diminuiu a medida em que se aumentou a concentração de vinhaça FA (Figura 3).

Figura 3 - Crescimento relativo (%) de sementes de *Lactuca sativa* desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA



Fonte: dados da pesquisa

Ueno et al. (2014) quantificaram a produção de massa seca da parte aérea em plantas de alface, assim como o acúmulo foliar de nitrogênio, fósforo e potássio após aplicação de vinhaça biodigerida no solo, produzida a partir da biodigestão anaeróbia de vinhaça, utilizando lodo anaeróbio de indústria de gelatina como fonte de microrganismos. A vinhaça biodigerida demonstrou melhores índices de produção de massa seca da parte aérea e acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio em folhas do que tratamentos utilizando vinhaça in natura. Estes resultados estão relacionados ao processo de biodigestão sofrido pela vinhaça, que torna os nutrientes presentes na vinhaça bruta mais facilmente absorvíveis para as plantas. Dalri et al. (2014) estudaram o efeito do uso de vinhaça concentrada, denominada de biofertilizante, em

combinação com fertilizantes comerciais aplicados via fertirrigação nos componentes de produção da cultura da alface. Os autores verificaram que a utilização da vinhaça proporciona aumento significativo nas principais características morfológicas da alface, resultando em plantas maiores, com maior número de folhas e maior massa fresca, aumentando a produtividade da cultura da alface.

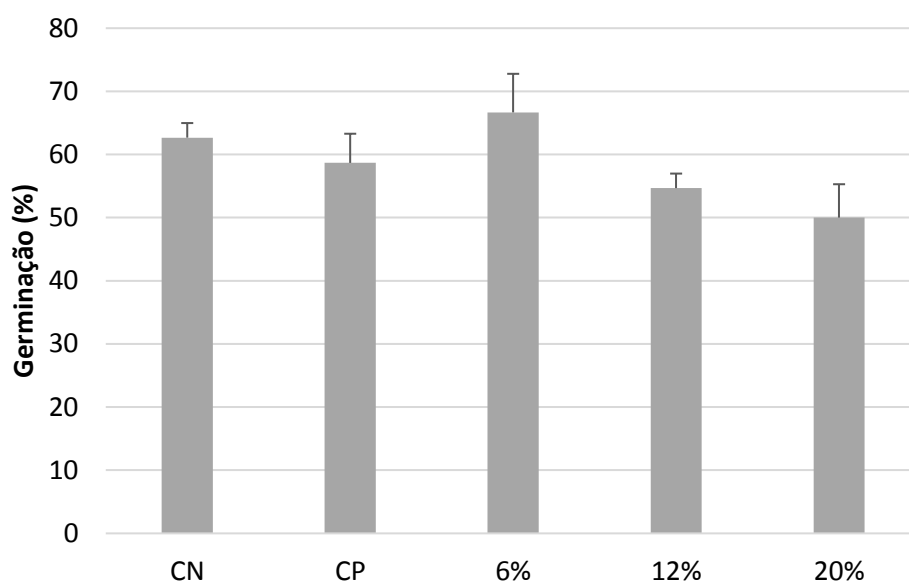
Desse modo, tem-se como opção a utilização da vinhaça FA na concentração de 3% como biofertilizante, onde o índice de germinação, a germinação relativa e o crescimento relativo praticamente não foram afetados.

3.4 Ensaio de genotoxicidade com *Allium cepa* (cebola)

Segundo Christofolletti et al. (2013), genotoxicidade é a capacidade de um determinado agente ou substância induzir mudanças no material genético de organismos expostos, e, quando essas alterações não são corretamente corrigidas, podem resultar em cânceres e doenças hereditárias.

Pelos ensaios de fitotoxicidade realizados com *A. cepa*, foi possível observar que a vinhaça FA não alterou significativamente os índices de germinação deste organismo, em relação aos resultados do CN, para nenhuma das concentrações testadas, mostrando que esse resíduo não foi tóxico para esse organismo teste (Figura 4).

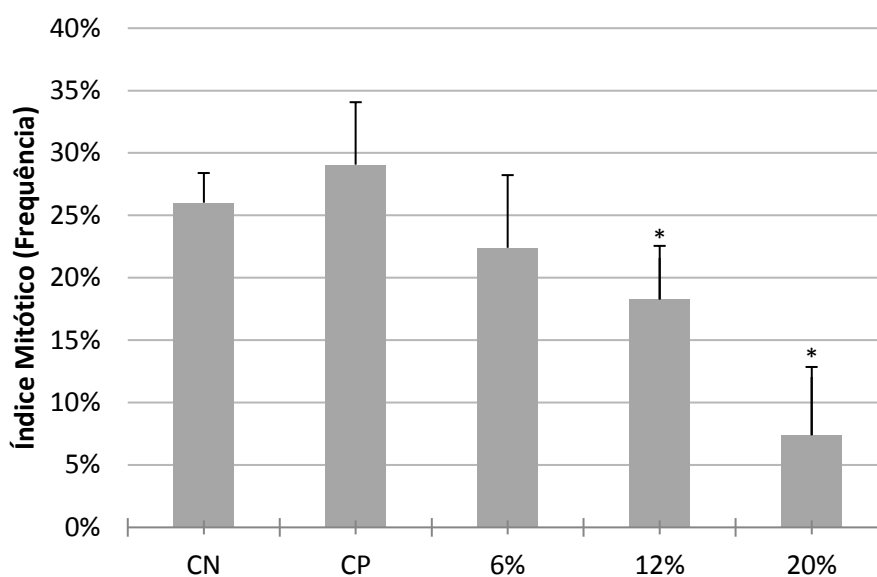
Figura 4 - Porcentagem de germinação das sementes de *Allium cepa* no ensaio de toxicidade, desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA



Fonte: dados da pesquisa

Conforme pode ser observado na Figura 5, a citotoxicidade da amostra avaliada pelo índice mitótico foi dose dependente, onde a maior concentração testada induziu o maior efeito registrado. As amostras mais concentradas (12% e 20%), apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando comparadas ao CN. Além disso, pode-se observar que a concentração de 20% de vinhaça FA foi a que exibiu o menor índice de divisão. Assim é possível inferir que as concentrações mais altas testadas para vinhaça FA interferem no potencial citostático das células de *A. cepa*, levando a diminuição dos índices mitóticos e, conseqüentemente, um decréscimo nos índices de germinação e de crescimento radicular das sementes desta espécie (Figura 4).

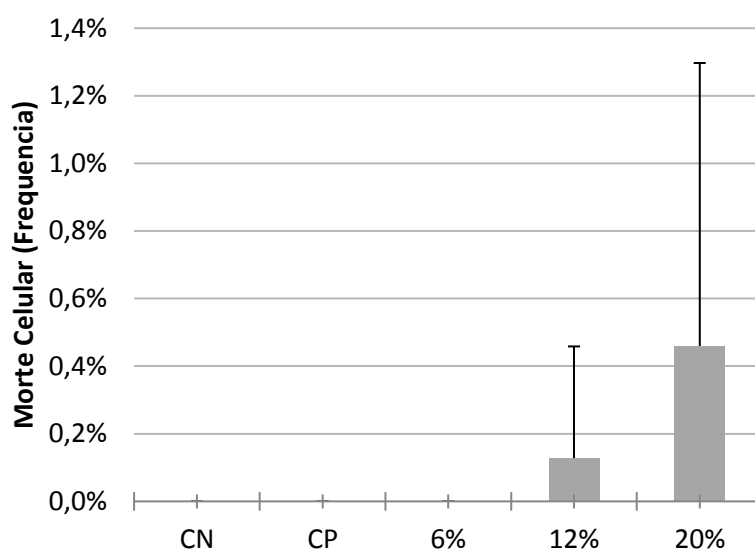
Figura 5 - Frequência do índice mitótico observado em células meristemáticas de *Allium cepa*, submetidas ao ensaio de genotoxicidade utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA



Fonte: dados da pesquisa

Os resultados observados para morte celular (Figura 6) não foram estatisticamente significativos para nenhuma das concentrações testadas da vinhaça FA em *A. cepa*. Embora as duas concentrações mais altas tenham induzido morte celular e a concentração de 20 % esteja relacionada o maior índice de morte celular registrado, os resultados não foram estatisticamente significativos em relação ao controle, provavelmente devido ao alto desvio padrão apresentado.

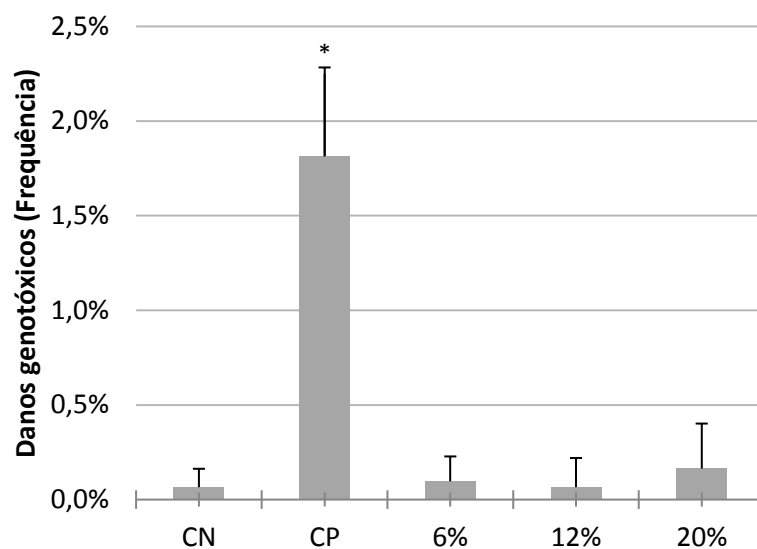
Figura 6 - Frequência de morte celular observados em células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA



Fonte: dados da pesquisa

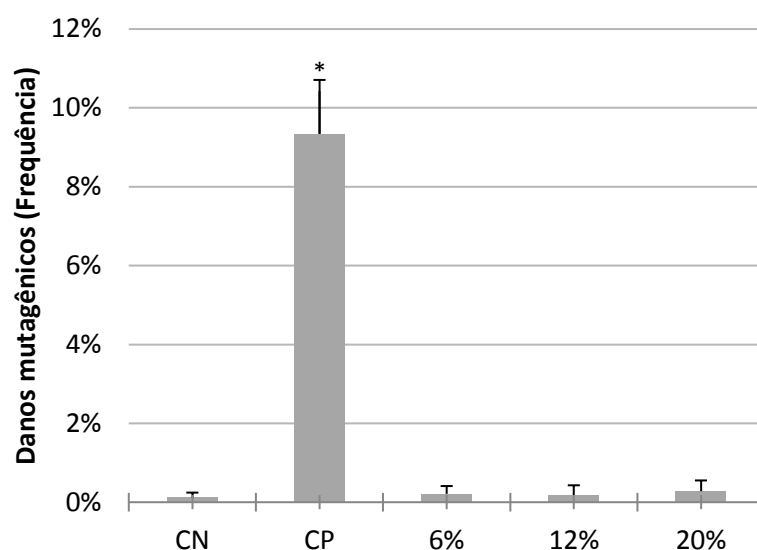
Quanto aos parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade, avaliados respectivamente pelos ensaio de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos e quebras cromossômicas (MN + QC) em *A. cepa*, não foram registrados resultados significativos para estes parâmetros, para nenhuma das concentrações testadas da vinhaça FA, como podem ser observados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 - Frequência dos danos genotóxicos observados em células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA



Fonte: dados da pesquisa

Figura 8 - Frequência dos danos mutagênicos observados em células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA



Fonte: dados da pesquisa

Diversos autores relataram que a genotoxicidade da vinhaça é devido à presença de metais como Cd, Cr, Ni, Pb, K, P, S, Fe, Mn, Zn e Cu (Marinho 2014; Souza et al., 2013;

Srivastava e Jain, 2010). Como apresentado nas Tabelas 3 e 4, a concentração da maioria dos metais analisados diminuiu após o processo de fermentação anaeróbia. Somente o potássio e o sódio permaneceram em concentrações relativamente altas. Os resultados das análises químicas de metais e dos parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade (Figuras 7 e 8) reforçam a eficiência do processo de fermentação anaeróbia na detoxicação das amostras analisadas da vinhaça FA.

Garcia et al. (2017) avaliou, por meio de bioensaios com *Allium cepa*, a toxicidade de duas diluições de vinhaça (2,5 e 5%). Os autores identificaram que as amostras induziram aberrações cromossômicas em células meristemáticas, principalmente dos tipos pontes nucleares e anafásicas, sugerindo um potencial genotóxico para esse resíduo. Souza et al. (2013), avaliando amostras de solo de uma instalação de cultivo, com e sem vinhaça de cana-de-açúcar, observaram um aumento significativo nas aberrações cromossômicas (pontes, aderências e quebras cromossômicas) das regiões meristemáticas de radículas de *A. cepa* quando a vinhaça foi adicionada ao solo. Após 33 dias, as células expostas a amostras de solo com vinhaça apresentaram múltiplas rupturas cromossômicas. Os autores concluíram pelos resultados obtidos que a vinhaça potencializou a clastogenicidade do solo. Christofoletti et al. (2013) observaram, para uma amostra de vinhaça de cana-de-açúcar, que este resíduo induziu efeitos genotóxicos para células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, mesmo após passarem pelo processo de biorremediação por invertebrados terrestres.

4 CONCLUSÃO

Com a análise dos resultados obtidos, mediante os ensaios ecotoxicológicos, é possível inferir que o descarte de vinhaça FA não deve ser feito na rede de esgoto, pois pode comprometer os organismos aquáticos, mesmo quando em baixa concentração (menor que 10%). Com relação à sua aplicação como fertilizante agrícola, as concentrações abaixo de 6% não influenciaram na germinação das sementes e no crescimento das radículas de alface. Embora a vinhaça FA não tenha induzido também efeitos genotóxicos e mutagênicos em *A. cepa*, a sua utilização em concentrações acima de 12% mostrou ser citotóxica. Desse modo, para um uso seguro da vinhaça FA como fertilizante agrícola, é indicado que esse resíduo passe por tratamento de degradação biológica, como a biodegradação, para que haja a diminuição da sua toxicidade.

5 REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas **NBR 12713** Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), 2009.

AISSE, M. M.; LOBATO, M. B.; BONA, A.; GARBOSSA, L. H. P.; JÜRGENSEN, D.; ALÉM SOBRINHO, P. Avaliação do sistema reator UASB e filtro biológico para o tratamento de esgoto sanitário. **In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. 21 João Pessoa, Anais do 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro: editora da ABES, 2001.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, 1998.

APHA **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, 2012.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. RiMa Editora, 2006.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L.G.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 4, p. 826-833, 2011.

CAMPOS, C. R. **Monitoramento da microbiota e dos parâmetros físico-químicos em vinhoto**. 2009. 79 p. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere** 72: 722–725, 2008.

CARITÁ, R.; MARIN MORALES, M. A. **Efeito genotóxico e mutagênico de amostras de águas coletadas em rios que recebem efluentes urbanos e industriais de um pólo ceramista por meio do sistema-teste *Allium cepa***. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2010.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB) **P4.231** - Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, 2006. Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4_231.pdf > Acesso em: 19 abr 2013

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO) Acomp. safra bras. cana. **Quarto Levantamento**, Brasília, 2(4): 1-76, 2016.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, Volume 33, Issue 12, Pages 2752-2761, 2013
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air & Soil Pollution**, 224 pp. 1523-1536, 2013.

CZERNIAWSKA-KUSZA, I.; KUSZA, G. The potential of the phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems. **Environmental Monitoring and Assessment**. 179: 113-121, 2011.

DALRI, A.B.; CARVALHO NETO, O.F.; MAZZONETTO, F.; CORBANI, R. Z. Fertirrigação com vinhaça concentrada no desenvolvimento da alface. **Revista Agrogeoambiental**, v.6, n.2, jun. 2014. doi:<http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v6n22014559>.

DING, L.; JING, H.; QIN, B.; QI, L.; LI, J.; WANG, T.; LIU, G. Regulation of cell division and growth in roots of *Lactuca sativa* L. seedlings by the *ent*-kaurene diterpenoid rhabdosin B. **Journal of Chemical Ecology**. 36(5):553-563, 2009.

EPA. Ecological Effects Test Guidelines. **OPPTS850.4200. Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Test**. EPA712-C-96-154, 1996.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 88: 252-259, 2007.

FERNICOLA, N.A.G.G.; BOHRER-MOREL, M B.C.; BAINY, A.C.D. Ecotoxicologia. **In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M.. As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003.

FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M.; BALLONI, W.; FLORENZANO, G. Utilização de subprodutos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II. Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Revista de Microbiologia**. 17: 15-25, 1986.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Anaerobic digestion of stillage to produce bioenergy in the sugarcane-to-ethanol industry. **Environmental technology**, 35: 333-339, 2014.

GARCIA, C.F.H.; DE SOUZA, R.B.; DE SOUZA, C.P.; CHRISTOFOLETTI, C.A., FONTANETTI, C.S. Toxicity of two effluents from agricultural activity: Comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 142, 216-221, 2017.

GÓMEZ, J.; RODRÍGUEZ, O. Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity. **Revista de la Facultad de Agronomía**. 17: 318-326, 2000.

GONÇALVES, C.A.S.; SILVA, E.L. Tratamento Físico-Químico da Vinhaça. **In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Alegre. Anais...**, Ref. I-021, 2000.

GREEN, E.M. Fermentative production of butanol - the industrial perspective. **Current opinion in biotechnology**, 22: 1-7, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.004>

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURFTON, R.B. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, 11:714–719, 1977. doi:10.1021/es60130a004

HOSHINA, MÁRCIA M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72: 2090-2095, 2009.

LAIME, E.M.; FERNANDES, P.D.O.; SOUZA, D.C.D. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, Chapadinha. 5:16-29, 2011.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 650: 80–86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 682: 71, 81, 2009.

LIU, S.; QURESHI, N. How microbes tolerate ethanol and butanol. **New Biotechnology** 26(3-4): 117–21, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.984>

MACHADO, O.; FREIRE, F.B. "Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB)." **IV Semana do Meio Ambiente da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Anais 1** 170-188, 2009.

MARINHO, J.F.U.; CORREIA, J.E.; DE CASTRO MARCATO, A.C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and environmental safety**, 110, 239-245, 2014.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere** 85: 13–18, 2011.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; LEVY, C.E.; FONTANETTI, C.S.; MARIN-MORALES, M.A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, 56: 60, 69, 2015.

MESSETTI, M.A.; DA SILVA, A.J.; DOS SANTOS, G.M.; GOVONE, J.S.; DE ANGELIS, D.F. Biodegradation and toxicity of waste from anaerobic fermentation of stillage. **African Journal of Biotechnology**, 16(37), 1863-1870, 2017.

METCALF & EDDY, BURTON, F. L., STENSEL, H. D., & TCHOBANOGLOUS, G. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. McGraw Hill, 2003.

MOHANA, S.; ACHARYA, B.K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**. 163: 12-25, 2009.

MONOT, F.; MARTIN, J.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. **Applied and Environmental Microbiology** 44(6): 1318–1324, 1982.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNADES, G. D. (LARGEA/) Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes. Piracicaba: IPEF/LCF/ESALQ/USP, **Informativo Sementes IPEF**, 1998.

NOUR, E.A.A.; CANDELLO, F.P.; DOS SANTOS, E.M.R.; BARRETTO, A.S.; DOMINGUES, L.M. Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, 2014.

9(1). <http://dx.doi.org/10.5132/eec.2014.01.010>

QURESHI, N.; EZEJI, T.C. Butanol, “a superior biofuel” production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.85>

ROCHA, M. H.; NETO, A. E.; SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S.; VENTURINI, O. J.; OLMO, O. A.; RAMBLA, M. A. O. Resíduos da produção de biocombustíveis: vinhaça e glicerina. In: LORA, E. E. S.; VENTURINI, O. (Org.) **Biocombustíveis**: volume 2. Rio de Janeiro: Interciência, 2012. Capítulo 12. p. 691-809.

RODELLA, A. A.; ZAMBELLO JÚNIOR, E.; ORLANDO FILHO, J. Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminum content. **In: Congress of the International Society of Sugar cane technologists, Havana. Proceedings**. Havana: Universidad de La Habana, 189-214, 1983.

RODRÍGUEZ, E.; LOPES, A.; POLANCO, M.F.; STAMS, A.J.; GARCÍA-ENCINA, P.A. Molecular analysis of the biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse at anaerobic and micro-aerobic conditions. **Applied microbiology and biotechnology**, 93(5), 2181-2191, 2012.

RUDNIK, E. **Compostable polymer materials**. Elsevier Ltd, 211, 2008.

SANTOS, G.M. **Efeito da vinhaça na produção biológica de álcoois e ácidos orgânicos voláteis por meio de consórcio microbiano**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola, Área de concentração: Água e Solo – Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SÃO PAULO. Decreto n. 8.468, de 8/9/1976: Regulamento da lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente. **Diário Oficial do Estado, S. Paulo**, 9 set. 1976. p. 8-9.

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K.K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.93, p.8-12, 2009.

SOUZA, R.S.; MORAES SANTOS, D.V.; MORAIS SILVA, V.L.M. Estudo da cinética de adsorção do bagaço da cana-de-açúcar na remoção de chumbo (Pb). In: **2º Congresso Químico do Brasil**. Associação Norte-Nordeste de Química, Brazil, 2009.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, 185: 1627–1636, 2013.

TAUK, S.M. **Efeito de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de culturas do milho e cana-de-açúcar no município de Corumbataí, SP**. Tese (Livre-docência), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1987.

UENO, C.R. J.; COSTA, A.C.S.; GIMENES, M.L.; ZANIN, G.M. Agricultural recycling of biodigested vinasse for lettuce production. **Revista Ambiente & Água**, 9(4), 593-601. 2014. <https://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1313>

USEPA 712-C-96-154. **(OPPTS 850.4200). Seed germination / root elongation toxicity test**. Ecological effects test guidelines. Washington DC, 1996.

VILAR, D.S.; CARVALHO, G.O.; PUPO, , M.M.S.; TORRES, N. H.; AGUIAR, M.M.; AMÉRICO, J.H.P.; EGUILUZ, K.I.B.; SALAZAR-BANDA, G.R.; LEITE, M.S.; FERREIRA, L.F.R. Effects of vinasse on germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) **XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA** 3 a 6 de setembro de 2017 Aracaju, Sergipe, Brasil.

WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, 19: 63-102, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00017-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9)

ŽALTAUSKAITĖ, J.; ČYPAITĖ, A. Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants. **Environmental Research - Engineering and Management**. 46: 42-47, 2008.

6. CONCLUSÕES

Com relação ao processo de fermentação anaeróbia (fermentação ABE):

- pode ser realizado utilizando-se a vinhaça, um resíduo agroindustrial, bem como o melaço, subproduto da fermentação etanólica;
- nas condições experimentais deste trabalho gerou principalmente etanol, ácido succínico, ácido láctico, ácido acético e ácido butírico;
- a adição de melaço ao meio de cultura favoreceu a predominância de *Lactobacillus* sobre as demais espécies da cultura mista utilizada, evidenciada pela produção de ácido láctico, etanol e ácido acético. Espécies de *Clostridium* foram favorecidas na presença de vinhaça, evidenciada pela produção de ácido butírico e isobutírico.

Com relação à vinhaça FA:

- ocorreu diminuição de DQO e DBO após o processo fermentativo, quando comparado com a vinhaça bruta utilizada, diminuindo seu potencial poluidor;
- a presença de sulfato em nível elevado na vinhaça FA, aliada a elevada toxicidade para o microcrustáceo *D. similis* inviabilizam seu descarte em corpos hídricos;
- concentrações de vinhaça FA abaixo de 6% não influenciaram na germinação das sementes e no crescimento das radículas de *L. sativa* (alface). Embora não tenha induzido efeitos genotóxicos e mutagênicos em *A. cepa* (cebola), sua utilização em concentrações acima de 12% mostrou ser citotóxica;

- nos ensaios de biodegradação da vinhaça FA em solo, realizadas mediante o método respirométrico, a eficiência foi superior a 30% ao final de 13 dias de ensaio para todas as concentrações avaliadas, na presença e ausência de inóculo comercial. Ao final de 57 dias, a maior eficiência foi observada para a amostra com solo contendo 3% de vinhaça FA. Apesar de sua adição não ter se mostrado estatisticamente significativa, o inóculo acelerou o processo de biodegradação em todas as amostras avaliadas. Amostras na presença do inóculo atingiram 30% de eficiência de biodegradação em um tempo menor;
- desse modo, são necessários mais estudos para o uso seguro da vinhaça FA como fertilizante agrícola, sendo indicado que esse resíduo passe por tratamento de degradação biológica, como a biodegradação em solo, para que haja a diminuição da sua toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**: 13 ed., Washington, D. C., p. 95, 1995.

AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) **NBR 14.283** Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) **NBR 12713** Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), 2009.

AHN, J.H., SANG, B.I, UM, Y. Butanol production from thin stillage using *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology** 102:4934-4937, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.046>

ALMEIDA, N.C.; TOMASELLA, R.C.; GOVONE, S.; KINJO, S.; ANGELIS, D.F. Study of stillage biodegradation by respirometry in sandy and clay soils. **African Journal of Agricultural Research** 8(35): 4506-4513, 2013. <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR12.1555>

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, 1998.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, 2012.

ARIENZO, M.; CHRISTEN, E.W.; QUAYLE, W.; KUMAR, A. A review of the fate of potassium in the soil-plant system after land application of wastewaters. **Journal of Hazardous Materials**, v.164, p.415-422, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.095>

ARNAIZ, R. R. **Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos**. Mexico, 2. ed., 267p, 1995.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science** 100(1): 68-70, 1965.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34(1): 65-68, 2003.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000500022>

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L.G.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 4, p. 826-833, 2011.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 27(1): 18-26, 2001. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000155>

BRASIL. Decreto n. 8.468, de 8/9/1976: Regulamento da lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente. **Diário Oficial do Estado**, S. Paulo, 9 set. 1976. p. 8-9.

BRITO, M. F. F. **Análise do ciclo de vida da produção do butanol**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Politécnico do Porto, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Depto. de Engenharia Mecânica, Porto, Portugal, 2015.

BRYANT, D. L.; BLASCHEK, H. P. Buffering as a means for increasing growth and butanol production by *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 49–55, 1988.

CABELLO, P.E.; SCOGNAMIGLIO, F.P.; TERÁN, F.J.C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbico de leito fluidizado. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**. 6(1):321-338, 2009.

CAMPOS, C. R. **Monitoramento da microbiota e dos parâmetros físico-químicos em vinhoto**. 2009. 79 p. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB) **Norma técnica L. 6.245** – Coleta e preparação de amostras. Procedimentos, São Paulo, 25p, 1984.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB) **P4.231** - Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, 2006. Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4_231.pdf > Acesso em: 19 abr 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) Acomp. safra bras. cana. **Quarto Levantamento**, Brasília, 2(4): 1-76, 2016.

CORAZZA, R. I. Reflexões sobre o papel das políticas ambientais de ciência e tecnologia na modelagem de opções produtivas ‘mais limpas’ numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre o problema da disposição da vinhaça. **Anais do III Encontro Nacional da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**, 1999.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.; ESPINDOLA, E.L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, 31(7), 1820-1830, 2008.

DAVIS, L., JEON, Y.-J., SVENSON, C., ROGERS, P., PEARCE, J., PEIRIS, P., Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v.29 (1), p.49–59, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.02.006>

DEWHURST, R. E.; WHEELER, J. R.; CHUMMUN, K. S.; MATHER, J. D.; CALLAGHAN, A.; CRANE, M. The comparison of rapid bioassays for the assessment of

urban ground water quality. **Chemosphere**, v.47, p.547–554, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00060-7)

DOWD, M.K.; JOHANSEN, S.L.; CANTARELLA, L.; REILLY, P.J. Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 42(2): 283-288, 1994.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf00038a011>

EPA. ECOLOGICAL EFFECTS TEST GUIDELINES. **OPPTS850.4200**. Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Test. EPA712-C-96-154. April 1996.

STEPHENS, G. M.; HOLT, R. A.; GOTTSCHAL, J. C.; MORRIS, J. G. Studies on the stability of solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. **Journal of Applied Microbiology**, 58(6), 597-605, 1985.

EZEJI, T.C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Bioproduction of butanol from biomass: From genes to bioreactors. **Current Opinion in Biotechnology** 18: 220-227, 2007.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.002>

EZEJI, T.; BLASCHEK, H.P. Fermentation of dried distillers' grains and soluble (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic *Clostridia*. **Bioresource Technology**, v.99 (12), p.5232–5242, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.032>

FERRAZ, C.A.M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M.; BALLONI, W.; FLORENZANO, G. Utilização de subprodutos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II. Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Revista de Microbiologia**, 17:15-25, 1986.

FISKESJO, G. The *Allium test*. An alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.197, n.2, p.243-260, 1988. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90096-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90096-6)

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 203p, 2000.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of environmental management**, v. 145C, p. 210–229, 21 jul. 2014.

GOMES, M.T.M.S.; EÇA, K.S.; VIOTTO, L.A. Concentração da vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração com membranas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46(6): 633-638, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600009>

GÓMEZ, J.; RODRÍGUEZ, O. Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity. **Revista de la Facultad de Agronomía**, 17: 318-326, 2000.

GONÇALVES, C.A.S.; SILVA, E.L. Tratamento Físico-Químico da Vinhaça. In: **Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental**, 27. ABES, Fortaleza, 2000. p. 1-8

GONZALEZ, R.; CAMPBELL, P.; WONG, M. Production of ethanol from thin stillage by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 32(3): 405–411, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-009-0159-2>

GREEN, E.M. Fermentative production of butanol - the industrial perspective. **Current opinion in biotechnology**, 22: 1-7, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.004>

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURFTON, R.B. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, 11:714–719, 1977. doi:10.1021/es60130a004

HERKOVITS, J.; CARDELLINI, P.; PAVANATI, C.; PEREZ-COLL, C. S. Susceptibility of early life stages of *Xenopus laevis* to cadmium. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, n.2, p.312-316, 1997. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620160229>

JARDIM, G. M. **Estudos Ecotoxicológicos da Água e do Sedimento do Rio Corumbataí, SP**. Dissertação. (Mestrado). 2004. 138 f. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

JONES, D.T.; WOODS, D.R. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiological Reviews**, v.50, p.484–524, 1986.

KIM, Y.; MOSIER, N.S.; HENDRICKSON, R.; EZEJI, T.; BLASCHEK, H.; DIEN, B.; COTTA, M.; DALE, B.; LADISCH, M.R. Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. **Bioresource Technology**, 99(12): 5165-5176, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.028>

LELIS NETO, J.A. **Monitoramento de componentes químicos da vinhaça aplicados em diferentes tipos de solo**. 88p. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Área de concentração: Irrigação e Drenagem – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.682, p.71–81, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>

LINDEN, J.C.; MOREIRA, A.R.; LENZ, T.G. Acetone and butanol comprehensive biotechnology. The principles, application and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. In: M.Y. MURRAY, W.B. HARVEY, S. DREW, D.I.C. WANG (Eds): **The practice of biotechnology: current commodity product**, vol.3, Pergamon Press, London, p.915-929, 1985.

LIU, S.; QURESHI, N. How microbes tolerate ethanol and butanol. **New Biotechnology** 26(3-4): 117–21, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.984>

LUDOVICE, M.T.F. **Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre lençol freático**. 143 p. Tese (Mestrado em Engenharia Civil) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997.

MARIANO, A.P.; CRIVELARO, S.H.R.; ANGELIS, D.F.; BONOTTO, D.M. The use of Vinasse as an Amendment to Ex-Situ Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated with Diesel Oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 52(4): 1043-1055, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000400030>

MARIANO, A.P.; QURESHI, N.; MACIEL FILHO, R.; EZEJI, T.C. Bioproduction of Butanol in Bioreactors: New Insights From Simultaneous In Situ Butanol Recovery to Eliminate Product Toxicity. **Biotechnology and Bioengineering**, 108: 1757–1765, 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.23123>

MARIANO, A.P.; MACIEL FILHO, R. Improvements in Biobutanol Fermentation and Their Impacts on Distillation Energy Consumption and Wastewater Generation. **Bioenergy Research**, 5: 504–514, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-011-9172-0>

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; LEVY, C.E.; FONTANETTI, C.S.; MARIN-MORALES, M.A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, 56: 60, 69, 2015.

MELLO, E.B.; CANEPA, E.L.; COSTA, M.M. Visões Ambientais para o Financiamento de Biocombustíveis no Brasil. In: **Workshop A Expansão da Agroenergia e seus Impactos sobre os Ecossistemas Naturais Brasileiros, Anais**. Rio de Janeiro: FBDS, CIB, BNDES, 2007. Disponível em: http://www.conservation.org.br/publicacoes/files/15_Finaciamento_Biocombust_BNDES.pdf >Acesso em: abr 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426- 428, Mar. 1959.

MONOT, F.; MARTIN, J.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. **Applied and Environmental Microbiology**, 44(6): 1318–1324, 1982.

MORAES, D. S. L.; JORDAO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. In: ZAGATO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, Cap. 2, p.15-38, 2006.

NI, Y.; WANG, Y.; SUN, Z. Butanol production from cane molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: batch and semicontinuous fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 1896–907, abr. 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9614-y>

NOUR, E.A.A.; CANDELLO, F.P.; DOS SANTOS, E.M.R.; BARRETTO, A.S.; DOMINGUES, L.M. Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, 9(1), 2014. <http://dx.doi.org/10.5132/eec.2014.01.010>

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. **Environmental indicators**. Paris, 159 p., 1994.

OECD - Guideline for the testing of chemicals. **Test No. 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil**, OECD Publishing, Paris, 2002.

PRADA, S.M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA, M.E.V. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, 21(3), 249-252, 1998.

QUITERIO, G.M. **Avaliação do processo de biodegradação da vinhaça no solo mediante adição do biofertilizante**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia, Área de concentração: Tecnologia e Inovação - Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2013.

QURESHI, N.; EZEJI, T.C. Butanol, “a superior biofuel” production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.85>

RODELLA, A. A.; ZAMBELLO JR, E.; FRANCISCO, J. O. Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminium content. In: **18. Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Ciudad de La Habana (Cuba)**, 21-26 Feb 1983.

RONCO, A.; BAEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Conceptos Generales. In: **MORALES, G. C. (Ed.), Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. IMTA: Mexico, 142p, 2004.

SANTOS, M.F.R.F.; BORSCHIVER, S.; COUTO, M.A.P.G. O complexo agroindustrial da cana-de-açúcar no Brasil: uma discussão sobre aspectos atuais relacionados ao etanol biocombustível. **Revista Economia & Tecnologia**, v. 7, n. 1, 2011.

SANTOS, G.M. **Efeito da vinhaça na produção biológica de álcoois e ácidos orgânicos voláteis por meio de consórcio microbiano**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola, Área de concentração: Água e Solo – Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SAURABH CHANDRA, L. K. S.; CHAUHANA, R. C.; MURTHYB, P. N.; SAXENA, P. N.; PANDEC, S. K.; GUPTA, T. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**, v.347, p.46-52, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.002>

SILVA, N.B. **Avaliação química e ecotoxicológica de lodos e esgoto visando à utilização na agricultura**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, área de Saneamento e Ambiente, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SILVA, M. A. S. DA; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, p.108- 114, 2007.

SYDNEY, E. B. **Valorization of vinasse as broth for biological hydrogen and volatile fatty acids production by means of anaerobic bacteria**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2013.

SYDNEY, E.B; LARROCHE, C.; NOVAK, A.C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S.J.; BRAR, S. K.; SOCCOL, C.R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource technology**, v. 159, p. 380–6, maio 2014.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 31(9): 401–408, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-004-0159-0>

TAUK, S.M. **Efeito de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de culturas do milho e cana-de-açúcar no município de Corumbataí, SP.** Tese (Livre-docência), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil, 1987.

UNIVERSITY CENTER FOR ENVIRONMENTAL INQUIRY AT CORNELL,
"Environmental Inquiry, Authentic Scientific Research for High School Students", 2009. Disponível em: <http://ei.cornell.edu/index.html>

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) **Method 6010C**. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Revision 3, 2007.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) **Method 7062** Antimony and Arsenic (Atomic Absorption, Borohydride Reduction). Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Third Edition, 1994

VAN ANDEL, J. G; ZOUTBERG, G. R., CRABBENDAM, P. M.; BREURE, A. M. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 21–26, 1985.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, 73(7): 1163–1172, 2001.

VISIOLI, L. **Avaliação da produção biotecnológica de butanol a partir de sorgo sacaríneo.** 2014, Tese (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass Bioenergy**, 19: 63-102, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00017-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9)

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**, Prentice Hall, EUA, 4ª ed., 1999.