

Remoción de nitrógeno en vinaza de caña de azúcar por cultivo heterotrófico de la cianobacteria filamentosa *Geitlerinema* sp.

Reinaldo Gaspar Bastos, Mauricio Daniel Montaña Saavedra, Jéssica Cristina Fonte, Isabely Fernanda Pizarro

Laboratorio de Microbiología Aplicada e Controle (LABMAC), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rodovia Anhanguera, km 174 SP-330. Araras. São Paulo. Brasil. CEP 13600-970. e-mail: mauriciomontano2@gmail.com

RESUMEN

La vinaza es el principal efluente líquido del proceso de producción de etanol combustible a partir de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Debido a los grandes volúmenes generados, su tratamiento es uno de los mayores desafíos para el sector azucarero. *Geitlerinema* es una cianobacteria filamentosa con metabolismo heterotrófico, lo que hace posible su cultivo para tratar efluentes de elevada turbidez como la vinaza. El objetivo de este estudio fue determinar el potencial del cultivo heterotrófico de *Geitlerinema* sp. como método de tratamiento de vinaza de caña de azúcar. El cultivo se realizó en el efluente sin diluir, con adición de glucosa (10 g l⁻¹). Se registraron los cambios en la concentración de biomasa, carbono orgánico y nitrógeno total. El porcentaje de lípidos y proteínas de la biomasa se determinó al final del experimento. La cianobacteria filamentosa no incrementó su biomasa durante 24 h de cultivo. Se observó remoción de carbono (35%) y nitrógeno (75%). La composición final de la biomasa en lípidos y proteínas fue de 15.0 y 14.6% (m/m), respectivamente. La remoción del 75% del nitrógeno total del medio de cultivo observado al final del experimento sugiere el potencial de la cianobacteria como opción para el tratamiento de la vinaza de caña de azúcar.

Palabras clave: destilería, efluente, glucosa, microalga, nutrientes

Nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic culture of filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp.

ABSTRACT

Vinasse is the main liquid effluent from the production process of fuel ethanol from sugarcane (*Saccharum* spp.). Due to the large volumes generated, its treatment is one of the biggest challenges for the sugar sector. *Geitlerinema* is a filamentous cyanobacterium with heterotrophic metabolism. For this reason is possible to culture it for treating high turbidity effluents, such as vinasse. The objective of this study was to determine the potential of the heterotrophic culture of *Geitlerinema* sp. as a treatment method for sugarcane vinasse. It was cultivated in the undiluted effluent, with the addition of glucose (10 g l⁻¹). The changes in the concentration of biomass, organic carbon and total nitrogen were recorded. The percentage of lipids and proteins of the biomass was determined at the end of the experiment. The filamentous cyanobacteria did not increase its biomass during 24 h of culture. Carbon (35%) and nitrogen (75%) removal was observed. The final composition of the biomass in lipids and proteins was 15.0 and 14.6% (m / m), respectively. The removal of 75% of the total nitrogen from the culture medium observed at the end of the experiment suggests the potential of the cyanobacterium as an option for the treatment of sugarcane vinasse.

Keywords: distillery, effluent, glucose, microalgae, nutrients

INTRODUCCIÓN

Brasil es el mayor productor de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) del mundo, y cubre el 40% del mercado global (FAO, 2014). Este cultivo es la materia prima para la elaboración de

azúcar y etanol combustible. Este último es uno de los 10 productos más importantes para la economía brasileña (IBGE, 2015). Se estima que para la obtención de 1 litro de etanol combustible se generan entre 9 a 14 litros de vinaza (Silva *et al.*, 2007), el principal efluente

líquido de esta industria. Entre sus características fisicoquímicas más importantes se encuentran: pH ácido, color café oscuro, elevada turbidez y una alta concentración de materia orgánica y nutrientes (Carrilho *et al.*, 2016). Tomando en cuenta que anualmente se producen cerca de 27.5 billones de litros de etanol combustible en Brasil (IBGE, 2015), el tratamiento de la vinaza es uno de los mayores desafíos para el sector sucroalcoholero en aras de disminuir el efecto ambiental negativo de este residual.

Entre las opciones para el tratamiento de este efluente se pueden encontrar la electrocoagulación (Khandegar y Saroha, 2012), digestión anaerobia (Moraes *et al.*, 2015), procesos oxidativos avanzados (Thanapimmetha *et al.*, 2017), cultivo de microorganismos (Bastos *et al.*, 2015; Santana *et al.*, 2017) y una combinación de los métodos anteriormente citados (Siles *et al.*, 2011; Aziz *et al.*, 2016; España-Gamboa *et al.*, 2017). Se destaca el cultivo de microalgas y cianobacterias ya que su biomasa puede ser utilizada para la producción de biocombustibles y bioproductos de alto valor agregado (Brasil *et al.*, 2017).

Estos microorganismos se cultivan generalmente bajo condiciones para el metabolismo fotoautotrófico, aprovechando su capacidad de realizar fotosíntesis (Fariel *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a que la vinaza presenta una elevada turbidez, esta forma de cultivo solo es posible después de algún pretratamiento que clarifique el medio (Marques *et al.*, 2013) o en el efluente diluido (Santana *et al.*, 2017).

Se sabe que algunas cianobacterias pueden realizar el metabolismo heterotrófico y desarrollarse sin la necesidad de provisión de luz, pero con la exigencia de una fuente de carbono orgánico y oxígeno molecular (Pérez-García *et al.*, 2011). Esta forma de cultivo posibilita, además, aumentar la concentración de biomasa en el proceso, la cual tiende a acumular mayor cantidad de lípidos, comparado con el cultivo fotoautotrófico, lo que es de especial interés para la posterior producción de biodiesel (Venkata Mohan *et al.*, 2015).

Por otro lado, estudios consideran que entre el 20 y el 30% del costo de producción de biomasa de microalgas está asociado al

proceso de separación o cosecha de estos microorganismos del medio de cultivo líquido (Barros *et al.*, 2015), lo que puede reducir la factibilidad económica de todo el proceso productivo (Richardson *et al.*, 2014). En este sentido, el cultivo de cianobacterias filamentosas puede facilitar esta operación debido a sus elevadas dimensiones (cerca de 200 μm) en comparación a aquellas microalgas y cianobacterias unicelulares (< 30 μm) (Markou y Georgakakis, 2011).

Entre las cianobacterias filamentosas se encuentran los géneros *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Nadularia*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Phormidium*, *Nostoc*, *Nostochopsis* y *Scytonema*, entre otros (Markou y Georgakakis, 2011). Sin embargo, hay pocas referencias en la literatura científica sobre el cultivo y tratamiento de efluentes con el empleo del género *Geitlerinema* (Sánchez-Alejandro y del Pilar, 2015), el cual está ampliamente distribuido en el territorio brasileño (Menezes y Bicudo, 2010). Atendiendo a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el potencial del cultivo heterotrófico de la cianobacteria filamentososa *Geitlerinema* sp. como método para el tratamiento de vinaza de caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Control del centro de Ciencias Agrarias de la Universidad Federal de São Carlos (UFSCar), localizado en la ciudad de Araras, en el estado de São Paulo, Brasil.

La vinaza usada en el estudio fue colectada de un ingenio sucroalcoholero de la ciudad de Araras, estado de São Paulo. Entre sus características físico-químicas se encontraban: color café oscuro, olor característico, pH 4.0, 3.72 g l⁻¹ de carbono orgánico total (TOC), 0.29 g l⁻¹ de nitrógeno total (TN), relación carbono/nitrógeno (C/N) de 12.8.

Se utilizó una cepa de *Geitlerinema* sp. gentilmente donada por el Instituto Botánico de São Paulo. La cianobacteria fue propagada autotróficamente en medio de cultivo estándar BG11 con pH 7.5 (Ripka *et al.*, 1979) hasta una concentración celular aproximada

de 1 g l^{-1} , con aeración constante, a 25°C , fotoperiodo de 12 h: 12 h y radiación fotosintéticamente activa (PAR) de aproximadamente $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

El medio de cultivo para el experimento fue preparado con vinaza sin diluir y adición de glucosa (10 g de glucosa por litro de vinaza). Para la inoculación, un volumen suficiente de inóculo fue concentrado por centrifugación durante 20 minutos a $3\,500 \text{ rpm}$ y 15°C . El sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en el medio de cultivo previamente esterilizado (autoclave a 121°C por 20 minutos) y con pH corregido a 7.5 con adición de NaOH. El cultivo heterotrófico de la cianobacteria fue realizado con tres repeticiones, en agitador orbital (TE-420 TECNAL®, Brasil) a 25°C en frascos Erlenmeyer® de 125 ml de capacidad cubiertos de la incidencia de la luz, que contenían 25 ml de medio de cultivo y 75 mg de biomasa (concentración inicial de biomasa en cada frasco de aproximadamente 3 g l^{-1}).

En tiempo cero (medio de cultivo inoculado) y después de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas de cultivo se determinaron: la biomasa (g l^{-1}) por filtración de un volumen conocido en membrana de $0.22 \mu\text{m}$ de poro y posterior secado a 105°C hasta masa constante y la concentración de TOC y TN del medio de cultivo (g l^{-1}) mediante analizador TOC (TOC-LCPN SHIMADZU®, Japón). Los resultados se presentaron como el valor medio de tres mediciones ($n=3$) y su respectiva desviación estándar. La relación C/N durante el cultivo fue calculada como la división del valor de TOC entre TN del medio de cultivo en cada

intervalo de tiempo. Por último, al cabo de 24 horas de cultivo se cuantificó el contenido de lípidos y proteínas de la biomasa por los métodos propuestos por Bligh y Dyer (1959) y Dorsey *et al.* (1978), respectivamente, y se expresó como porcentaje másico respecto a la biomasa seca ($\%/m$).

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software R versión 3.4.0. Las medias fueron comparadas mediante análisis de variancia (ANOVA) y prueba de Tukey, para $p < 0.05$, previa comprobación de los supuestos de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La curva de crecimiento de la cianobacteria filamentosa *Geitlerinema* sp. en vinaza de caña de azúcar sin diluir y con adición de glucosa, durante 24 horas de cultivo expresada como logaritmo natural de la relación entre la biomasa a cada tiempo de cultivo (x) y la biomasa inicial ($x_0 = 2.89 \pm 0.03 \text{ g l}^{-1}$), no mostró una clara diferencia entre las fases típicas de cultivo (latencia, crecimiento exponencial y estacionaria) (Figura 1). Sin embargo, pudo observarse mantenimiento de la biomasa en valores próximos al valor inicial por lo menos en las 12 primeras horas de cultivo. A partir de ese periodo se observó un decrecimiento de la biomasa. Después de 24 horas de cultivo alcanzó $2.64 \pm 0.23 \text{ g l}^{-1}$, sin diferencias significativas con la biomasa inicial ($p=0.13$). Este resultado sugirió que la cianobacteria se encontraba todavía en fase de adaptación después de ese periodo de tiempo.

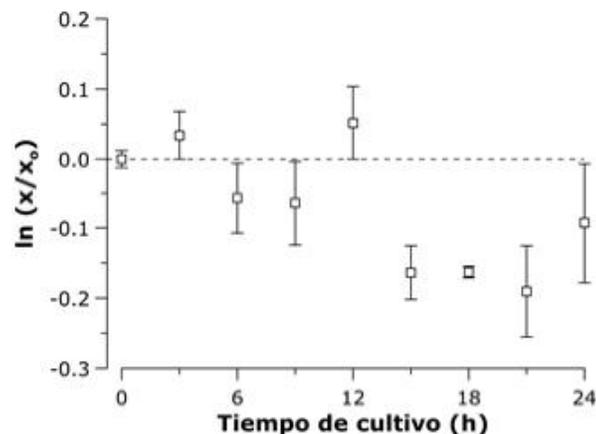


Figura 1. Curva de crecimiento de *Geitlerinema* sp. en vinaza con adición de glucosa. La línea segmentada indica el valor 0 (inicial). Los valores representan la media y su desviación estándar ($n=3$).

En un estudio similar, Mattos y Bastos (2015) cultivaron la microalga unicelular *Desmodesmus* sp. en condición heterotrófica en vinaza de caña de azúcar sin diluir. Los autores informaron una fase de adaptación inicial del microorganismo de 9 horas y posterior crecimiento exponencial hasta llegar a 3.7 g l^{-1} en 24 horas ($\mu_{\text{max}}=0.15 \text{ h}^{-1}$). Las cianobacterias filamentosas generalmente presentan una fase de adaptación mayor a las unicelulares, más aún en el cultivo heterotrófico (Chojnacka y Noworyta, 2004; Yu *et al.*, 2009; Trabelsi *et al.*, 2013). Por tanto, la adaptación de *Geitlerinema* sp. en el medio de cultivo requeriría posiblemente más de 24 horas.

Marques *et al.* (2013) en el cultivo de la microalga *C. vulgaris* en vinaza diluida con agua residual urbana indicaron una disminución de la biomasa del inóculo de 10% en las primeras horas de cultivo, debido al estrés celular causado por la transferencia del microorganismo del medio de propagación estándar, al medio de cultivo con vinaza. En el presente estudio, la disminución máxima de biomasa ocurrió entre 15 a 21 horas de cultivo, y llegó a 17.2%. Una pre-adaptación del inóculo podría ser una alternativa para disminuir el estrés causado en esta fase del proceso.

Pudo observarse, además, un aumento en la concentración de carbono orgánico y nitrógeno en el medio de cultivo en las

primeras horas del experimento. Este resultado posiblemente estuvo ocasionado por la lisis celular registrada entre 6 y 9 horas de cultivo o por la liberación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) por parte de la cianobacteria como respuesta al estrés osmótico (Candido y Lombardi, 2018) o al estrés ocasionado por el cambio de las condiciones de cultivo (Trabelsi *et al.*, 2013). Además, se sabe que la producción de estas sustancias es estimulada por la adición de glucosa al medio de cultivo (Ding *et al.*, 2013).

El cultivo de microalgas y cianobacterias es una alternativa promisor para la remoción de nutrientes de las aguas residuales agroindustriales (Venkata Mohan *et al.*, 2015). En este estudio, al cabo de 24 horas de cultivo de la cianobacteria en vinaza sin diluir con la adición de glucosa, se observó remoción de carbono y nitrógeno hasta llegar al 35 y 75%, respectivamente (Figura 2). Este resultado fue mayor al 52% de remoción de nitrógeno informado por Mattos y Bastos (2015). Sin embargo, dichos autores no adicionaron glucosa al efluente. Tal resultado sugiere el potencial de *Geitlerinema* sp. para el tratamiento de efluentes (remoción de nitrógeno).

Tomando en cuenta que no se registró aumento de biomasa con el incremento del tiempo de cultivo, la remoción de carbono orgánico podría ser atribuida al consumo de la cianobacteria para obtener energía para el

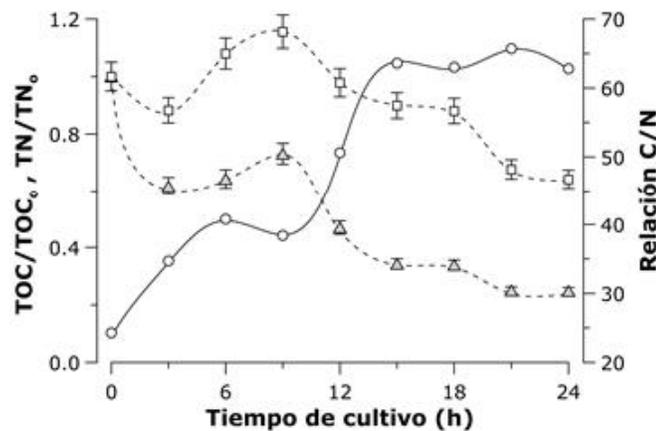


Figura 2. Relación C/N (○) y curva de remoción de carbono orgánico total (TOC/TOC₀) (□) y nitrógeno total (TN/TN₀) (△) respecto a los valores iniciales del medio de cultivo. Los valores representan la media y su desviación estándar (n=3).

mantenimiento celular. En este sentido, glucosa y compuestos orgánicos presentes en la vinaza serían usados como fuente de carbono y consumidos en la respiración celular, liberando $\text{CO}_{2(g)}$ al ambiente (Pérez-García *et al.*, 2011). Por otro lado, el consumo de nitrógeno puede estar relacionado con la síntesis de proteínas y nuevas enzimas como respuesta al cambio en las condiciones de cultivo (autotrófico en la propagación del inóculo, heterotrófico en el cultivo en vinaza) y en la fuente de nutrientes (CO_2 y nitrato en la propagación del inóculo, moléculas orgánicas en el cultivo en vinaza) (Parnaudeau *et al.*, 2008; Pérez-García *et al.*, 2011). Otra hipótesis sobre la remoción de nitrógeno puede ser la volatilización de amoníaco del medio favorecida por el intercambio de gases en la respiración celular (O_2 , CO_2) y la alcalinización del medio de cultivo (Markou *et al.*, 2014), considerando que el cultivo de la cianobacteria presentó un pH final de 8.6 al cabo de las 24 horas de experimento.

La caracterización de la biomasa al final del cultivo indicó un contenido de lípidos y proteínas de 15.0 y 14.6% (m/m), respectivamente. Porcentajes diferentes a los indicados por Sánchez-Alejandro y del Pilar (2015) en el cultivo autotrófico de *Geitlerinema lemmermannii* en medio de cultivo 2F Guillard (5-7% de lípidos y 5-30% de proteínas). La acumulación de lípidos en lugar de proteínas puede ser atribuida, por un lado, a las diferentes condiciones de cultivo, ya que en general los cultivos heterotróficos tienden a favorecer la síntesis y acumulación de lípidos (Venkata *et al.*, 2015). Por otro lado, se sabe que la limitación de nitrógeno está vinculada a la acumulación de lípidos (Markou *et al.*, 2014), por lo que la relación C/N de 65 alcanzada en las últimas horas de experimento (Figura 2) indicaría una limitación de este nutriente en el cultivo.

Los resultados del presente estudio sientan las bases para el uso de *Geitlerinema* sp. en el tratamiento de residuales. Se requieren otras investigaciones para optimizar el cultivo de esta cianobacteria en vinaza, tomando en cuenta que su morfología filamentososa puede facilitar el proceso de separación de la biomasa y el medio de cultivo, característica importante para viabilizar su cultivo a gran escala.

CONCLUSIONES

Geitlerinema sp. posee potencial de para la remoción de carbono y nitrógeno en el tratamiento de vinazas de caña de azúcar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la CAPES, CNPq y BNDES/FUNTEC por el apoyo económico al grupo de investigación en este estudio.

Conflictos de interés

Los autores no declaran conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- Aziz A, Asaithambi P, Daud W (2016) Combination of electrocoagulation with advanced oxidation processes for the treatment of distillery industrial effluent. *Process Saf Environ Prot* 99: 227-235; doi: 10.1016/j.psep.2015.11.010
- Barros A, Gonçalves A, Simões M, Pires J (2015) Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev* 41: 1489-1500; doi: 10.1016/j.rser.2014.09.037
- Bastos R, Morais D, Volpi M (2015) Influence of solid moisture and bed height on cultivation of *Aspergillus niger* from sugarcane bagasse with vinasse. *Braz J Chem Eng* 32(2): 377-384; doi: 10.1590/0104-6632.20150322s00003423
- Bligh E, Dyer W (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917; doi: 10.1139/y59-099
- Brasil B, Silva F, Siqueira F (2017) Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *N Biotechnol* 39(1): 90-98; doi: 10.1016/j.nbt.2016.04.007
- Candido C, Lombardi A (2018) The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. *Algal Res* 30: 79-85; doi: 10.1016/j.algal.2018.01.005
- Carrilho E, Labuto G, Kamogawa M (2016) Destination of vinasse, a residue from alcohol industry: Resource recovery and prevention

- of pollution. En: Prasad M, Shih K (eds). *Environmental Materials and Waste*, pp. 21-43. Elsevier, San Diego; doi: 10.1016/B978-0-12-803837-6.00002-0
- Chojnacka K, Noworyta A (2004) Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb Technol* 34(5): 461-465; doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.002
- Ding Z, Jia S, Han P, Yuan N, Tan N (2013) Effects of carbon sources on growth and extracellular polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme* under heterotrophic high-cell-density fed-batch cultures. *J Appl Phycol* 25(4): 1017-1021; doi: 10.1007/s10811-012-9928-8
- Dorsey T, McDonald P, Roels O (1978) Measurements of phytoplankton-protein content with the heated biuret-fouling assay. *J Phycol* 14(2): 167-171; doi: 10.1111/j.1529-8817.1978.tb02443.x
- España-Gamboa E, Vicent T, Font X, Dominguez-Maldonado J, Canto-Canché B, Alzate-Gaviria L (2017) Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB reactor. *J Biol Eng* 11(6): 1-11; doi: 10.1186/s13036-016-0042-3
- FAO (2014) Food and agriculture data. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Consultado 01/08/2017
- Fariied M, Samer M, Abdelsalam E, Yousef R, Attia Y, Ali A (2017) Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable Sustainable Energy Rev* 79: 893-913; doi: 10.1016/j.rser.2017.05.199
- IBGE (2015) Pesquisa Industrial - Produto. Disponible en: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/produtos/produto2015>. Consultado 15/09/2017
- Khandegar V, Saroha A (2012) Electrochemical Treatment of Distillery Spent Wash Using Aluminum and Iron Electrodes. *Chin J Chem Eng* 20(3): 439-443; doi: 10.1016/S1004-9541(11)60204-8
- Markou G, Georgakakis D (2011) Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl Energy* 88(10): 3389-3401; doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.042
- Markou G, Vandamme D, Muylaert K (2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Wat Res* 65: 186-202; doi: 10.1016/j.watres.2014.07.025
- Marques S, Nascimento I, de Almeida P, Chinalia F (2013) Growth of *Chlorella vulgaris* on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol* 171(8): 1933-1943; doi: 10.1007/s12010-013-0481-y
- Mattos L, Bastos R (2015) COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. *Desalination Water Treat* 57(20): 9465-9473; doi: 10.1080/19443994.2015.1028454
- Menezes M, Bicudo C (2010) Lista de espécies: algas. En: Forzza RC, Baumgratz JFA, Bicudo CEM, Carvalho AA, Costa C, Costa DP (eds). *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*, pp. 100. Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro; ISBN: 978-85-8874-242-0
- Moraes B, Zaiat M, Bonomi A (2015) Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable Sustainable Energy Rev* 44: 888-903; doi: 10.1016/j.rser.2015.01.023
- Parnaudeau V, Condom N, Oliver R, Cazevielle P, Recous S (2008) Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresour Technol* 99(6): 1553-1562; doi: 10.1016/j.biortech.2007.04.012
- Pérez-García O, Escalante F, de-Bashan L, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res* 45(1): 11-36; doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037
- Richardson J, Johnson M, Lacey R, Oyler J, Capareda S (2014) Harvesting and extraction technology contributions to algae biofuels

- economic viability. *Algal Res* 5: 70-78; doi: 10.1016/j.algal.2014.05.007
- Ripka R, Deruelles J, Waterbury J, Herdman M, Stanier R (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61; doi: 10.1099/00221287-111-1-1
- Sánchez-Alejandro F, del Pilar M (2015) Characterization of the growth, biochemical composition, and nutrient utilization of the cyanobacterium *Geitlerinema lemmermannii*. *J Appl Phycol* 27(3): 1177-1184; doi: 10.1007/s10811-014-0416-1
- Santana H, Cereijo C, Teles V, Nascimento R, Fernandes M, Brunale P (2017) Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization. *Bioresour Technol* 228: 133-140; doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.075
- Siles J, García-García I, Martín A, Martín M (2011) Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. *J Hazard Mater* 188(1-3): 247-253; doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.096
- Silva MA, Greibeler NP, Borges LC (2007) Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. *Rev Bras Eng Agr Amb* 11(1): 108-114; doi: 10.1590/S1415-43662007000100014
- Thanapimmetha A, Singhapong W, Amat S, Saisriyoot M (2017) Decolorization of molasses-based distillery wastewater by means of pulse electro-Fenton process. *J Environ Chem Eng* 5(3): 2305-2312; doi: 10.1016/j.jece.2017.04.030
- Trabelsi L, Ben Ouada H, Zili F, Mazhoud N, Ammar J (2013) Evaluation of *Arthrospira platensis* extracellular polymeric substances production in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Folia Microbiol* 58(1): 39-45; doi: 10.1007/s12223-012-0170-1
- Venkata S, Rohit M, Chiranjeevi P, Chandra R, Navaneeth B (2015) Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresour Technol* 184: 169-178; doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.056
- Yu H, Jia S, Dai Y (2009) Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *J Appl Phycol* 21: 127-133; doi: 10.1007/s10811-008-9341-5

Recibido: 09-04-2018
Aceptado: 28-06-2018