



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS A PARTIR DO EFLUENTE DE LATICÍNIOS
TRATADO POR CIANOBACTÉRIA

Adriana G. da Silva Manetti

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Queiroz

RIO GRANDE, RS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS A PARTIR DO EFLUENTE DE
LATICÍNIOS TRATADO POR CIANOBACTÉRIA

Adriana Gonçalves da Silva Manetti

Engenheira de Alimentos

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do título de Doutor em
Engenharia e Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Queiroz

RIO GRANDE, RS

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, principalmente pela saúde e por iluminar meu caminho.

Com carinho especial agradeço a minha orientadora Professora Maria Isabel Queiroz pelos oito anos que tive oportunidade de estar sob orientação desta profissional exemplo, não somente como ensinadora, mas exemplo de pessoa. As palavras serão sempre poucas para agradecer a confiança, amizade, dedicação, ensinamentos, incentivo... espero ter sabido aproveitar. *“Professora és uma pessoa muito especial para mim, são os meus mais sinceros respeito e admiração”*.

Aos meus pais Iolanda e Dary, só vocês sabem o quanto sou agradecida pela vida que vocês me proporcionam. Agradeço a minha educação e acima de tudo o amor que vocês me dão incondicional, agradeço o incentivo a buscar constantemente o conhecimento. *“Minha mãe e pai, obrigada por investirem em mim e acreditarem no meu sonho ... saibam que cheguei aqui por vocês, amo vocês”*.

A minha afilhada Ana Carolina e minha irmã Tânia, por sempre estarem preocupadas comigo, acreditando em mim. Este trabalho também é por vocês.

Um eterno agradecimento ao meu esposo e acima de tudo companheiro Leonardo Manetti (‘maridocínio’) que sempre esteve ao meu lado e que muito se esforçou para compreender, com paciência e amor, as mais diversas formas do meu humor, nunca deixando de me apoiar e ajudar com seu carinho, dedicação e confiança. *“Muito obrigada por acreditar em uma vida melhor para nós. “TE AMO MUITO, não iria conseguir sem seu apoio, paciência e carinho”!*

Um especial agradecimento as minhas queridas amigas: Juliana Guerra, sempre disponível em ajudar, ajudar ... ajudar ... resolver, fazer ... *“muito obrigada por tudo amiga”*. Marina Mitterer-Dautoé, pela amizade, incentivo, conversas .. *“aprendi contigo Marina, que quando queremos algo devemos ser objetivas e focadas”*. Nivia Streit, uma pessoa maravilhosa que tive a oportunidade de conhecer e que agora vai fazer parte da minha vida, *“muito obrigada por ser minha amiga”*. Nádia Carbonera, uma “velha/nova” amiga que neste período me deu a oportunidade de conhece-la melhor, sempre me dando força e incentivo, *“brigadão amiga”*.

“Gurias, palavras são poucas para agradecer por tudo! Pelas conversas, confidencias, por eu poder fazer um pouco parte da vida de vocês. Obrigada por sugerirem melhorias, contribuindo muito para que esse trabalho chegasse ao resultado final. Obrigada pelas amizades, eternamente imprescindíveis. “Saibam que sem vocês este trabalho seiria mais difícil de se concluir, vocês foram fundamentais, aprendi muito com vocês ...”

As colegas e amigas Juliana Latorres e Fabiane Petry pelo convívio no laboratório, risadas, cafés ... durante o percurso deste trabalho, deixando este mais leve e cada dia de trabalho mais agradável.

Aos Professores do programa de pós-graduação pelos conhecimentos e aprendizado adquirido.

Ao coordenador do curso de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos Luiz Antônio de Almeida Pinto.

A secretária da pós-graduação Islanda, por estar sempre disponível e nos ajudando nos mais diversos esclarecimentos ao longo destes anos.

Ao Sr. Iradilso, funcionário da Biblioteca Campus Cidade, sempre com bom humor e disposto a nos ajudar na biblioteca.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Luiz Antônio de Almeida Pinto, Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burket e Profa. Dra. Loraine André Isoldi, pela disponibilidade, sugestões, esclarecimentos e comentários sempre oportunos. Em especial ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, pela atenção, gentileza e por acompanhar desde o mestrado minha caminhada profissional e também fazer deste acontecimento tão especial ficar mais descontraído e agradável com seu inteligente profissionalismo.

À Universidade Federal do Rio Grande pela formação profissional.

À Cooperativa Sul-Riograndense Laticínios Ltda-COSULATI, por estarem sempre dispostos a nos ajudar nas coletas de efluente.

À TANAC SA empresa que nos forneceu gentilmente amostras de Tanfloc SG.

Ao Governo Federal representado CNPq pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho e pelo financiamento do projeto.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, em especial a toda a minha família.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.”*

Francisco Cândido Xavier.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	v
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xii
NOMENCLATURA	xvii
NOMENCLATURA	xvii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
RESUMO GERAL	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	4
CAPÍTULO 2	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2 Efluente de Laticínios	7
3 Cianobactérias	10
4 <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	13
5 Cultivo heterotrófico	18
6 Carboidratos de cianobactÉrias	20
7 Reúso de águas residuárias	24
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 3	44
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	44
ARTIGO 1	45
EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO CELULAR EM CULTIVOS DE <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli VISANDO A PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS EXTRACELULARES	45
EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO CELULAR EM CULTIVOS DE <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, VISANDO A PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS EXTRACELULARES	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47

1	INTRODUÇÃO	48
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	Micro-organismo	49
2.1.1	Preparo do inóculo	49
2.2	Efluente	50
2.3	Planejamento experimental	50
2.4	Desenvolvimento dos experimentos	51
2.5	Análise dos dados cinéticos.....	52
2.6	Produção de carboidratos extracelulares	53
2.6.1	Extração de carboidratos extracelulares	53
2.6.1.1	Quantificação de carboidratos extracelulares	54
2.7	Análise Estatística	54
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1	Caracterização do efluente.....	54
3.2	Produção de carboidratos extracelulares	57
3.2.1	Avaliação da cinética de crescimento da <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	57
3.3	Comportamento da produção de carboidratos extracelulares.....	62
3.3.1	Efeitos e influência dos fatores temperatura e inóculo na produção de carboidratos extracelulares.....	67
4	CONCLUSÃO	71
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	ARTIGO 2	80
	INFLUÊNCIA DAS RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO E NITROGÊNIO/FÓSFORO NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS EXTRACELULARES POR <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	80
	INFLUÊNCIA DAS RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO E NITROGÊNIO/FÓSFORO NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS EXTRACELULARES POR <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	81
	RESUMO	81
	ABSTRACT	82
1	INTRODUÇÃO	83
2	MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1	Micro-organismo	84
2.2	Efluente	85

2.3	Planejamento experimental	86
2.4	Desenvolvimento dos experimentos	87
2.5	Produção de carboidratos extracelulares	89
2.6	Avaliação do consumo de substrato.....	89
2.7	Análise dos dados.....	90
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
3.1	Avaliação da cinética de crescimento da <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli para as diferentes condições experimentais.....	90
3.2	Avaliação do consumo de nutrientes nas condições experimentais	100
3.3	Efeitos das variáveis C/N e N/P na produção e produtividade de carboidratos extracelulares.	107
4	CONCLUSÃO	111
5	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	111
	ARTIGO 3.....	117
	SEPARAÇÃO DE BIOMASSA DO EFLUENTE DE LATICÍNIO E PERSPECTIVA DE REÚSO DA ÁGUA RESIDUÁRIA	117
	SEPARAÇÃO DE BIOMASSA DO EFLUENTE DE LATICINIO E PERSPECTIVA DE REÚSO DA ÁGUA RESIDUÁRIA	118
	RESUMO	118
2.1	Micro-organismos	121
2.2	Efluente	121
2.3	Planejamento experimental.....	122
2.4	Desenvolvimento dos experimentos	123
2.5	Avaliação do reúso da água residuária	124
2.6	Análise Estatística.....	125
3.1	Seleção do coagulante.....	125
3.2	Avaliação do reúso da água residuária resultante do tratamento biológico e químico	154
	ARTIGO 4.....	167
	BIOPROSPECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS POR <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli CULTIVADA NO EFLUENTE DE LATICÍNIOS	167
	BIOPROSPECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS POR <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli CULTIVADA NO EFLUENTE DE LATICÍNIOS	168
	RESUMO.....	168

ABSTRACT	169
2.1 Micro-organismo.....	171
2.2 Efluente	172
2.3 Desenvolvimento dos experimentos	172
2.4 Cinética de crescimento celular	173
2.5 Separação da biomassa	174
2.6 Determinação de carboidratos	175
2.7 Avaliação dos resultados.....	176
3.1 Comportamento do consumo de carboidratos, nitrogênio e DQO na produção de carboidratos extracelulares.....	176
3.2 Carboidratos totais, capsular e da parede celular da biomassa produzida por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli sob as condições de cultivo.....	183
CAPÍTULO 4	200
CONCLUSÃO GERAL	200
CONCLUSÃO GERAL	201
CAPÍTULO 5	202
REFERÊNCIAS	202
REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS	203

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1	45
EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO CELULAR EM CULTIVOS DE <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli VISANDO A PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS EXTRACELULARES	45
Tabela 1. Matriz do planejamento experimental.....	51
Tabela 2. Caracterização do efluente da indústria de laticínios.....	55
Tabela 3. Parâmetros cinéticos de crescimento.....	60
Tabela 4. Diferenças de médias pelo teste de Tukey entre os valores médios de carboidratos registrados nos experimentos 5, 8 e 9.....	65
Tabela 5. Produtividade de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli para os experimentos 5 (200 mg. L ⁻¹ 20°C), 8 (200 mg. L ⁻¹ 30°C) e experimento 9 (300 mg. L ⁻¹ 30°C) em função do tempo de cultivo.....	66
Tabela 6. Análise de variância para a resposta produção de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	70
ARTIGO 2	80
INFLUÊNCIA DAS RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO E NITROGÊNIO/FÓSFORO NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS EXTRACELULARES POR <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	80
Tabela 1. Características do efluente de laticínios	86
Tabela 2. Matriz do planejamento experimental	86
Tabela 3. Modelos de definição da fase logarítmica de crescimento celular de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	93
Tabela 4. Modelos de crescimento de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli de acordo com os experimentos.....	94
Tabela 5. Parâmetros cinéticos de crescimento.	97

Tabela 6. Médias e coeficientes de variação para os valores de produção de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	99
Tabela 7. Modelos de produção de carboidratos extracelulares nas condições dos experimentos	1
ao	9.
.....	105
Tabela 8. Valores de produção e produtividade em carboidratos extracelulares em função das fases de crescimento.	107
Tabela 9. Efeitos das variáveis C/N e N/P sob as respostas produção e produtividade de carboidratos extracelulares	109
Tabela 10. Modelos de regressão para as variáveis respostas	109
.....	109
Tabela 11. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados	110
.....	110
ARTIGO 3	117
SEPARAÇÃO DE BIOMASSA DO EFLUENTE DE LATICÍNIO E PERSPECTIVA DE REÚSO DA ÁGUA RESIDUÁRIA	117
Tabela 1. Características do efluente de laticínios utilizado nos experimentos	122
.....	122
Tabela 2. Matriz do planejamento experimental	123
.....	123
Tabela 3. Eficiência de remoção dos parâmetros avaliados utilizando o coagulante cloreto férrico	126
Tabela 4. Modelos de regressão para as variáveis respostas	130
.....	130
Tabela 5. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados para o coagulante cloreto férrico	131
Tabela 6. Eficiência de remoção dos parâmetros avaliados utilizando sulfato de alumínio	135
.....	135
Tabela 7. Modelos de regressão para as variáveis respostas	139
.....	139
Tabela 8. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados para o coagulante sulfato de alumínio.....	140
Tabela 9. Diferença de médias segundo Tukey para as eficiências de remoções avaliadas	144
.....	144

Tabela 10. Eficiência de remoção dos parâmetros avaliados utilizando tanino	145
Tabela 11. Modelos de regressão para as variáveis respostas	149
Tabela 12. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados, quando se utiliza o tanino como coagulante	150
Tabela 13. Comparação das concentrações obtidas para as diferentes etapas de tratamento propostos e os parâmetros para água de reúso em sistemas de refrigeração de acordo com EPA (1992) e Portaria 518 do Ministério da Saúde/2004 para potabilidade de água (BRASIL, 2004).	155
ARTIGO 4	167
BIOPROSPECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS POR <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli CULTIVADA NO EFLUENTE DE LATICÍNIOS	167
Tabela 1. Valores médios de fator de conversão dos substratos contidos no efluente em carboidratos extracelulares, por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, nas diferentes fases de crescimento.	179
Tabela 2. Estimativa da produção de carboidratos por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios	182
Tabela 3. Frações de carboidratos (capsulares, parede celular e carboidrato total) nas fases de crescimento celular de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	184
Tabela 4. Teste de Tukey para a avaliação das diferenças de média das quantidades de carboidratos da massa mucilaginosa em relação ao carboidrato total	186
Tabela 5. Teste de Tukey para a avaliação das diferenças de média das quantidades de carboidratos da parede celular em relação ao carboidrato total	187
Tabela 6. Identificação de carboidratos na cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios (A) e meio BG-11 (B)	190

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1	45
EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO CELULAR EM CULTIVOS DE <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli VISANDO A PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS EXTRACELULARES	45
Figura 1. Curvas de crescimento para culturas de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli a partir de 100 mg.L ⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.	58
Figura 2. Curvas de crescimento para culturas de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli a partir de 200 mg.L ⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.	58
Figura 3. Curvas de crescimento para culturas de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli a partir de 300 mg.L ⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.	58
Figura 4. Gráfico de Pareto para a resposta produtividade de biomassa de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, para nível de significância de 5%..	62
Figura 5. Comportamento da concentração de carboidratos extracelulares ao longo do tempo de cultivo a partir de 100 mg.L ⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.	63
Figura 6. Comportamento da concentração de carboidratos extracelulares ao longo do tempo de cultivo a partir de 200 mg.L ⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.	63
Figura 7. Comportamento da concentração de carboidratos extracelulares ao longo do tempo de cultivo a partir de 300 mg.L ⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.	63
Figura 8. Gráfico de Pareto para resposta produção de carboidratos extracelulares produzidos <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli, para o nível de significância de 5%.....	68
Figura 9. Gráfico dos valores preditos versus resíduos para a resposta produção de carboidratos extracelulares.	70
Figura 10. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta produção de carboidratos extracelulares.	71
Figura 11. Superfície de resposta para produção de carboidratos extracelulares produzidos por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	71
ARTIGO 2	80
INFLUÊNCIA DAS RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO E NITROGÊNIO/FÓSFORO NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS EXTRACELULARES POR <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	80

Figura 1. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 1 (C/N 20; N/P 5) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	92
Figura 2. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 2 (C/N 20; N/P 10) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	92
Figura 3. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 3 (C/N 20; N/P 15) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	92
Figura 4. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 4 (C/N 40; N/P 5) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	92
Figura 5. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 5 (C/N 40; N/P 10) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	93
Figura 6. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 6 (C/N 40; N/P 15) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	93
Figura 7. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 7 (C/N 60; N/P 5) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	93
Figura 8. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 8 (C/N 60; N/P 10) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	93
Figura 9. Curva de crescimento para <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 9 (C/N 60; N/P 15) (valores médios de 27 repetições, n = 27).	93
Figura 10. Concentração de biomassa para cada experimento na fase logarítmica (as médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância)...	96
Figura 11. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 1).....	10203
Figura 12. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 2).....	103

Figura 13. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 3).....	103
Figura 14. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 4).....	103
Figura 15. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 5).....	103
Figura 16. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 6).....	104
Figura 17. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 7).....	104
Figura 18. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 8).....	104
Figura 19. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por <i>Aphanothece</i> e produção de carboidratos extracelulares (experimento 9).....	104
Figura 20. Correlações entre a concentração celular e de carboidratos.....	105
Figura 21. Valores observados e preditos, segundo os modelos de produção de carboidratos extracelulares nas condições experimentais.	107
Figura 22. Superfícies de resposta para produção de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece</i>	112
Figura 23. Superfícies de resposta para produtividade de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece</i>	112
ARTIGO 3	117
SEPARAÇÃO DE BIOMASSA DO EFLUENTE DE LATICÍNIO E PERSPECTIVA DE REÚSO DA ÁGUA RESIDUÁRIA	117
Figura 1. Gráfico de Pareto para as respostas remoção dos parâmetros avaliados ($p \leq 5\%$).	129
30	
Figura 2. Linhas de contorno para eficiência de remoção de DQO utilizando $FeCl_3$	134
Figura 3. Linhas de contorno para eficiência de remoção de ST utilizando $FeCl_3$	134
Figura 4. Linhas de contorno para eficiência de remoção de SF utilizando $FeCl_3$	134
Figura 5. Gráfico de Pareto para as respostas remoção dos parâmetros avaliados ($p \leq 5\%$). ..	139
Figura 6. Linhas de contorno para eficiência de remoção de DQO utilizando $Al_2(SO_4)_3$	144
Figura 7. Linhas de contorno para eficiência de remoção de turbidez utilizando $Al_2(SO_4)_3$	144
.....	144
Figura 8. Linhas de contorno para eficiência de remoção de SS utilizando $Al_2(SO_4)_3$	144

Figura 9. Linhas de contorno para eficiência de remoção de ST utilizando $Al_2(SO_4)_3$.	144
Figura 10. Gráfico de Pareto para as respostas remoção dos parâmetros avaliados ($p \leq 5\%$).	149
Figura 11. Linhas de contorno para eficiência de remoção de DQO utilizando tanino.	154
Figura 12. Linhas de contorno para eficiência de remoção de turbidez utilizando tanino.	154
Figura 13. Linhas de contorno para eficiência de remoção de SS utilizando tanino.	154
Figura 14. Linhas de contorno para eficiência de remoção de SV utilizando tanino.	154
Figura 15. Diferença de médias das eficiências de remoção dos parâmetros avaliados, quando são utilizadas as condições 300 mg.L^{-1} e pH 7,0 para os coagulantes cloreto férrico, sulfato de alumínio e tanino.	1545
Figura 16. Eficiência de remoção dos parâmetros ST, SS, turbidez e DQO nos tratamentos propostos E_1 : eficiência no efluente tratado por <i>Aphanothece</i> ; E_2 : eficiência no efluente tratado por <i>Aphanothece</i> e Tanfloc; E_3 : eficiência no efluente tratado por Tanfloc e membrana e E_t : eficiência total do processo.	159
Figura 17. Eficiência de remoção dos parâmetros amônia, alcalinidade e fósforo nos tratamentos propostos E_1 : eficiência no efluente tratado por <i>Aphanothece</i> ; E_2 : eficiência no efluente tratado por <i>Aphanothece</i> e Tanfloc; E_3 : eficiência no efluente tratado por Tanfloc e membrana e E_t : eficiência total do processo.	159
Figura 18. Eficiência de remoção dos parâmetros sílica, dureza, sulfato e cálcio nos tratamentos propostos E_1 : eficiência no efluente tratado por <i>Aphanothece</i> ; E_2 : eficiência no efluente tratado por <i>Aphanothece</i> e Tanfloc; E_3 : eficiência no efluente tratado por Tanfloc e membrana e E_t : eficiência total do processo.	159
ARTIGO 4	167
BIOPROSPECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS POR <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli CULTIVADA NO EFLUENTE DE LATICÍNIO	167
Figura 1. Comportamento do consumo de carboidratos contidos no efluente da indústria de laticínios nas condições C/N 60, N/P 10, por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em função do tempo.	178
Figura 2. Comportamento da concentração de carboidratos extracelular produzidos por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli desenvolvida no efluente de laticínios nas condições C/N 60, N/P 10 em função do tempo.	178
Figura 3. Comportamento do consumo de DQO, N-NTK e $P-PO_4^{-3}$ contidos no efluente da indústria de laticínios nas condições C/N 60, N/P 10, por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em função do tempo.	178

Figura 4. Comportamento do crescimento celular de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli desenvolvida no efluente da indústria de laticínios nas condições C/N60, N/P10, em função do tempo.	178
Figura 5. Relação entre consumo de carboidratos totais no efluente e produção de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	179
Figura 6. Relação entre consumo de DQO no efluente e produção de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	179
Figura 7. Relação entre consumo de $P-PO_4^{-3}$ no efluente e produção de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	180
Figura 8. Relação entre consumo de N-NTK no efluente e produção de carboidratos extracelulares por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	180
Figura 9. Porcentagem das frações de carboidratos em relação ao carboidrato total (33,5 %) nas fases de crescimento de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	186
Figura 10. Concentração dos carboidratos encontrados em relação aos totais (33,5 %).	192

NOMENCLATURA

APHA: American Public Health Association

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$: sulfato de alumínio

ANOVA: análise de variância

AVT: ácidos voláteis totais (mg.L^{-1})

BG-11: Brau-Grunow Medium

Carb. Totais: carboidratos totais

C/N: razão entre carbono e nitrogênio

CV: coeficiente de variação

DQO: demanda química de oxigênio (mg.L^{-1})

EPA: Environmental Protection Agency Report

E: eficiência de remoção (%)

E_t : eficiência de remoção total

E_1 : eficiência de remoção após tratamento por *Aphanothece microscopica* Nägeli

E_2 : eficiência de remoção do efluente tratado por *Aphanothece* e coagulante

E_3 : eficiência de remoção do efluente tratado por coagulante e membrana de microfiltração

EA: efluente tratado com *Aphanothece microscopica* Nägeli

ETEq: efluente tanque de equalização

EAC: efluente tratado com a *Aphanothece* e coagulante

EMF: efluente após membrana de microfiltração

F: fonte de variação para 95 % de confiança

F_{calc} : F calculado

F_{Tab} : F tabelado

FeCl_3 : cloreto férrico

GL: graus de liberdade

MQ: média quadrática

N/P: razão entre nitrogênio e fósforo

N-NH_3^+ : nitrogênio amoniacal (mg.L^{-1})

N-NTK: nitrogênio Total Kjeldahl (mg.L^{-1})

ND: não detectado

N.R.: não faz referência

Obs: valor observado

P-PO₄⁻³: fósforo como fosfato (mg.L⁻¹)

p: probabilidade de diferença entre médias

P_x: produtividade (mg.L⁻¹h⁻¹)

pH: potencial hidrogeniônico

Pred: valor predito

P_X: produtividade de biomassa (mg.L⁻¹h⁻¹)

P_{fases de crescimento}: produtividade de carboidratos extracelulares nas fases de crescimento (mg.L⁻¹h⁻¹)

P_t: produção total de carboidratos extracelulares (mg.L⁻¹)

r: coeficiente de correlação

R²: coeficiente de determinação

SF: sólidos fixos (mg.L⁻¹)

SQ: soma dos quadrados

SS: sólidos suspensos (mg.L⁻¹)

ST: sólidos totais (mg.L⁻¹)

SV: sólidos voláteis (mg.L⁻¹)

tg: tempo de geração (h)

T: temperatura (°C)

UNT: unidade Nefelométrica

VVM: volume de ar por volume de meio por minuto (m³ m⁻³ min⁻¹)

Y_{X/S}: fator de conversão de substrato em célula ou carboidrato extracelular (mg biomassa/mg S)

X: concentração celular final (mg.L⁻¹)

X₀: concentração celular inicial (mg.L⁻¹)

X_{máx}: concentração celular máxima (mg.L⁻¹)

β: coeficiente de regressão linear múltipla

λ: comprimento de onda (nm)

α : nível de significância estatística

μ_{\max} : máxima velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

ΔX : variação da concentração final e inicial (mg.L^{-1})

Δt : variação entre o tempo final e inicial (h)

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO GERAL

Nesta tese foi demonstrado o potencial de produção de carboidratos por *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente oriundo de uma indústria de laticínios. Para tanto, o trabalho é composto de quatro artigos que objetivaram avaliar a produção de carboidratos em função da temperatura, inóculo e razões C/N e N/P do efluente, bem como a possibilidade de reúso da água residuária. Foram utilizadas temperaturas de (10, 20 e 30°C) e inóculo (100, 200 e 300 mg.L⁻¹). A melhor condição indicada foi quando utilizou-se a temperatura de 30°C e 200 mg.L⁻¹ de inóculo. Na sequência, considerando a temperatura e a concentração celular selecionada, foi estudada a influência das razões C/N e N/P na produção de carboidratos. Para tal, C/N (20, 40 e 60) e N/P (5, 10 e 15) na produção de carboidratos extracelulares foram avaliadas em cultivos a 30°C, tendo como inóculo 200 mg.L⁻¹. Os melhores resultados obtidos, foram quando foi utilizado C/N 60 e N/P 10. Uma vez definidas as melhores condições de produção de carboidratos, foi estudado o processo de separação de biomassa do meio de cultivo, a partir dos coagulantes FeCl₃, Al₂(SO₄)₃ e tanino. O efeito dos coagulantes na separação da biomassa foram estudados, quanto ao pH (6,0, 7,0 e 8,0) e concentração de coagulantes (50, 300 e 550 mg.L⁻¹), utilizando como parâmetro de medida, a eficiência de remoção de DQO, turbidez e sólidos suspensos (SS). Os resultados demonstraram que as concentrações de coagulantes influenciaram significativamente ao nível de significância de 5 %, na separação da biomassa, com eficiência significativa na remoção da DQO, turbidez e SS. A melhor condição avaliada foi a que utilizou tanino na concentração de 300 mg.L⁻¹ e pH 7,0, o que resultou em uma água residuária com remoção média de 96 % da turbidez, com potencial de ser reutilizada. Por fim, foi realizada a identificação de carboidratos gerados por *Aphanothece microscopica* Nägeli. Os resultados evidenciaram uma biomassa com até 33,5 % de carboidratos totais, perfazendo uma fração de carboidratos extracelulares, na fase estacionária de crescimento celular, de aproximadamente 25 % e 8 % os carboidratos da parede celular. Ficou demonstrado ainda que a composição dos carboidratos extracelulares do micro-organismo em estudo é constituído por mono e dissacarídeos perfazendo concentrações na ordem de 12,88 % de glicose, 3,54 % de rafinose, 3,43 % sacarose, 2,13 % de frutose e 2,45 % de ribose. Ficou demonstrado o potencial de produção de carboidratos por *Aphanothece microscopica* Nägeli quando cultivada no efluente da indústria de laticínios.

Palavras-chave: Água residuária; *Aphanothece*; Biomassa; Carboidratos extracelulares; Condições de cultivo; Cultivos heterotróficos.

ABSTRACT

In this thesis, the production potential of carbohydrates by *Aphanothece microscopica* Nägeli cultured in the effluent coming from a dairy industry is demonstrated. Thus this work consists of four articles that focused on evaluating the production of carbohydrates as a function of temperature, inoculum concentration and C/N and N/P ratios, and the possibility of reuse of wastewater. Temperatures used were (10°C, 20°C and 30°C) and inoculum concentration of (100, 200 and 300 mg.L⁻¹). The best condition indicated is when a temperature of 30°C and 200 mg.L⁻¹ inoculum was used. In sequence, considering the temperature and cell concentration selected, the influence of C/N and N/P ratios in the production of carbohydrates was studied. For this purpose C/N (20, 40 and 60) and N/P (5, 10 and 15) in the production of extracellular carbohydrates were evaluated in cultures at 30°C, with the inoculum 200 mg.L⁻¹. The best results were obtained when C/N 60 and N/P 10 were used. Once the best conditions for production of carbohydrates was defined, the process of separation of biomass from the medium, from the coagulants FeCl₃, Al₂(SO₄)₃ and tannin was studied. The effect of anticoagulants on the separation of the biomass was studied, for pH and coagulants concentration, using as a measurement parameter the efficiency of COD removal, turbidity and suspended solids (SS). The results showed that the coagulant concentration significantly influences, at a significance level of 5 %, the separation of biomass, with significant efficiency in the removal of COD, turbidity and SS. The best condition evaluated used tannin 300 mg.L⁻¹ pH 7.0, resulting in a wastewater with an average of 96 % removal of turbidity, with the potential to be reused. Finally, the identification of carbohydrates generated by *Aphanothece microscopica* Nägeli was performed. The results showed a biomass with up to 33.5 % carbohydrates, comprising a carbohydrate fraction of the extracellular mucilaginous capsule in stationary phase of cell growth of approximately 25 %, 8 % in the cell wall and total carbohydrates of 33.5 %. It was further demonstrated that the carbohydrate composition of the extracellular micro-organism under study consists of mono- and disaccharides in the range of concentrations amounting to 12.88 % glucose, 3.54 % raffinose, 3.43 % sucrose, 2.13 % fructose and 2.45 % ribose. The production potential of carbohydrates by *Aphanothece microscopica* Nägeli was demonstrated when cultured in the effluent from the dairy industry.

Keywords: *Aphanothece*; Biomass; Extracellular carbohydrates; Culture conditions; Heterotrophic cultures; Wastewater.

1 INTRODUÇÃO

A produção desordenada de águas residuárias, vinculada ao aumento da população de forma progressiva, tem despertado o desenvolvimento de pesquisas em busca de tecnologias alternativas para purificação de efluentes hídricos. Tecnologias estas que visem aproveitar não somente a água residuária, bem como os nutrientes nela existentes por incorporação a uma biomassa com o potencial de ser utilizada como alimento ou de outras aplicações comerciais (VOLTOLINA et al., 1998; BURJA et al., 2001; BASHAN et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004; MOHAN, RAO & PRASAD, 2005; QUEIROZ & HORNES et al., 2005; QUEIROZ et al., 2006a,b; QUEIROZ et al., 2007a,b).

No Brasil, os setores de indústrias de carne e laticínios são responsáveis por uma boa parte da economia do país, sendo assim, responsáveis por grande consumo de água para o processamento de seus produtos e limpeza de seus equipamentos. Em 2005, foram produzidos cerca de 24 bilhões de litros de leite gerando aproximadamente 84×10^9 L de efluentes, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2007). À medida que a água é utilizada nos processos industriais, vai incorporando várias substâncias, fazendo com que suas características sejam alteradas de modo a torná-la um efluente. Estes efluentes são caracterizados por alto conteúdo de matéria orgânica, constituída por compostos facilmente biodegradáveis, como carboidratos, proteínas e lipídios (GUERRERO et al., 1999; BARAERDINO et al., 2000; MIERZWA, 2004; MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011).

O emprego de cianobactérias como tratamento de efluentes associado ao reúso de água é uma alternativa viável frente aos tratamentos convencionais. Com a vantagem da geração de uma biomassa, da qual podem ser extraídos importantes compostos de interesse comercial, como proteínas, ácidos graxos, pigmentos e carboidratos (QUEIROZ et al., 2007a,b). Independente da biomassa gerada, pesquisas têm sido desenvolvida no sentido de aproveitamento de produtos celulares produzidos por estes micro-organismos, como carboidratos (HU et al., 2003).

O uso de biopolímeros produzidos por cianobactérias e/ou microalgas representa uma alternativa interessante e podem ser usados em indústrias de alimentos, têxteis, tintas, cosméticos, papel e farmacêutica, como estabilizadores, espessantes ou

emulsificantes (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998; MORENO et al., 1998; MORENO et al., 2000; OTERO & VINCENZINI, 2003). Nos últimos anos, mais atenção tem sido dada à produção de carboidratos por cianobactérias para utilização industrial. Todavia, existe ainda uma grande deficiência no que diz respeito ao conhecimento acerca desses compostos produzidos por cianobactérias, os estudos ainda são escassos e deixam lacunas a serem preenchidas. Desse modo, faz-se necessário estudos que enfatizem os fatores que estimulam a produção destes carboidratos, no sentido de se obter meios e condições de cultivo otimizadas para a produção destes compostos.

Neste intuito, o estudo e a aplicação de sistemas biológicos no tratamento de efluentes, seguido de reutilização de águas residuárias, geração de biomassa e produção de carboidratos torna-se interessante como solução para a escassez de água, alimentos e geração de insumos.

Em face disto, o trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de produção de carboidratos por *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio, bem como avaliar a possibilidade de reúso desta água residuária.

CAPÍTULO 2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 EFLUENTE DE LATICÍNIOS

O setor de laticínios constitui uma parcela importante da indústria alimentícia, e sua contribuição material em termos de poluição de águas receptoras é significativa, portanto, torna-se necessário e obrigatório o tratamento prévio de seus despejos líquidos antes do lançamento para disposição final em curso d'água. As técnicas de tratamento para este efluente geralmente estão associadas aos processos tradicionais que combinam tratamento físico (ou físico-químico) com tratamento biológico. Entretanto, a moderada eficiência destes para remoção de compostos eutrofizantes, bem como as desvantagens específicas de cada tratamento biológico, levam à busca de sistemas que atendam às necessidades crescentes referentes à qualidade do efluente tratado (SARKAR et al., 2006; VOURCH et al., 2008)

A aplicação de técnicas para o tratamento de efluentes tem sido valorizada no sentido de recuperação de compostos descartados nos corpos receptores para um possível reúso desses compostos, ocorrendo cada vez mais um maior número de pesquisas com vistas nesse objetivo (SARKAR et al., 2006; VOURCH et al., 2008; SILVA-MANETTI et al., 2011).

Nas indústrias de laticínios, operações como a lavagem de silos, tubulações, tanques, pasteurizadores e equipamentos, demandam grandes quantidades de água, descarregando conseqüentemente grandes volumes de efluentes, podendo resultar para cada litro de leite processado a geração de até onze litros de efluente (BRIÃO, 2000; MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011).

Esses efluentes são constituídos por leite e seus subprodutos, detergentes, desinfetantes, areia, lubrificantes, açúcar, pedaços de frutas (em caso da produção de iogurte), essências e condimentos diversos (no caso da produção de queijos e manteiga) que são diluídos nas águas de lavagem de equipamentos, tubulações, pisos e demais instalações da indústria (MACHADO et al., 2002). Considerando a natureza das águas residuárias originadas nas indústrias de laticínios, os efluentes líquidos gerados nos setores de produção são considerados os principais responsáveis pela poluição causada pela indústria de laticínios. A qualidade dos efluentes de laticínios varia em função dos produtos industrializados, capacidade de produção, layout industrial, técnicas de higienização das instalações e qualidade do leite utilizado, resultando, um efluente rico

em amônia, sais minerais, fósforo e altos níveis de sólidos suspensos, tais como lactose, gordura e proteína (MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011).

A variedade de produtos dessas indústrias é grande, abrangendo desde o processamento do leite ou queijo até uma complexa flexibilidade de multiprodutos, tais como: requeijão, cremes, sorvetes, iogurtes, leite em pó, leite condensado, entre outros. Neste contexto, é de salientar o soro de leite, proveniente da fabricação de queijo, o qual apresenta elevado poder poluente devido à presença de proteínas, gordura, lactose e sais minerais, resultando em uma demanda biológica de oxigênio de 30.000 a 50.000 mg.L⁻¹ por litro de soro (SARKAR et al., 2005; FRAPPART et al., 2006; FARIZOGLU & UZUNER, 2011; MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011) de 60.000 a 100.000 mg.L⁻¹ de demanda química de oxigênio (MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011). Estes constituintes podem ser eficientemente reciclados a partir de cianobactérias, uma vez que, o tratamento de águas residuárias é normalmente um procedimento que apresenta custos envolvendo a remediação e a disposição da biomassa gerada. Novos processos de remoção de nutrientes e matéria orgânica vêm sendo estudados de modo a combinar estratégias de despoluição e obtenção de produtos biotecnológicos com maior valor agregado (QUEIROZ et al., 2001; SILVA, et al., 2009; GUERRA-VIEIRA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2011).

O tratamento de efluentes mediante o uso de microalgas em geral e cianobactérias é um processo que apresenta várias vantagens dentre elas: tratar efluentes e gerar produtos celulares de interesse sendo uma alternativa viável que está sendo explorada (TAM & WRONG, 2000; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006a;b; QUEIROZ et al., 2007, 2007a,b,c; ZEPKA et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2011).

A função de um processo de tratamento biológico é remover a matéria orgânica do efluente industrial, através do metabolismo de oxidação e de síntese de células. Este tipo de tratamento é normalmente usado em virtude da grande quantidade de matéria orgânica facilmente biodegradável, presente em sua composição (JANCZUKOWICZ et al., 2007; BANU et al., 2008; VOURCH et al., 2008; KUSHWAHA et al., 2010). Assim na maioria dos casos, efluente lácteos são tratados por métodos biológicos convencionais como lagoas de estabilização, reatores anaeróbios e sistemas de lodos ativados, nos quais o principal intuito é a remoção de matéria orgânica sem a valorização da biomassa gerada (XU et al., 2006; ARVANITOYANNIS & KASSAVETI, 2008; BANU et al., 2008). Dentro destes processos biológicos, a

utilização de microalgas/cianobactérias tem sido proposta para remover nutrientes inorgânicos de águas residuárias por incorporação à biomassa. Em alguns casos, é possível converter a biomassa cultivada em subproduto útil (LODI et al., 2003; LIANG, et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2010; XIN et al., 2010; GRADY & MORGAN, 2011).

Blier et al. (1996) cultivando *Phormidium bohneri* em efluente de laticínio tratado por digestão anaeróbica, obtiveram taxa de crescimento de $0,62 \text{ L.d}^{-1}$, resultando em concentração de biomassa de 329 mg.L^{-1} . Quanto às eficiências de remoção de nutrientes registraram completa remoção de amônia e 69 % de fósforo em 4 dias de cultivo com uma taxa de remoção de amônia de $5,9 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e de $2,9 \text{ mg de P-PO}_4^{-3}.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ respectivamente. Estes mesmos autores (BLIER et al., 1996), trabalharam com diluições do efluente, contendo 30, 40 e 50 $\text{mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$, verificando que a maior taxa de crescimento e concentração de biomassa foi registrada quando utilizaram 30 $\text{mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$. Foi registrado após 16 dias de cultivo, uma taxa de crescimento de $0,58 \text{ L.d}^{-1}$ e uma concentração de biomassa de 565 mg.L^{-1} .

Wang et al. (2005) afirmam que águas residuárias e efluentes secundários constituem fontes de nitrogênio de baixo custo para o cultivo de microalgas, uma vez que contêm grandes quantidades de diferentes formas deste nutriente. O tratamento convencional de águas residuárias de laticínios envolve processos aeróbios, uma vez que as gorduras, lactose e as proteínas são facilmente degradadas por populações bacterianas (LINCOLN et al., 1996; ARVANITTOYANNIS & KASSAVETI, 2008; KUSHWAHA et al., 2010). Lincoln et al. (1996) utilizaram o efluente de laticínios como meio de cultivo para a cianobactéria *Arthrospira platensis*. Reportaram capacidade de remoção em sete dias de nitrogênio amoniacal de 100 mg.L^{-1} para 1 mg.L^{-1} e remoção de fósforo total de 41 % ($22,9 \text{ mg.L}^{-1}$ para $13,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Em alguns casos, é possível aproveitar a biomassa cultivada em subproduto útil (LODI et al., 2003; XIN et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Para Aslan e Kapdan (2006) as vantagens de se utilizar microalgas/cianobactérias na remoção de fósforo e nitrogênio incluem o baixo custo de operação e a possibilidade de aproveitamento dos nutrientes assimilados na biomassa das algas, evitando o problema de tratamento do lodo e descarga dos efluentes em corpos d'água.

3 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são procariontes amplamente distribuídos nos oceanos, águas continentais e ambientes terrestres (DE PHILIPPIS & VICENZINI, 1998). São constituídos de células típicas de bactérias Gram – negativas, no entanto capazes de executarem a fotossíntese (STAINER & COHEN-BAZIRE, 1978; BERTOCHI, 1990; MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011). De acordo com Stainer & Bazire (1978), estas peculiaridades (estrutura Gram–negativa e capacidade fotossintética, causa controvérsia entre microbiologistas e botânicos, o que faz com que em muitos trabalhos estes micro – organismos sejam chamados de cianobactérias e em outros algas azuis. A literatura expressa o termo microalga englobando uma série de micro-organismos de natureza distinta, incluindo tanto organismos eucarióticos (algas verdes, vermelhas, diatomáceas e dinoflagelados) quanto procarióticos, as cianobactérias (MADIGAN et al., 2004; TOMASELLI, 2004). Apesar da ocorrência estimada de mais de 50.000 espécies de microalgas no mundo, apenas cerca de 30.000 já foram reconhecidas e analisadas (RICHMOND, 2004). As cianobactérias são importantes componentes do fitoplâncton tanto em águas doces quanto marinhas, podendo ocasionalmente formar florações em corpos d'água eutrofizados. Além disso, estão presentes na maioria dos solos e em associações simbióticas com diatomáceas, samambaias, líquens e esponjas. Apresentam clorofila *a* como pigmento principal, além de β -caroteno e pigmentos acessórios conhecidos como ficobilinas, que podem ser azuis ou vermelhos. Os pigmentos acessórios encontram-se em estruturas conhecidas como ficobilissomas, as quais se localizam na superfície externa dos tilacóides. Os tilacóides se encontram livres no citoplasma e não são organizados em pilhas. A parede celular é composta por peptidoglicano e a reprodução estritamente assexuada, ocorre por divisão celular simples. (FOGG, 1977; SCHMETTERER, 1994; RAVEN et al., 1992; BARSANTI; GUALTIERI, 2006; JACOB-LOPES et al., 2008a,b; MAGER & THOMAS, 2011).

Associada a capacidade fotossintética, algumas linhagens de cianobactérias possuem a faculdade de fixar nitrogênio atmosférico, conferindo a estes organismos as necessidades nutricionais mais simples de todos os seres conhecidos (OGBONNA & TANAKA, 2000; OLGUÍN et al., 2001; OLAIZOLA, 2003; RANGEL-YAGUI et al., 2004; THAJUDDIN & SUBRAMANIAN, 2005; DAVID et al., 2007; SCHENK et al., 2008). Segundo Burja et al. (2001), recentemente foram publicados dados que mostram em torno de 150 gêneros e mais de 4.000 espécies de cianobactérias de água doce e

salgada. Elas têm sido identificadas como um dos grupos mais promissores de micro-organismos dos quais se tem isolado recentemente produtos naturais bioquimicamente ativos. Apresentam inúmeras vantagens como fonte alternativa de proteína (GUERRERO et al., 1999; BERARDINO et al., 2000; MORIS et al., 2001; JANCZUKOWICZ et al., 2007; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HARUN et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011; ABDEL-RAOUF et al., 2012). São capazes de utilizar tanto carbono inorgânico como orgânico e apresentam tempo de geração curto. São produzidas de forma contínua, ocupam áreas pequenas de cultivo, podem ser passíveis de manipulação genética visando a obtenção da composição nutricional desejada e geração de produtos celulares comerciais sendo sujeitas às variações ambientais (DE PHILIPPIS & VICENZINE, 1991; DE PHILIPPIS & VICENZINE, 1998; ANUPAMA E RAVINDRA, 2000; PULZ & GROSS, 2004; DERNER et al., 2006; SPOLAORE et al., 2006; HARUN et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

As cianobactérias são particularmente atrativas como fonte de substâncias químicas de alto valor comercial, tais como ácidos graxos poli-insaturados, moléculas bioativas, ficobiliproteínas e polissacarídeos (MORENO et al., 1998; OLVERA-RAMIREZ et al., 2000; MORENO et al., 2003; TORRE et al., 2003; RANGEL-VAGUI et al., 2004; TANG et al., 2007; MISHARA et al., 2009; ZEPKA et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011;). As cianobactérias assim como outros micro-organismos respondem a modificações do ambiente em que vivem com adaptações fisiológicas geneticamente programadas. Ultimamente tem surgido interesse em relação às propriedades farmacológicas de substâncias presentes na biomassa, como o ácido γ -linolênico e polissacarídeos (MORI et al., 2003; DOUMIT & PINOTTI et al., 2004; KAWAI et al., 2006; ZEPKA et al., 2010; HARUN et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011; ABDEL-RAOUF et al., 2012). Esses micro-organismos são destacados ainda em outras áreas, como produção de ração animal, biofertilizantes, produtos químicos simples e complexos, assim como no tratamento de efluentes domésticos e industriais (BECKER & BADDILEY, 1994; WEISSMAN et al., 1998; KREITLOW et al., 1999; MARTINEZ et al., 2000; BABU et al., 2001; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2007; SILVA-MANETTI et al., 2009; MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011; PITTMAN et al., 2011; DEVI et al., 2012; GUERRA-VIEIRA et al., 2012).

As cianobactérias têm se mostrado agentes potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias, uma vez que possuem a habilidade de remover matéria orgânica e nutrientes dos efluentes incorporando-os à biomassa (BASTOS et al., 2004, QUEIROZ et al., 2007; DE-BASHAN & BASHAN, 2010; ABDEL-RAOUF et al., 2012). O uso de cianobactéria no biotratamento de águas residuárias é uma alternativa técnico-científica potencial em relação aos sistemas convencionais de tratamento secundário e terciário de efluentes. Esses processos são baseados nas rotas metabólicas respiratórias, que algumas espécies de cianobactérias apresentam, no qual fontes exógenas de carbono orgânico e nutrientes inorgânicos são bioconvertidos em produtos do metabolismo heterotrófico, particularmente em uma biomassa com elevados teores de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos (ZEPKA et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011a; ABDEL-RAOUF et al., 2012).

O projeto, construção e operação de sistemas de tratamento de efluentes utilizando cianobactérias são influenciados por diversos fatores, como a necessidade de sistemas de agitação para manter a eficiência do tratamento e a dificuldade de separar a biomassa do efluente tratado de forma eficiente e econômica em ordem de completar o processo. A mistura completa do meio contendo os micro-organismos garante condições homogêneas de modo a evitar sedimentação das células e aumentar a eficiência da utilização de luz na cultura, além de prevenir a estratificação térmica e a ocorrência de gradientes de pH e nutrientes, supersaturação de oxigênio e o esgotamento do dióxido de carbono na superfície do reator e condições anaeróbias na parte inferior (CRAGGS et al., 1997; MARTINEZ et al., 2000). Estudos iniciados na década de 60, referem-se à utilização de microalgas como agentes importantes na mitigação de problemas ambientais. Neste contexto existem trabalhos relativos ao sequestro de carbono por cianobactérias (JACOB-LOPES et al., 2008a,b) e ao tratamento de águas residuárias.

Em virtude das características dessa biomassa, processos baseados em cianobactérias tem sido considerados nos últimos anos potenciais tecnologias para converter resíduos industriais em insumos passíveis de serem utilizados, seja na fertilização dos solos, na forma de proteínas unicelulares ou na obtenção de biocombustíveis (JACOB-LOPES, et al., 2010). Em termos de biorreatores, as principais configurações empregadas em sistemas de cultivo heterotrófico incluem os tanques agitados mecanicamente, *air-lifts* e os reatores de coluna de bolhas (PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

Um dos maiores problemas na utilização de microalgas para a remoção de nutrientes é a sua recuperação do efluente tratado. As cianobactérias possuem um diâmetro pequeno ($\leq 20 \mu\text{m}$). Esta característica, junto com o fato que a maioria das espécies possui a densidade específica ligeiramente maior do que a água, torna a sua separação difícil e onerosa (LALIBERTÉ et al., 1997; TAM & WONG, 2000; MORENO-GARRIDO, 2008; CASTAING et al., 2010; CHISTENSON & SIMS, 2011). Além disso, muitas têm uma carga elétrica fortemente negativa na superfície, o que as mantém dispersas. Uma maneira de resolver isto é o uso de coagulantes/floculantes, podendo ser separados por sedimentação ou floculação, ou então a utilização de tecnologia de imobilização, na qual os micro-organismos são fixados em uma matriz, o que impede o arraste da biomassa nos bioreatores e facilita a separação (CRAGGS et al., 1997; BASHAN et al., 2002; TAM & WONG, 2000; KUSHWAHA et al., 2010; KIM et al., 2011; CHISTENSON E SIMS, 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011a; ABDEL-RAOUF et al., 2012).

4 *Aphanothece microscopica* Nägeli

Aphanothece microscopica Nägeli é uma cianobactéria caracterizada por apresentar células cilíndricas, formar colônias macroscópicas amorfas, com mucilagem abundante, firme e rígida. A coloração é verde azulada escura, células adultas elípticas cilíndricas, conteúdo celular finamente granuloso, medindo $9,0 - 9,5 \mu\text{m} \times 4,2 \mu\text{m}$, cerca de 2,1 vezes mais comprida que larga, dividindo-se por fissão binária (HALPERIN et al., 1974). É taxonomicamente classificada na divisão Cyanophyta, classe Cyanophyceae, ordem Chroococales, família Synechococaceae e subfamília Aphanothecoideae (ANAGNOSITIDIS & KOMARE, 1988; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Araújo & Garcia (2005) reportam que florações de *Aphanothece* indicam poluição orgânica, estando a biomassa desenvolvida relacionada com a disponibilidade de nutrientes desenvolvendo-se em concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrogênio total e fosfato em níveis superiores as referidas como normais para estuários não poluídos.

A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli ocorre em altas concentrações no estuário da Lagoa dos Patos, com florações constantes durante todo o ano. A Universidade Federal do Rio Grande, mais especificamente, no Laboratório de

Biotecnologia vêm desenvolvendo inúmeras pesquisas no que se refere ao tratamento de efluentes agroindustriais associado a produção de proteína unicelular, reúso de água e obtenção de produtos celulares com importantes resultados (QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002; HORNES & QUEIROZ, 2004; QUEIROZ et al., 2004; SILVA et al. 2005; QUEIROZ et al., 2005; QUEIROZ et al., 2006a;b; QUEIROZ et al., 2007; BASTOS et al., 2010; JACOB-LOPES et al., 2010; SILVA et al., 2009; QUEIROZ et al., 2011; SILVA-MANETTI et al., 2011; GUERRA-VIEIRA et al., 2012).

Uma série de trabalhos têm demonstrado a eficiência de remoção de nutrientes por esta cianobactéria em diferentes condições de cultivo. Neste sentido foi avaliado o potencial de remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz, máximos de remoção em 24 h de cultivo a 3000 lux de luminosidade e 30°C (QUEIROZ et al., 2004).

Experimentos em condições fotossintéticas, utilizando como meio de cultivo outros efluentes, como o do processamento de milho, pêsego e figo foram desenvolvidos por Silva et al., 2005. Neste trabalho foram registradas eficiências de remoção de 42,1 % de DQO e 58,5 % de NTK, 53,7 % para DQO e de 73,2 % de NTK, para o efluente de pêsego e figo, respectivamente. Por outro lado segundo Queiroz et al. (2002) esta cianobactéria é capaz de desenvolver-se no escuro a partir da matéria orgânica presente neste efluente. Estes autores avaliaram a remoção de nutrientes do efluente da parboilização do arroz por estes micro-organismos na ausência de luz, registrando remoções de 97,67 % de matéria orgânica e 90,37 % de nitrogênio em tempo de detenção celular de 15 h, inóculo de 300 mg.L⁻¹ e temperatura de 25°C. Mais recentemente, *Aphanothece* foi cultivada em fotobiorreatores visando o sequestro de carbono (JACOB-LOPES et al., 2008a,b; JACOB-LOPES et al., 2010; LACERDA et al., 2011) e avaliada quanto ao conteúdo de lipídios e perfil de ácidos graxos da biomassa visando a produção de biodiesel (FRANCISCO et al., 2010).

A avaliação da eficiência de remoção de nutrientes por esta cianobactéria em condições heterotróficas tem sido enfatizada também quanto à remoção de fósforo, com importantes resultados (QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010; GUERRA-VIEIRA et al., 2012).

Guerra-Vieira et al. (2012), demonstraram a habilidade da *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada heterotroficamente em assimilar, não só formas simples de fósforo, como também frações complexas como fósforo hidrolisável em meio ácido e

fósforo orgânico, com taxas de remoção similares ou superiores ao registrado para fósforo reativo.

Condições de cultivo como a influência da razão C/N, temperatura e tempo de detenção celular, na remoção de nitrogênio, matéria orgânica e produção de proteína unicelular por *Aphanothece* desenvolvida no efluente da parboilização do arroz foram avaliadas por Queiroz et al. (2007). Os resultados indicaram, que a temperatura e razão C/N influenciaram significativamente, com destaque para a razão C/N, no que se refere a remoção de DQO e diferença significativa quanto a produção de proteína unicelular.

A cinética de crescimento deste micro-organismo tem sido estudada em diferentes trabalhos, mais recentemente nos reportados por Hornes et al. (2010); Queiroz et al. (2011) e por Bastos et al. (2011). No primeiro artigo supracitado, foi estudada a influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína em função da curva de crescimento em meio BG-11 no efluente da indústria da pesca. Os resultados demonstraram que o NTK presente na biomassa independente do meio de cultura, reduz da fase logarítmica para a fase estacionária. No segundo, a produção de lipídeos, bem como a cinética de crescimento em função da temperatura foram avaliadas. Os dados cinéticos foram estudados segundo os modelos de Gompertz, Logístico, Baranyi e Gompertz modificado. O modelo logístico foi considerado mais adequado para descrever o crescimento heterotrófico, utilizando como meio de cultivo o efluente da indústria da pesca. Foram registradas produtividades de lipídeos na ordem de 0,04g.dia⁻¹, 0,05 g.d⁻¹ e 0,03 g.dia⁻¹, a 10°C, 20°C e 30°C respectivamente (QUEIROZ et al., 2011). No trabalho de Bastos et al. (2011), o crescimento heterotrófico desta cianobactéria em meio contendo glicose, lactose e sacarose foi estudado demonstrando que o comportamento é dependente da fonte de carbono utilizada, sugerindo diferentes mecanismos de incorporação e consumo destes carboidratos. Em trabalhos anteriores (HORNES & QUEIROZ, 2005; QUEIROZ et al., 2006; QUEIROZ et al. 2007; ZEPKA et al. 2008), têm sido enfaticamente registrado o rápido crescimento deste micro-organismo em efluentes agroindustriais demonstrando a capacidade de remover heterotroficamente os nutrientes das águas residuárias, caracterizando sua curva de crescimento pela ausência da fase lag.

Nessa linha de pesquisa de cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli uma série de trabalhos tem sido disponibilizados ao meio científico com informações inerentes a qualidade nutricional da biomassa gerada, em efluentes industriais (QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al, 2004; JACOB-LOPES et al., 2006;

JACOB–LOPEZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; BASTOS et al., 2009). O potencial de produção de proteína unicelular por este micro-organismo é expresso em uma gama de trabalhos (QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2003; JACOB-LOPES et al., 2006; JACOB-LOPES et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010; ZEPKA, et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011). Maiores concentrações têm sido registradas quando se utiliza o efluente da parboilização do arroz (QUEIROZ et al., 2002; JACOB-LOPES et al., 2006; JACOB-LOPES et al., 2007; ZEPKA et al., 2008) se comparado ao efluente da indústria da pesca (HORNES et al., 2010).

Um dos fatores condicionantes à utilização de biomassa microbiana na dieta alimentar se refere a sua desidratação, com forma viável de aplicação, quer em formulações destinadas a alimentação humana ou animal (ESQUIVEL et al., 1992; RICHMOND et al., 1994; SARADA et al., 2001; MORIST et al., 2001; MOLINA-GRIMA et al., 2002). De acordo com Jacob –Lopes et al. (2007), a secagem em camada delgada e leito de jorro da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, demonstrou serem técnicas adequadas de preservação desta biomassa, gerada a partir da bioconversão dos nutrientes presentes na água residuária do processo de parboilização do arroz, viabilizando a sua utilização como fonte de nutrientes e componentes químicos, resultando em matérias primas com características bioquímicas e funcionais preservadas. Zepka et al. (2008) estudaram o efeito de diferentes condições de secagem na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. Os autores verificaram que o teor proteico apresentou mínimo e máximo de 41,33% e 49,29%, respectivamente, e que o valor máximo foi obtido utilizando a temperatura de 60 °C.

Foi constatado que mesmo na melhor condição operacional, o teor proteico na biomassa da cianobactéria cultivada no efluente do arroz é inferior quando o mesmo micro-organismo cresce no efluente do pescado, considerando as mesmas condições experimentais (HORNES et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011). Este fato demonstra o efeito da composição do meio de cultivo no perfil bioquímico, uma vez que o efluente oriundo do processamento de pescado se caracteriza por conter uma alta concentração em compostos nitrogenados orgânicos.

Sob o ponto de vista de utilização desta cianobactéria na dieta alimentar, salienta-se ainda trabalhos, que enfatizam temas como a caracterização de odor, efeito da secagem na cor da biomassa, efeito hipocolesterolêmico, avaliação biológica, perfil

aminoacídico, perfil de ácidos graxos e propriedades funcionais (QUEIROZ et al., 2001; JACOB – LOPES e tal., 2006; ZEPKA et al., 2010).

Queiroz et al. (2001), avaliaram o efeito hipocolesterolêmico em ratas submetidas a uma dieta teste em que proteínas, minerais e fibras eram expressos segundo a composição destes constituintes em *Aphanothece*. Os autores verificaram que os animais alimentados com esta dieta por um período de 8 meses, apresentaram baixo índice de colesterol, quando comparados a um grupo controle. Paralelamente, a digestibilidade, NPU e efeitos anatomo histológicos, foram avaliados, corroborando o potencial de utilização desta biomassa como complemento alimentar.

A bioconversão dos resíduos do efluente da parboilização do arroz, foi demonstrada nos trabalhos de Jacob-Lopes et al. (2006) e Zepka et al. (2008). O perfil aminoacídico descrito, demonstrou teores superiores ao recomendado pela FAO (1985), com exceção dos aminoácidos lisina e dos sulfurados (metionina e cistina), enquanto que para as propriedades funcionais foram obtidos máximos de 48,6 % e 316 mL.g⁻¹ para a solubilidade proteica e capacidade emulsificante respectivamente (JACOB-LOPES et al., 2006). O perfil bioquímico indicou predominância de ácidos graxos poli-insaturados especialmente o ácido gama linolênico (ZEPKA et al., 2008). Nesta linha de trabalho, a aplicação deste micro-organismo associada ao tratamento de efluentes agroindustriais e a produção de componentes bioquímicos de interesse industrial, como proteínas, ácidos graxos, carboidratos e pigmentos, uma série de outros trabalhos, tem demonstrado o valor nutricional deste micro-organismo em função de seu alto conteúdo proteico associado ao balanço favorável em aminoácidos, bem como a predominância de ácidos graxos insaturados em seu perfil lipídico, sugerindo a utilização desta biomassa na complementação alimentar (QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2006; ZEPKA et al., 2010).

Um problema gerado junto ao duplo propósito de tratar efluentes mediante a aplicação do potencial removedor de nutrientes e obtenção de constituintes da biomassa de interesse industrial é a questão separação desta biomassa da água residuária. Neste sentido, Silva-Manetti et al. (2011), estudou a separação da biomassa do efluente da indústria da pesca, quando este foi tratado por *Aphanothece microscopica* Nägeli, mediante o uso dos coagulantes cloreto ferríco e sulfato de alumínio à diferentes pH do efluente e concentrações de coagulantes. Neste trabalho, foi constatado que a melhor condição registrada ocorreu quando foi utilizado o cloreto de ferro na concentração de 300 mg.L⁻¹, a pH 7. Paralelamente, foi avaliada a possibilidade de reúso da água

residuária resultante, ficando demonstrada a aplicabilidade da associação do tratamento de efluente da indústria da pesca por *Aphanothece microscopica* Nägeli e utilização de coagulantes para o reúso da água tratada. Assim neste cenário, estudos promissores com *Aphanothece microscopica* Nägeli têm sido realizados, não somente no que se refere ao tratamento de águas residuárias, mas também em relação ao aproveitamento dos biocompostos de sua biomassa.

5 CULTIVO HETEROTRÓFICO

A heterotrofia, pode ser definida como a utilização de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. A aplicação do metabolismo heterotrófico de microalgas tem sido utilizado visando o aumento de sua produtividade em biomassa (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

O termo mixotrofia, pode ser interpretado, como uma variante da heterotrofia, onde o CO₂ e o carbono orgânico são simultaneamente assimilados, operando ambos os metabolismos, o fotossintético e o respiratório (PEREZ-GARCIA et al., 2011a). De acordo com Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), a mixotrofia é definida, como um processo metabólico, em que embora a fotossíntese seja a principal fonte de energia, tanto carbono orgânico como CO₂ são necessários. Neste processo, os compostos orgânicos são utilizados como fonte de carbono e o CO₂ como doador de elétrons.

As cianobactérias embora apresentem a fotossíntese como modelo metabólico preferencial, são capazes de usufruir do metabolismo heterotrófico no escuro, consumindo moléculas orgânicas solúveis tais como açúcares, ácidos orgânicos e acetato (DUMAS et al., 1998; QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; ZEPKA et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011a). Estes micro-organismos possuem a capacidade de crescer em meios contendo concentrações variáveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos, na presença ou ausência de luz e diferentes condições de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, luminosidade entre outras condições de cultivo (BLIER et al., 1996; GONZÁLES et al., 1997; TAM & WONG, 2000; LEE & KIM, 2001; BASHAN et al., 2002; BASTOS et al., 2004 ; TRAVIESO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007 ; JACOB-LOPES et al., 2007; HORNES et al., 2010; BASTOS et al., 2011).

A literatura reporta que cultivos em grande escala de microalgas com base em seu metabolismo autotrófico, se traduzem em alto custo, o que torna o aproveitamento de microalgas uma operação limitada, muitas vezes restrita a produção de pequenos volumes e como consequência resultando em alto preço dos produtos gerados. O cultivo heterotrófico pode contribuir para resolver estas questões, por exemplo, mediante a associação do tratamento de efluentes e geração de produtos de interesse comercial (QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; PEREZ-GARCIA et al., 2011; DEVI et al., 2012).

As operações que envolvem crescimento celular e biossíntese de produtos, são influenciadas pelos nutrientes presentes no meio, bem como por fatores ambientais. Neste sentido, o cultivo heterotrófico de microalgas associado ao tratamento de efluentes oferece múltiplos benefícios tanto no que se refere ao setor energético como ambiental (JACOB-LOPES et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; DEVI et al., 2012). Assim, modelos heterotróficos de cultivos microalgais, oferecem uma série de vantagens incluindo, melhor controle do processo, velocidade de crescimento e separação da biomassa (LIANG et al., 2009; LIANG et al., 2010; DEVI et al., 2012). No entanto, esta prática é imprópria para muitos micro-organismos, muitas espécies são obrigatoriamente autótrofas (LIANG et al., 2009). Por outro lado, há muitas espécies que crescem em total ausência de luz, tendo como fonte de carbono matéria orgânica (ANDERLEAN & ZARNEA, 1998; QUEIROZ et al., 2004; CHEN, 2006; ZEPKA et al., 2007; BASTOS et al., 2009; ZEPKA et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Segundo Perez-Garcia et al. (2011a), a utilização de sistemas heterotróficos para o cultivo de microalgas elimina as duas principais deficiências dos fotobiorreatores, uma vez que permite o uso de praticamente qualquer fermentador convencional como biorreator e reduz os custos de produção da biomassa, por ser independente da luminosidade e passível de utilização de águas residuárias com carga orgânica. Além disso, é possível obter heterotroficamente, elevadas concentrações celulares, o que torna mais viável o processo de produção de biomassa em grande escala. Com relação ao cultivo mixotrófico, além dessas vantagens, há o benefício de permitir a produção de metabólitos fotossintéticos (CHEN, 1996).

Ao mesmo tempo em que diversas fontes de carbono têm sido propostas para o cultivo heterotrófico de microalgas, uma avaliação prática mostra que somente poucos substratos são passíveis de uso pelos micro-organismos (PEREZ-GARCIA et al.,

2011a). As fontes de carbono frequentemente utilizadas para os cultivos heterotróficos e mixotróficos de microalgas são glicose, acetato e glicerol, além da utilização direta de águas residuárias (HEREDIA-ARROYO et al., 2010; HEREDIA-ARROYO et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011a; PEREZ-GARCIA et al., 2011b).

A glicose é a fonte de carbono mais comumente utilizada, tanto para microalgas como outras espécies de micro-organismos. Em geral, quando se utilizam outros substratos, as microalgas requerem um período de adaptação, representado pela extensa fase lag, necessária para a síntese das enzimas e dos sistemas de transporte específicos para a assimilação e consumo das moléculas. Uma vez que a glicose é considerada o substrato preferido pelas microalgas, o consumo das outras fontes de carbono pode ser reduzido na sua presença, considerando que as enzimas que catalisam o consumo de substratos alternativos são dificilmente sintetizadas nessas condições (RATLEDGE et al., 2001; NARANG & PILLYUGIN, 2005, citados por PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

A literatura é ampla no que se refere a trabalhos que desenvolvem o cultivo heterotrófico utilizando como fonte de carbono águas residuárias, com importantes resultados no que se refere a remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo (TAM & WONG 2000; MARTÍNEZ et al., 2000; VOLTOLINA et al., 2005; QUEIROZ et al., 2004; TRAVIESO et al., 2006; CHEN, 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2007; BASTOS et al., 2009; SILVA-MANETTI et al., 2011; VIEIRA-GUERRA et al., 2012). Assim, o tratamento simultâneo de carbono, nitrogênio e fósforo, por incorporação a uma biomassa, bem como o aproveitamento de compostos celulares destes micro-organismos gerados são importantes alternativas em relação aos processos convencionais. As cianobactérias destacam-se entre estes micro-organismos, devido a sua simplicidade de exigências nutricionais e consequente versatilidade metabólica em especial o metabolismo heterotrófico.

6 CARBOIDRATOS DE CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias, pela sua própria natureza fotossintética, são sintetizadores naturais de carboidratos, apresentando na sua constituição unidades de monossacarídeos como a xilose, manose, glicose, galactose e rabinose. Sua parede celular, caracteriza-se pela presença de polissacarídeos, formados por longas cadeias polimerizadas de açúcares simples ou aminados, expressos por acetil-glicosamina e ácido acetil

murâmico (RAVEN et al., 1976; BOROWITZKA et al.,1994). De acordo com Bertocchi et al. (1960), polímeros tendo como unidade glicose e manose, são descritos como característicos da parede celular de diferentes cianobactérias, tais como *Nostoc e Phormidium*.

A composição química da biomassa microalgal é altamente influenciada pela disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo (LOURENÇO et al., 1997; ROMANO et al., 2000; BURJA et al., 2001; ZEPKA et al.,2008; MORENO-GARRIDO, 2008; HORNES et al., 2010; LAI et al., 2011; DEVI et al., 2012). Muito tem sido enfatizado, quanto a disponibilidade de nitrogênio, reportando que altas concentrações de nitrogênio favorecem a síntese e a acumulação de proteínas, enquanto que na presença de baixas concentrações deste nutriente, os micro-organismos tendem a acumular carboidrato (BOROWITZKA et al., 1994; LOURENÇO et al., 1997; DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998; PEREZ-GARCIA et al., 2011a; LAI et al., 2011; DEVI et al., 2012).

Em condições limitantes de nitrogênio em cultivos da cianobactéria *Dunaliella*, Borowitzka et al. (1994), reportam que a composição deste micro-organismo se reflete em um incremento de carboidratos, proporcional ao aumento da fração lipídica, atingindo concentrações de 30% a 40 % deste constituinte. Neste sentido Lai et al. (2011) reportam que a produção de carboidrato e o conteúdo de carboidrato total na biomassa pode variar nas diferentes concentrações iniciais de nutrientes no meio, ressaltando, que com a limitação de nitrogênio e fósforo induz a um acúmulo carboidratos celular.

A constituição das cianobactéria em função das diferentes condições de cultivo tem sido descritas como portadoras de 40% a 60 % de proteínas, 7% de sais minerais, 1% a 40 % de lipídios, 10% a 40 % de carboidratos, além de vitaminas, pigmentos e ácidos nucleicos (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; MORIST et al., 2001; DANESI et al., 2002; SPOLAORE et al., 2006; ZEPKA et al., 2008).

Zepka et al. (2008) avaliaram o perfil bioquímico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da parboilização do arroz e desidratada a diferentes temperaturas. No que se refere a produção de carboidratos, concentrações de 13,40 % a 17,67 %, foram registradas, evidenciando o potencial de produção de carboidratos deste micro-organismo quando cultivado no efluente da parboilização do arroz.

Carboidratos extracelulares são encontrados em cianobactérias formando cápsulas, as quais são estruturas compactas associadas com a superfície celular, ou como massa mucilaginosa, amorfa, fracamente ligada a célula. Em muitos casos, podem ser liberados para o meio. Estes compostos podem ser liberados por quase todas as microalgas planctônicas ou não (DE PHILIPPI & VICENZINI, 1998; GERESH et al., 2000; GIROLDO et al., 2003; PARIKH & MADAMWAR, 2006).

As cianobactérias têm sido reconhecidas como micro-organismos em potencial para a produção destes compostos (MORENO et al., 2000; PARIKH & MADAMWAR, 2006). São caracterizados como metabólitos secundários, produzidos principalmente durante a fase estacionária (MORENO et al., 1998; DOUMIT & PINOTTI et al., 2004).

Estes compostos são produzidos em condições desfavoráveis, como estratégia metabólica destes micro-organismos para crescimento e reprodução (DE PHILIPPIS et al., 1992; MORENO et al., 1998; NICOLAUS et al., 1999; ROMANO et al., 2000; DOUMIT & PINOTTI et al., 2004). Manipulações de condições ambientais, como temperatura, concentração de nitrogênio ou irradiação tem sido utilizadas em experimentos que avaliam a produção de carboidratos extracelulares, bem como outros compostos de interesse, produzidos por cianobactérias (DE PHILIPPIS & VICENZINE et al., 1998; MORENO et al., 1998; NICOLAUS et al., 1999; MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011).

Estudos de fatores que estimulam a produção de carboidratos extracelulares no sentido de se obter meios e condições de cultivo para produção destes biocompostos por cianobactérias, ainda são escassos. A maioria dos trabalhos abordam a questão da deficiência de nitrogênio utilizada para estimular o acúmulo destes compostos (LOURENÇO et al. 1997; DE PHILIPPIS & VICENZINE, 1998; NICOLAUS et al. 1999; MORENO et al., 2008).

Nicolaus et al. (1999), reportam a influência de alguns fatores, físicos e nutricionais sobre a produção de carboidratos extracelulares, entre eles a influência do nitrogênio. Os autores trabalhando com *Phormidium* em meio BG-11 com aeração e iluminação contínua, verificaram maior produção destes compostos em ausência de luz. Estes mesmo autores, observaram que para *Spirulina sp* reduções ou ausência de nitrogênio, resultaram em acréscimos nas concentrações de carboidrato, indicando que condições desfavoráveis, induzidas por fatores nutricionais e físicos, interferem notadamente na produção destes compostos.

Entre as diferentes funções que desempenham os carboidratos extracelulares nas cianobactérias, de acordo com Proserpi (2004), está a proteção da nitrogenase, contra a inativação promovida pelo oxigênio. Neste sentido, a produção destes compostos pode ser estimulada, não só pela redução nos teores de nitrogênio, como também, pela redução da atividade da nitrogenase, conforme demonstra o trabalho de Moreno et al. (2008).

Os carboidratos extracelulares são fontes renováveis de importante classe de material polimérico de interesse biotecnológico, oferecendo uma variedade de aplicação, por apresentar propriedades físicas - químicas reproduzíveis, apresentando-se como uma alternativa as fontes de polissacarídeos oriundas de plantas e algas (SELBMANN et al., 2002), com a vantagem de serem facilmente manipuláveis e apresentarem baixo tempo de geração (PARICKH & MADAMWAR, 2006). São industrialmente utilizados como agentes estabilizantes e gelificantes em produtos alimentícios de interesse (MISHRA et al., 2011; DONOT et al., 2012). Ainda no que se refere a despoluição ambiental, e crescente interesse quanto suas funções biológicas como antitumorais, ante vírus, antioxidante e probióticos (LIU et al., 2010; MISHRA et al., 2011).

Os carboidratos extracelulares produzidos pelas cianobactérias são polímeros, constituídos de cadeias de mono ou dissacarídeos, formados por unidades unidas por ligações glicosídicas, com diferentes números de carbono (MAGER & THOMAS, 2011).

A produção, estrutura e quantidade produzida, podem variar de uma espécie para outra, ou mesmo dentro de uma mesma espécie, dependendo das condições ambientais (MORENO et al., 1998; KAWAI et al., 2006; PARIKH & MADAMWAR, 2006). Parikh & Madamwar (2006), trabalhando, com 4 diferentes espécies de cianobactérias, observaram que todas as culturas apresentaram habilidade de produzir carboidratos extracelulares, a base de ribose, xilose, glicose e manose, ficando constatado que a xilose foi o constituinte que apresentou maiores diferenças quanto a concentração.

De Philippis & Vincenzini (2006) relataram que, mais de 70 cepas haviam sido estudadas com relação à produção de carboidratos extracelulares sendo a maior parte dos estudos referentes à determinação da composição em açúcares. Os açúcares encontrados em cianobactérias, no geral, são as hexoses, glicose, galactose e manose; as pentoses, ribose, xilose e arabinose; as desoxihexoses, fucose e ramnose e os açúcares ácidos, ácido glicurônico e galacturônico. O açúcar mais frequentemente

encontrado é a glicose, em mais de 90 % dos carboidratos extracelulares, seguido por galactose, manose e ramnose (80% - 85 %). Glicose é também o mais abundante, mas há biocompostos que apresentam outros açúcares com maior concentração, como arabinose, galactose ou fucose.

A maior parte dos carboidratos extracelulares de cianobactérias apresentam natureza aniônica, muitos contendo dois diferentes ácidos urônicos, o que é raro em outros grupos microbianos. Frequentemente possuem um ou dois tipos de pentoses, açúcares que normalmente estão ausentes em outros polissacarídeos de procariontes. A maioria dos carboidratos extracelulares de cianobactérias são relativamente complexos, sendo esses biocompostos formados de seis ou mais tipos de monossacarídeos, uma característica que também não é apresentada por outros micro-organismos ou macroalgas (LEE et al., 2000; HIRAHASHI et al., 2002; LEE et al., 2007).

Além de apresentarem propriedades físico-químicas que trazem vantagens para sua utilização industrial na forma convencional, como gelificantes, emulsificantes, flocculantes e hidratantes, a natureza aniônica muitas vezes dos carboidratos extracelulares de cianobactérias os faz interessantes para aplicações biomédicas, assim como para aplicações no campo da biorremediação para a remoção de metais tóxicos de águas poluídas (LEE et al., 2000; HIRAHASHI et al., 2002; KAJI et al., 2002; DOUMIT & PINOTTI, 2004; KAWAI et al., 2006; LEE et al., 2007).

7 REÚSO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

A limitação de reservas de água doce no planeta, o aumento da demanda de água para atender principalmente o consumo humano, agrícola e industrial, a prioridade de utilização dos recursos hídricos disponíveis para abastecimento público e as restrições que vêm sendo impostas em relação ao lançamento de efluentes no meio ambiente, torna necessária a adoção de estratégias que visem racionalizar a utilização dos recursos hídricos e reduzir os impactos negativos relativos à geração de efluentes pelas indústrias de alimentos (UNESCO, 2009; WHO, 2009; BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010).

A Agência das Nações Unidas e Organização Mundial da Saúde tem alertado a comunidade sobre a ameaça da escassez de água ou a eliminação descontrolada de poluentes. Se considerada como parâmetro que afeta a vida humana, a questão do reúso da água é certamente um dos principais fatores que estão envolvidos no desenvolvimento humano, assim a meta é desenvolver um novo paradigma tecnológico,

visando o reúso de águas residuárias (UNESCO, 2009; WHO, 2009; BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010).

A inserção do conceito de “usuário pagador” na captação de água e descarte de efluentes (BRASIL, 1997) levou técnicos e administradores de atividades produtivas a repensar o planejamento estratégico de alguns setores. As indústrias de alimentos são exemplos de atividades que sofrerão consequências econômicas com o conceito do usuário pagador, pois há um grande consumo de água para o processamento de seus produtos e limpeza de seus equipamentos. As indústrias de laticínios encontram-se nesse grupo de indústrias, pois as diferentes linhas de processamento e higienização de equipamentos, geram grande volume de água (BRIÃO & TAVARES, 2007; MAPA, 2007; VOUGH et al., 2008; CHEN & LIU, 2012). Segundo MAPA (2007), o consumo de água de limpeza na indústria de processamento de leite, representa mais de 80 % da demanda de água do setor agroindustrial.

Para cumprir as normas de descarga, as indústrias de laticínios adotaram um protocolo de tratamento de efluentes que muitas vezes pode afetar a economia global da planta, aumentando os custos dos sistemas de tratamento convencionais. Isso resulta na necessidade de tecnologias, que não somente tratem o efluente, mas que os tornem passíveis de serem reutilizados (FARIZOGLU & UZUNER, 2011).

O setor industrial brasileiro conta com uma série de empresas que visam o reúso de água (MARCO, 2006; SANTOS, 2006). Santos (2006) avaliando a questão custo-benefício em relação ao reúso de águas industriais, para lavagem de fábrica e resfriamento de caldeiras de um frigorífico, indicou uma economia de até 60 % dos gastos com água. A implementação de circuitos fechados ou semifechados de água para uso industrial tem sido estudada para se avaliar a melhor proposta para o reúso, minimizando também os custos com o tratamento necessário para tal.

Diferentes alternativas são disponibilizadas para tratar efluentes para o reúso. Neste universo, processos físicos, químicos e biológicos associados, tem sido bastante estudados (MOLINA-GRIMA et al., 2003; SUTHANTHARARAJAN et al., 2004; SARKAR et al., 2005; AL-MALACK et al., 2007; VOUGH et al., 2008; SILVA et al., 2009; SILVA-MANETTI et al., 2011; FARIZOGLU & UZUNER, 2011; LUO et al., 2012).

A associação de microalgas a processos físicos e químicos com o intuito do reúso da água residuária tratada é destacada em uma gama de trabalhos, com

importantes resultados, destacando entre estes, principalmente a aplicação de processos que envolvem a coagulação/floculação, na fase de separação da biomassa, seguido da separação de compostos residuais do efluente submetido ao tratamento biológico (KIM et al., 2005; SARKAR et al., 2005; HAMDANI et al., 2005; CHEN et al., 2006; SILVA et al., 2009; SILVA-MANETTI et al., 2011; BELTRAN-HEREDIA., 2010; LUO et al., 2012).

De acordo com Molina-Grima et al. (2003), a coagulação/floculação é um eficiente processo de pré tratamento de efluentes, bem como de separação da biomassa gerada de efluentes tratados por microalgas. Tem como base a adição de compostos químicos inorgânicos ou de polímeros de natureza orgânica no efluente a ser tratados, ou após tratamento, neste caso com o propósito de separar a biomassa. Estes compostos são capazes de induzir a agregação de células microalgais e materiais em suspensão, os quais se aderem a superfície coloidal, provocando a aglomeração das partículas (CHEN et al., 2006).

Os coagulantes orgânicos têm sido utilizados como alternativa aos inorgânicos para produção de água potável visando a melhoria dos processos de tratamento, resultando a redução do lodo gerado e ausência de metais aumentando a perspectiva do aproveitamento da biomassa e da água tratada (CHO et al., 2011; RIAÑO et al., 2012).

Uma série de trabalhos enfatizam, que a eficiência de coagulação aumenta, com a carga iônica, tendo sido mais utilizados, os sais trivalentes, em especial o cloreto férrico, bem como o sulfato de alumínio, quer como pré tratamento ou para separação da biomassa gerada (AL-MUTAIRI, 2004; KIM et al., 2005; HAMDANI et al., 2005; AL-MALACK & ANDERSON, 2007; SILVA et al., 2009; KUSHWAHA et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2011).

No que se refere ao uso de polímeros no tratamento de águas residuárias objetivando seu posterior reúso, os taninos, designados como moléculas fenólicas biodegradáveis, vem sendo notadamente indicados na literatura, em função da sua afinidade com proteínas, íons metálicos e corantes dispersos nos efluentes industriais. Afinidades estas atribuídas a seus grupos funcionais, como carboxílicos, álcoois éteres e anéis aromáticos (PARK & YOON, 2009; BELTRAN-HEREDIA, 2010; FARIZOGLU & UZUNER, 2011; DOLPHEN et al., 2011; LUO et al., 2012).

Nesta linha de trabalho, merece destaque ainda os processos com membranas, como microfiltração, nanofiltração e osmose inversa, meios porosos que atuam como filtros em nível molecular, possibilitando o fracionamento dos compostos dispersos no

efluente (PEPPIN & ELLIOT, 2001; MANCUSO & SANTOS, 2003; ZUO et al., 2008; VOURCH et al., 2008; ARORA et al., 2011; FARIZOGLU & UZUNER, 2011).

Estes processos têm sido usados eficientemente como pós-tratamento visando o reúso para diferentes atividades industriais, como resfriamento enxague e limpeza em geral (BES-PIÁ et al., 2003; MANCUSO & SANTOS, 2003; BRUM et al., 2009) e com notável aplicação na indústria de laticínios (VOURCH et al., 2008; VIDAL & CAMPOS, 2009; BRUM et al., 2009; LUO et al., 2010; FARIZOGLU & UZUNER, 2011; CHO et al., 2011; LUO et al., 2012).

A microfiltração, processo de separação com membranas mais próximo da filtração clássica, utiliza membranas porosas com poros na faixa entre 0,1 μm e 10 μm , o que é indicado, na retenção de materiais em suspensão e emulsão (SCHNEIDER, 2001; SUTHANTHARARAJAN et al., 2004; ARORA et al., 2011).

De acordo com uma série de autores, a principal limitação nestes processos, é a colmatação das membranas, o que pode ser minimizado mediante coagulação prévia do efluente. A coagulação modifica as características da partícula tais como o tamanho, carga e forma, promovendo o aumento das taxas de permeabilidade e qualidade do permeável (ALLÈGRE et al., 2005; KIM et al., 2005; VOURCH et al., 2008; VIDAL & CAMPOS, 2009; PARK & YOON; 2009; RIERA-TORRES et al., 2010; KUSHWAHA et al., 2010; CHO et al., 2011; RAYESSA et al., 2011).

Trabalhos como de Park & Yoon (2009) e Silva-Manetti et al. (2011) reportaram o comportamento do íon férrico como coagulante no processo de coagulação combinado com microfiltração visando o reúso da água. Os resultados indicaram que a associação da coagulação antecedendo a filtração apresenta uma água residuária passível de ser reutilizada. Entre estes compostos coagulantes, íons cálcio e polímeros orgânicos também têm sido estudados (ABDESSEMED & NEZZAL et al., 2005; HAMDANI et al., 2005; BELTRÁN & HEREDIA, 2010).

Abdessemed & Nezzal (2005) avaliaram a ação conjunta do processo de coagulação-adsorção e ultrafiltração no efluente proveniente do tratamento secundário de uma planta de tratamento de efluente doméstico, utilizando cloreto de cálcio como agente coagulante e carvão ativado em pó como adsorvente. Os resultados indicaram um aumento significativo da performance da ultrafiltração.

A literatura relata que a fração coloidal, a qual compreende faixa de tamanho de partícula próximo ao diâmetro dos poros das membranas de microfiltração, é a principal

responsável na colmatção destes tipos de membranas, ocasionando, na maioria das vezes, obstrução interna dos poros. O processo de coagulação permite a transformação de grande parte do material coloidal e dissolvido em fração particulada a qual é mais eficientemente removida nas membranas de microfiltração, de modo que os fenômenos de colmatção são minimizados (VOURCH et al., 2008; VIDAL & CAMPOS, 2009; KUSHWAHA et al., 2010; CHO et al., 2011; LUO et al., 2012; CHEN et al., 2012).

A escolha por uma determinada tecnologia de tratamento para fins de reúso deve ser baseada nas características inerentes ao tipo de efluente estudado, o que requer um estudo de tratabilidade, avaliando suas particularidades e a real possibilidade de aplicação dos equipamentos ou sistemas propostos (SANTOS et al., 2006; VOURCH et al., 2008; KUSHWAHA et al., 2010; CHO et al., 2011; LUO et al., 2012; CHEN et al., 2012).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAOUF N.; AL-HOMAIDAN A. A.; IBRAHEEM I. B. M. Agricultural importance of algae. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 11648 - 11658, 2012.

ABDESSEMED, D.; NEZZAL, G. Tertiary treatment of a secondary effluent by the coupling of coagulation-adsorption-ultrafiltration for reuse. **Desalination**, v. 175, p. 135 - 141, 2005

ALLÈGRE, C.; MOULIN, P.; MAISSEU, M. Treatment and reuse of reactive dyeing effluents. **Journal of Membrane Science**, Paper in Press, 2005.

AL-MALACK, M.H.; ABUZOID, N.S.; EL-MUBARAK, A.H. Coagulation of polymeric wastewater discharged by a chemical factory. **Water Research**, v. 33, p. 521 - 529, 2007.

AL-MUTAIRI, N. Z.; HAMODA, M.F.; AL-GHUSAIN, I. Coagulant selection and sludge conditioning in a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 115 - 119, 2004.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern Approach to the classification system of cyanophytes 3 – Oscillatoriales. **Archiv für Hydrobiologie Algological Studies**, v. 80, p. 327 - 472, 1988.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459 - 479, 2000.

ARDELEAN, I.; ZARNEA, G. **Photosynthesis respiration interplay in cianobactéria: Fundamentals and Application**. In: Subramanian, G.; Kaushik, B.D.; Venkataraman, G.S. Cyanobacterial Biotechnology. Science Publishers, Inc., USA. p. 103 - 107, 1998.

ARORA, A.; SETH, A.; DIEN, B.S.; BELYEA, R.L.; SINGH, V.; TUMBLESON, M.E.; RAUSCH, K.D. Microfiltration of thin stillage: Process simulation and economic analyses. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 113 - 120, 2011.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 64 - 70, 2006.

ARAÚJO, S.C.; GARCIA, V.M.T. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, v. 246, p. 405 - 412, 2005.

ARVANITOYANNIS, I.S.; KASSAVETI, A. Dairy Waste Management: Treatment Methods and Potential Uses of Treated Waste. **Waste Management for the Food Industries**, p. 801 - 860, 2008.

BABU, G. S.; HANS, R. K.; SINGH, J.; VISWANATHAN, P. N.; JOSHI, P. C. Effect of lindane on the growth and metabolic activities of cyanobacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 219 - 221, 2001.

BASHAN, L. E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**. v. 36, p. 2941 - 2948, 2002.

BASTOS, R. G.; QUEIROZ, M. I. ALMEIDA; T. L.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. V.; PADILHA, M. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 112 - 116, 2004.

BASTOS, R.; QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. COD removal of parboilized rice wastewater by cyanobacteria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 3, p. 245 - 250, 2009.

BASTOS, G.B.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA L.Q.; QUEIROZ, M.I. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 5, p. 258 - 264, 2010.

BASTOS, R.G.; PAIVA, P.R.; RIGO, M.; VEIGA, G.; QUEIROZ, M.I. Cultivo de *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de açúcares. **Bioscience Journal**, v. 27, p. 156 - 161, 2011.

BANU, R.; ANANDAN, S.; KALIAPPAN, S.; YEOM, I.-T. Treatment of dairy wastewater using anaerobic and solar photocatalytic methods. **Solar Energy**, v. 82, p. 812 – 819, 2008.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: Anatomy. **Biochemistry and Bioengineering**, p. 1 - 34, 2006.

BERARDINO, S. Di; COSTA, S.; CONVERTI, A. Semi-continuous anaerobic digestion of a food industry wastewater in an anaerobic filter. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 261 - 266, 2000.

BECKER, EW; BADDILEY, J. **Oil Production in Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. Cambridge University Press; 1994.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.C. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 1019 – 1025, 2010.

BERTOCCHI, C., I. NARARINI, A. CESARO. Polysaccharides from cyanobacteria (review paper). **Carbohydrate polymers**, v. 12, p. 127 - 153, 1990.

BES-PIÁ, A.; MENDOZA-ROCA, J.A.; ALCAINA-MIRANDA, M.I.; IBORRA-CLAR, A.; IBORRA-CLAR, M.I. Combination of Physico-Chemical Treatment and Nanofiltration to Reuse Wastewater of a Printing, Dyeing and Finishing Textile Industry. **Desalination**, v. 157, p. 73 - 80, 2003.

BOROWITZKA, M. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. **Micro-algal Biotechnology**. 2. ed. Sydney: p. 477, 1994.

BURJA, A. M.; et al. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9347 - 9377, 2001.

BLIER, R.; LALIBERTÉ, G.; NÖUE, J. de la. Production of the cyanobacterium *Phormidium bohneri* in parallel with epuration of a dairy anaerobic effluent. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 587 - 593, 1996.

BRASIL. Câmara dos Deputados. Lei nº 9433, de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. **Diário Oficial [da] União**, 8 jan.

BRIAO, V.B.; TAVARES, C.R.G. Ultrafiltração como processo de tratamento para o reúso de efluentes de laticínios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 134 - 138, 2007.

BRUM, L.F.W.; SANTOS JÚNIOR, L.C.O.; BENEDETTI, S. **Reaproveitamento de Água de Processo e Resíduos da Indústria de Laticínios**. 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production. Key Elements for a sustainable world: energy, water and climate change, São Paulo – Brasil, 2009.

CASTAING, J.-B.; MASSÉ, A. PONTIÉ, M; SÉCHET, V.; HAURE, J.; JAOUEN, P. Investigating submerged ultrafiltration (UF) and microfiltration (MF) membranes for seawater pre-treatment dedicated to total removal of undesirable micro-algae. **Desalination**, v. 253, p. 71 – 77, 2010.

COSTA J.A.V.; COZZA KL, OLIVEIRA L, MAGAGNIN G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 439 - 442, 2001.

CRAGGS, R. J.; McAULEY, P. J.; SMITH, V. J. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. **Water Research**, v. 31, p. 1701 - 1707, 1997.

CHEN, G-Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 607 – 616, 2006.

CHEN, W.; LIU, J. The possibility and applicability of coagulation-MBR hybrid system in reclamation of dairy wastewater. **Desalination** , v. 285, p. 226 – 231, 2012.

CHO, S.; LUONG, T. T.; LEE, D.; OH, Y.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8639–8645, 2011.

CHOJNAC KA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, p. 21 - 34, 2004.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Journal Biotechnology Advances**, v. 29, p. 686 - 702, 2011.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUÍ, C. O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. An investigation of the effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass Bioenergy**, v. 23, p. 261 - 269, 2002.

DAVID C.; ENRIQUE, M.; THAMAR, P.; CARIDAD, DE H.; LARS, W.; DANIEL, S.; SAMUEL C.; DELIA, M.; GEOFFREY A. C.; ANTONIO Q. Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in spanish reservoirs. **Journal of Phycology**, v. 43, p. 1120 – 1125, 2007.

DEVI, M.P.; SUBHASH, G.V.; MOHAN, S.V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth

and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276-283, 2012.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611 - 1627, 2010.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p.151 - 175, 1998.

DE PHILIPPIS, R., SILI, C., TASSINATO, G., VINCENZINI, M. AND MATERASSI, R. Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*. **Bioresource Technology**, v. 38, p. 101 - 104, 1991.

DERNER, R. B.; OHSE, SILVANA; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959 - 1967, 2006.

DOUMIT, C. N.; PINOTTI, M. H. Exopolissacarídeos de Cianobactérias. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 43 - 52, 2004.

DOLPHEN, R; THIRAVETYAN, P. Adsorption of melanoidins by chitin nanofibers. **Chemical Engineering Journal**, 166, 890 – 895, 2011.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951 – 962, 2012.

ESQUIVEL, B.;VOLTOLINA, D.; SANDOVAL, F.C. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 369 - 373, 1993.

FARIZOGLU, B.; UZUNER, S. The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 57, p. 46 – 54, 2011.

FOGG, G. E. **Blue- green algae**. In: LASKIN, A. I.; LECHEVALIER, H. A Handbook of Microbiology: Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses, v. 2. Cleveland: CRC Press, p. 347 - 363, 1977.

FRANCISCO, E.C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 395 - 403, 2010.

FRAPPART, M.; OMAR AKOUM, O.; DING, L.H.; JAFFRIN, M.Y. Treatment of dairy process waters modelled by diluted milk using dynamic nanofiltration with a rotating disk module. **Journal of Membrane Science**, v. 282, p. 465 – 472, 2006.

GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H.; PAULSEN, B. S. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology**, v. 39, p. 1109 - 1115, 2003.

GERESH, S.; MAMONTOV, A.; WEISTEIN, J. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalga: preparation, characterization and properties. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Amsterdam**, v. 50, p.179 - 187, 2002.

GONZÁLEZ, L.E.; CAÑIZARES, R.O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 60, p. 259 - 262, 1997.

GUERRA-VIEIRA, J.; SILVA-MANETTI, A.G.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M.I. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, v. 40, n° 1-3, p. 224 - 230, 2012.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; et al.. Anaerobic hidrolisis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. **Water Research**, v. 33, p. 3281 - 3290, 1999.

HALPERIN, DELLA R.; ZULPA DE CAIRE, G.; ZACCARO DE MULLE, M. C. Contenido Proteico de *Aphanothece stagnina* (Sprengel). A. Braun (Cyanophyta, Chorococcaceae). **Physis sección B**, v. 33, p. 159 - 164, 1974.

HAMDANI, A.; MOUNTADAR, M.; ASSOBBHEI, O. Comparative study of the efficacy of three coagulants in treating dairy factory waste water. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 83 - 88, 2005.

HARUN, R.; SINGH, R.M.; FORDE, G.M.; DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037 - 1047, 2010.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978 - 1995, 2010.

HEREDIA-ARROYO, T. WEI, W.; RUAN, R. HU, B Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245 - 2253, 2011.

HIRAHASHI, T. MATSUMOTO M, HAZEKI K, SAEKI Y, UI M, SEYA T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 423 - 434, 2002.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. **Evaluation of the growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in effluent of fishing industry.** In: CHISA – 16 th International Congress of Chemical and Process Engineering. Prague, 2004.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. O Efeito da razão C/N e do inóculo na remoção de nitrogênio do efluente da indústria da pesca pela cianobactéria. **Revista Vetor**, Rio Grande, v. 15, p. 25 - 32, 2005.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. **Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli.** Universidade Federal do Rio Grande (Tese Doutorado-Engenharia e Ciência de Alimentos), 2008.

HORNES, M.; SILVA, A. G; MITTERER, M. L; QUEIROZ, M. I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 1 - 371, 2010.

HU, W. C.; THAYANITHY, K.; FORSTER, C. F. A kinetic study of the anaerobic digestion of ice-cream wastewater. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 965 - 971, 2002.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M.; QUEIROZ, M. I. Caracterização da fração protéica da cianobactéria cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482 - 488, 2006.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; PINTO, L.A.A.; QUEIROZ, M.I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium Nägeli. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 63 - 69, 2007a.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G; FRANCO, T.T. Rates of CO₂ removal by in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1365 - 1373, 2007b.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 894 - 900, 2010.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIN, M.; DE BOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4199 - 4205, 2007.

KAJI, T.; FUJIWARA, Y.; WATANABE, S.; SAKAMOTO, M. Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. **Life Sciences**, v. 70, p. 1841 - 1848, 2002.

KAWAI, L.A.; PINOTTI, M.H.P.; CELLIGOI, M.A.P.C. Exopolysaccharide production by the cyanobacteria *Nostoc* sp in different concentrations of nitrogen and glucose. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, p. 33 - 39, 2006.

KIM, SEUNG-HYUN; MOON, SEONG-YONG; YOON, CHO-HEE. Role of coagulation in membrane filtration of wastewater for reuse. **Desalination**, v. 173, p. 301 - 307, 2005.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V.; MALL, I. D. Treatment of dairy wastewater by commercial activated carbon and bagasse fly ash: parametric, kinetic and equilibrium modelling, disposal studies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3474 - 3483, 2010.

KREITLOW, S.; MUNDT, S.; LINDEQUIST, U. Cyanobacteria – a potential source of new biologically active substances. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 61 - 63, 1999.

LAI, J.; YU, Z.; SONG, X.; CAO, X.; HAN, X. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 405, p. 6 – 17, 2011.

LALIBERTÉ, G.; LESSARD, P.; DE LA NOÛE, J.; SYLVESTRE, S. Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. **Bioresource Technology** v. 59, p. 227 - 233, 1997.

LEE, B.K.; KIM, J.K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 111 - 124, 2001.

LEE, J. B. HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; SANKAWA, U. Structural Analysis of Calcium Spirulan (Ca-SP)-Derived Oligosaccharides Using Elettrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 136 - 138, 2000.

LEE, W.Y.; PARK, Y.; AHN, J.K.; KA, K.H.; PARK, S.Y. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 249 – 254, 2007.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043 – 1049, 2009.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y.; BLACKBURN, JW. BATCH STAGE STUDY OF LIPID PRODUCTION FROM crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6745 – 6750, 2010.

LIU, C.; LU, J.; LU, L., LIU; Y., WANG; F., XIAO, M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by

Bacillus licheniformis 8-37-0-1. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5528 – 5533, 2010.

LINCOLN, E. P.; WILKIE, A. C.; FRENCH, B. T. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 1, p. 63 - 68, 1996

LODI A, BINAGHI L, SOLISIO C, CONVERTI A, DEL BORGHI M. Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 656 – 660, 2003.

LOURENÇO, S.O.; MÁRQUEZ, U.; FILHO. J.M.; BARBARINO, E.; AIDAR. E. Changes in Biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Composition of two culture media. **Aquaculture**, v. 148, p. 153 - 168, 1997.

LUO, J.; CAO, W.; DING, L.; ZHU, Z.; WAN, Y.; JAFFRIN, M.Y. Treatment of dairy effluent by shear-enhanced membrane filtration: The role of foulants. **Separation and Purification Technology**, v. 96, p.194 – 203, 2012.

MACHADO, R.M.G.; FREIRE, V.H.; SILVA, P.C.; FIGUERÊDO, D.V.; FERREIRA, P.E. **Controle ambiental nas pequenas e médias industriais de laticínios**. Projeto Minas Ambiente, Belo Horizonte, p. 224, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brok**. 10 ed São Paulo; Prentice Hall Inc., 608 p. 2004.

MAGER, D.M.; THOMAS, A.D. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: A review of their role in dryland soil processes. **Journal of Arid Environments**, v. 75, p. 91 - 97, 2011.

MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H.F. **Reúso de Água**. São Paulo. Ed. Manole, 2003.

MARCO, A.S. Quanto custa a água. **Revista Frigorífico**. v. 132, p. 30 – 35, 2006.

MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; YOUSFI, F. El.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263 - 272, 2000.

MARQUEZ, F. J. NISHIO, N.; NAGAI, S.; SASAKI, K. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 62, p. 159 - 164, 1995.

MARKOU G, GEORGAKAKIS D Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. **Apple Energy**, v. 88 p. 3389 - 3401, 2011.

MIERZWA, J. C. **Água na indústria: uso racional e reúso**. p. 143, 2005.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3382 – 3386, 2009.

MOHAN, S. V.; RAO, N. C.; PRASAD, K. K. Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1501 - 1508, 2005.

MOLINA-GRIMA, E.; BELARBI, E.H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; ROBLES, M.A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491 - 515, 2002.

MORENO, J. VARGAS, M. A.; OLIVARES, H.; RIVAS, J.; GUERREIRO, M. G. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 175 - 182, 1998.

MORENO, J. et al. Chemical and Rheological Properties of an Extracellular Polysaccharide Produced by the Cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 67, p. 283 - 290, 2000.

MORENO, J.; VARGAS, M. Á.; RODRÍGUEZ, H. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 191 - 197, 2003.

MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3949 - 3964, 2008.

MORI, S.; CASTORENO, A.; MULLIGAN, M.E.; LAMMERS, P.J. Nitrogen status modeluates the expression of RNA-binding proteins in cianobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 203 - 210, 2003.

MORIST, A.; MONTESINOS, J. L.; CUSIDÓ J. A.; GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina Platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, p.535 - 547, 2001.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p.143 - 153, 2003.

O`GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 121 – 125, 2011.

OGBONNA JC, TOMIYAMA S, TANAKA H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* z for efficient production of α -tocopherol. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 67 - 74, 1998.

OLAIZOLA, M. Microalgal removal of CO₂ from flue gases: Changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 360 - 367, 2003.

OLVERA-RAMÍREZ, R.; CORIA-CEDILLO, M.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; MARTÍNEZ-JERÔNIMO, F.; PONCE-NOYOLA, T.; RIOS-LEAL, E.. Growth evaluation and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 121 - 124, 2000.

OLGUÍN, E.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19 - 24, 2001.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D.; Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1822 - 1827, 2006.

PARK, S.; YOON.T. Effects of iron species and inert minerals on coagulation and direct filtration for humic acid removal. **Desalination**, v. 239, p. 146–158, 2009.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, E.Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p.11 - 36, 2011a.

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 190 - 199, 2011b.

PEPPIN, S. S. L.; ELLIOT, J. A. W. Non-equilibrium thermodynamics of concentration polarization. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 92, p. 1 – 72, 2001.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, v. 25, p. 102 -17, 2011.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of micro algae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635 – 648, 2004.

PROSPERI, C. H. A cyanophyte capable of fixing nitrogen under high levels of oxygen. **Journal of Phycology, Lawrence**, v. 30, p. 222 - 224, 1994.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O. The Nägeli *microscopical Aphanothece* potential in the production of the single-cell protein from the remaining water. In: CHAMES, S. W.; CÁNOVASBARBOSA, G. V.; AGUILERA, J.

M. (Ed.) Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food (ICEF 8). Pennsylvania, USA, 2027-2031, 2001.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, R. G.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. G. Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece microscopica* Nägeli en las aguas residuales de la parbolización del arroz. **Revista Información Tecnológica**, v. 13, p. 61 - 66, 2002.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in batch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 130 - 141, 2004.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O. Efeito da razão C/N e do inóculo na remoção de nitrogênio do efluente da indústria da pesca pela cianobactéria. **Revista Vector**, Rio Grande, v. 15, p. 25 - 32, 2005.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; ROSA, L. S.; GOLDBECK, R. Nutricional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Microbiological Research**, v. 101, p. 7107 - 7111, 2006.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; PINTO, L. A. A. Secagem da cianobactéria *Aphanotece microscopica* Nägeli em leito de jorro. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 387 - 392, 2006a.

QUEIROZ, M. I. ; LOPES, E. J. ; ZEPKA, L. Q. ; NETTO, F. M. . Caracterização da Fração Protéica da Cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli Cultivada no Efluente da Parboilização do Arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482 - 488, 2006b.

QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q, BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2163 - 2169, 2007.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 22, p. 10 - 16, 2007a.

QUEIROZ, M. I; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; GOLDBECK, R. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying condition. **Chemical Engineering and Processing**, v. 50, p. 1 - 6, 2007b.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; PINTO, L. A. A. Characteristics of Thin-Layer Drying of the Cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 63 - 69, 2007c.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438 – 3443, 2011.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G., CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133 - 141, 2004.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, p. 807 – 815, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal** . Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 728, 1992.

RAYESSA, Y.E.; ALBASIA, C.; BACCHINC, C.P.; TAILLANDIER, P.; RAYNAL, J.; MIETTON-PEUCHOT, M.; DEVATINE, A. Cross-flow microfiltration applied to oenology: A review. **Journal of Membrane Science**, v. 382, p. 1 – 19, 2011.

RIAÑO, B; MOLINUEVO, B; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology. **Ecological Engineering**, v. 38, p. 110 – 113, 2012.

RIERA-TORRES, M.; GUTIERREZ-BOUZAN, C.; CRESP, M.; Combination of coagulation-flocculation and nanofiltration techniques for dye removal and water reuse in textile effluents. **Desalination**, v. 252, p. 53 - 59, 2010.

RICHMOND, A.; VONSHAK, A., Mass production of the blue green alga *Spirulina* an overview. **Biomass**. v. 15, p. 233 - 245, 1988.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 566 p., 2004.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**. v. 111. p. 01 - 61, 1979.

ROMANO, I.; BELLITTI, R.; NICOLAUS, B.; LAMA, L.; MANCA, M.C.; PAGNOTTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v. 50, p. 560 - 568, 2000.

SANTOS, R.C.O.; BARBOSA, O.F.; GIORDANO, G. Proposta de um método racional para o dimensionamento de reatores de tratamento de esgotos por lodos ativados em bateladas para remoção de carga orgânica. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 11, p. 153 - 161, 2006.

SARKAR, B; CHAKRABARTI, P. P; VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. Wastewater treatment in dairy industries—possibility of reuse. **Desalination**, v. 195, p. 1 – 3, 2006.

SARADA, R., MANOJ, G., PILLAI, G., RAVINSHANKAR, A., Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extration methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemitry**, v. 34, p. 795 - 801, 1998.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium gluanicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Letters in applied microbiology**, v. 34, p. 51 - 55, 2002.

SILVA, A.G.M.; HORNES, M.O.; MITTERER, M.L.; QUEIROZ, M.I.; Application of coagulants in pretreatment of fish wastewater using factorial Design. **Desalination and Water Treatment**, v. 1, p. 208 - 214, 2009.

SUTHANTHARARAJAN, R.; RAVINDRANATH, E.; CHITRA, K. Membrane application for recovery and reuse of water from treated tannery wastewater. **Desalination**, v. 164, p. 151 - 156, 2004.

SCHENK, P., THOMAS-HALL, S., STEPHENS, E., MARX, U., MUSSGUG, J., POSTEN, C., KRUSE, O., AND HANKAMER, B. “Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 20 - 43, 2008.

SCHMETTERER, G. **Cyanobacterial Respiration**. In: BRYANT, D. A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Plubishers, p. 409 - 435, 1994.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reúso**. São Paulo: ABES, 2001.

SPOLAORE, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87 - 96, 2006.

STANIER, R.Y., W.R. SISTROM, T.A. HANSEN, B.A. COHITTON, R.W. CASTENHOLZ, N. PFENNIG, V.N. GORLENKO, E.N. KONDRATIEVA, K.E. EIMJELLEN, R. WHITTENBURY, R.L. Gherna, and H. G. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. **International Journal System Bacteriology**, v. 28, p. 335 - 336, 1978.

TANG, D.; SHI, S.; LI, D.; HU, C.; LIU, Y. Physiological and biochemical responses of *Scytonema javanicum* (cyanobacterium) to salt stress. **Journal of Arid Environments**, v. 71, p. 312 - 320, 2007.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 145 - 151, 2000

TOMASELLI, L. **The Microalgal Cell**. In: RICHMOND, A. (Ed.) Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p. 3 - 19, 2004.

TORRE, P.; SASSANO, C.E.N.; SATO, S.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; CARVALHO, J.C.M.. Fed-batch addition of urea for *Spirulina platensis* cultivation Thermodynamics and material and energy balances. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 698 - 707, 2003.

THAJUDDIN, N. & G. SUBRAMANIAN. Cyanobacterial Biodiversity and potential application in Biotechnology. **Current Science**, v. 89, p. 47 - 57, 2005.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M.F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggy waste. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 158 -165, 2006.

UNESCO, World Water Assessment Programme. **The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World**, Earthscan, London, UK, 2009.

VIDAL, C.M.S.; CAMPOS, J.R. Coagulation associated with microfiltration for the advanced treatment of sewage. **Ambiência Guarapuava**, v. 5, p. 101- 114, 2009.

VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVES, M.; SOTO, L. P. Growth of *Snedesmus* sp. in artificial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 265 - 268, 1998.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**, v. 219, p.190 – 202, 2008.

WANG, Y.; HUANG, X.; YUAN, Q. Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic/aerobic membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1733 - 1739, 2005.

WEISSMAN, J. C.; RADWAY, J. C.; WILDE, E. W.; BENEMANN, J. R. Growth and production of thermophilic cyanobacteria in a simulated thermal mitigation process. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 87 - 95, 1998.

WHO, UNICEF. **Joint Programme on Water Supply and Sanitation**, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland, 2009.

XU, H., MIAO, X. & WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126: 499 - 507, 2006.

ZEPKA, L.; Q. ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, p. 368 - 371, 2007.

ZEPKA, L. Q. ; JACOB-LOPES, E. ; GOLDBECK, R. ; QUEIROZ, M. I. . Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1305 - 1310, 2008.

ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDECK, R.; SOUSA-SOARES, L.A.; QUEIROZ, M.I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresourse Technology**, v. 101, p. 7118 - 7122, 2010.

ZUO, W.; ZHANG, G.; MENG, Q.; ZHANG, H. Characteristics and application of multiple membrane process in plating wastewater reutilization. **Desalination**, v. 222, p. 187 – 196, 2008.

CAPÍTULO 3
DESENVOLVIMENTO DO
TRABALHO

ARTIGO 1

**EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO CELULAR EM
CULTIVOS DE *Aphanothece microscopica* Nägeli VISANDO A PRODUÇÃO DE
CARBOIDRATOS EXTRACELULARES**

**EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO CELULAR EM
CULTIVOS DE *Aphanothece microscopica* Nägeli, VISANDO A PRODUÇÃO DE
CARBOIDRATOS EXTRACELULARES**

SILVA-MANETTI, Adriana G.; QUEIROZ, Maria I.

Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos Programa de Pós
Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos Laboratório de Biotecnologia. Rio

Grande – RS. E-mail: biotecnofurg@yahoo.com.br; E-mail:

mariaisabel.queiroz@pesquisador.cnpq.br

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da temperatura e inóculo na produção de carboidratos extracelulares em cultivos de *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente de laticínios. Os cultivos foram conduzidos heterotroficamente em biorreatores de coluna de bolhas, pH ajustado a 7,6, em sistema isotérmico, ausência de luz e aeração contínua de 1 VVM. Realizou-se um planejamento experimental fatorial com três níveis (3^2), com os fatores: temperatura de cultivo (10°C, 20°C, e 30°C) e inóculo (100 mg.L⁻¹; 200 mg.L⁻¹; 300 mg.L⁻¹). Considerou-se como resposta a produção de carboidratos extracelulares, bem como avaliação da cinética de crescimento celular. As variáveis dependentes foram monitoradas a cada 4 h durante as fases de crescimento do micro-organismo. Foi demonstrado o efeito da temperatura e da concentração do inóculo na produção de carboidratos. Os melhores resultados, foram obtidos para os cultivos nos quais foram, utilizadas concentrações de inóculo de 200 mg.L⁻¹ e temperatura de 20°C. Nestas condições foram registradas velocidades específicas máximas de crescimento de 0,36 h⁻¹, resultando em produtividades em biomassa de 160,25 mg. L⁻¹.h⁻¹. Os resultados demonstraram que as maiores produções de carboidratos extracelulares foram registrados na fase estacionária de crescimento celular nas temperaturas superiores dos cultivos, com produtividades de 0,80 mg L⁻¹. h⁻¹ (200 mg.L⁻¹ 20°C), 1,07 mg L⁻¹.h⁻¹ (200 mg.L⁻¹ 30°C) e 0,97 mg L⁻¹.h⁻¹ (300 mg.L⁻¹ 30°C) para os experimentos 5, 8 e 9, respectivamente. Em face aos resultados obtidos, ficou demonstrado o potencial do efluente de laticínios para a produção de biomassa microalgal e carboidratos extracelulares. A manipulação da temperatura da reação e inóculo inicial pode ser considerada uma estratégia viável para a produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli.

Palavras-chave: Cianobactérias; Compostos extracelulares; Condições de cultivo; Cultivos heterotróficos.

ABSTRACT

The work aimed to evaluate the effect of temperature and concentration of inoculum in the production of extracellular carbohydrates in cultures of *Aphanothece microscopica* Nägeli in dairy effluents. The cultures were conducted heterotrophically in bubble column bioreactors with the pH adjusted to 7.6, in an isothermal system, in the absence of light and continuous aeration of 1 VVM. A factorial experimental design with three levels (3^2) was conducted with the factors: growth temperature (10°C, 20°C and 30°C) and inoculum concentration (100 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹, 300 mg L⁻¹). The production of extracellular carbohydrates and evaluation of the kinetics of cell growth were considered as response. The dependent variables were monitored every 4 hours during the growth phase of the micro-organism. The effect of temperature and concentration of the inoculum on the production of carbohydrates was demonstrated. The best results were obtained from cultures in which inoculum concentrations of 200 mg L⁻¹ and 20°C were used. Under these conditions, maximum specific growth velocities of 0.36 h⁻¹ were recorded, resulting in a biomass yield of 160.25 mg L⁻¹.h⁻¹. The results showed that the greatest production of extracellular carbohydrates were recorded in the stationary phase of cell growth at temperatures greater than that of the cultures, with yields of 0.80 mg L⁻¹.h⁻¹ (200 mg L⁻¹ 20 ° C), 1.07 mg L⁻¹.h⁻¹ (200 mg.L⁻¹ 30° C) and 0.97 mg.L⁻¹.h⁻¹ (300 mg.L⁻¹ 30° C) for experiments 5, 8 and 9, respectively. In view of the results, the potential of the dairy effluents in producing microalgal biomass and extracellular carbohydrates was demonstrated. The Manipulation of the reaction temperature and concentration of inoculum can be considered a viable strategy for the production of extracellular carbohydrate by the *Aphanothece microscopica* Nägeli.

Keywords: Cyanobacteria; Extracellular compounds; Culture conditions; Heterotrophic culture.

1 INTRODUÇÃO

As informações relativas aos parâmetros abióticos são fundamentais para que um sistema de cultivo de cianobactérias se torne efetivo. Para isso é necessário, o controle de crescimento, reprodução, ciclo de vida, produção de biomassa e composição química. Estes fatores são regulados por complexa interação entre parâmetros ambientais como, temperatura, inóculo e nutrientes biodisponíveis. Quando um dos fatores se torna limitante, o efeito dos demais pode ser manifestado (SHU & LUNG, 2003; XU & YUN, 2004; LEE et al., 2007; MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011; DEVI., 2012; PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

O efeito da variação do inóculo e temperatura de cultivos tem sido muito estudado, uma vez que estes fatores atuam diretamente em quase todas as fases do metabolismo, particularmente nas reações de transformação de biocompostos, taxa de crescimento, conteúdo de proteínas, cinzas, pigmentos e carboidratos (CHOPIN et al., 1991; 1995; HAFTING, 1999; MISHRA & JHA, 2009; SATPUTE et al., 2010).

Muitas cianobactérias, em condições adversas, são capazes de sintetizar um envoltório mucilaginoso, ou formarem cápsulas, que são estruturas compactas associadas à superfície celular, bem como liberarem no meio, polissacarídeos que constituem estas estruturas, durante o crescimento celular. Estes compostos são facilmente recuperados do meio e, em função de suas propriedades físico-químicas apresentam grandes perspectivas de aplicação industrial, quer na área têxtil, farmacêutica ou de alimentos, bem como agentes de despoluição (DE PHILIPPIS et al., 1998; MORENO et al. 1998; NICOLAUS et al., 1999; DOUMIT & PINOTTI et al., 2004; KAWAI et al., 2006; PARIKH & MADANWAR, 2006; DONOT et al., 2012).

Nos últimos anos, aplicações alternativas de carboidratos extracelulares produzidos por cianobactérias tem sido salientadas, como a gestão de águas residuárias e desintoxicação de meios contaminados com metais (LIU et al., 2010; MAGER & THOMAS, 2011; DONOT et al., 2012). Estes biocompostos, devido à sua natureza aniônica, apresentam grande capacidade de interagir fortemente com cátions, tendo importante desempenho no sequestro ou imobilização de íons metálicos quer essenciais ou perigosos para as cianobactérias (DE PHILIPPIS et al., 1998).

Muitos são os trabalhos disponíveis, que discutem o tema produção de carboidratos extracelulares por cianobactérias tendo como cultivo águas residuárias oriundas dos mais diversificados processos industriais (DE PHILIPPIS et al., 1998; LEE

et al., 2000; HIRASHI et al., 2002; LIU et al., 2010; MAGER & THOMAS, 2011; DONOT et al., 2012). No entanto, no que se refere em especial a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli a literatura disponível não tem contemplado qualquer informação sobre o tema produção de carboidratos extracelulares. Este micro-organismo tem sido estudado sobre diferentes aspectos, cultivado em diferentes efluentes gerados pela indústria alimentícia, tais como frutas, parboilização do arroz, pescado, laticínio (QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al. 2005; SILVA et al., 2006; JACOB-LOPES, 2007; BASTOS et al., 2009; ZEPKA et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2011; VIEIRA-GUERRA et al., 2012).

Na linha de pesquisa que envolve a produção de compostos celulares por esta cianobactéria, importantes resultados têm sido obtidos, como produção de proteína (QUEIROZ et al., 2004; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; HORNES et al. 2008), aminoácidos (ZEPKA et al., 2010), ácidos graxos (QUEIROZ et al. 2006; QUEIROZ et al., 2011; QUEIROZ et al., 2007a; b; c; ZEPKA et al. 2007; ZEPKA et al. 2010), carboidratos (ZEPKA et al. 2007; HORNES et al. 2008); pigmentos (JACOB-LOPES et al. 2006; HORNES et al., 2010).

Em face disto, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da temperatura e inóculo na cinética de crescimento *Aphanothece microscopica* Nägeli, bem como na produção de carboidratos extracelulares, quando cultivada no efluente de laticínios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

2.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSMAN92), cedidas pela Unidade de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio Grande, isoladas do estuário da cidade de Rio Grande, RS, Brasil, foram cultivadas e mantidas em meio BG-11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por Rippka et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 25°C e pH 7,6 (QUEIROZ et al., 2004). O cultivo foi realizado em reator de vidro em câmara otimizada quanto à luz e temperatura. Foram utilizadas lâmpadas incandescentes e fluorescentes com intensidade luminosa e temperatura controlada. A intensidade luminosa foi otimizada em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG-11 é composto por $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0,04 g.L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,075 g.L⁻¹), Na_2CO_3 (2 g.L⁻¹), $NaNO_3$ (1,5 g.L⁻¹), EDTA (0,001 g.L⁻¹), H_3BO_3 (2,86 g.L⁻¹), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,81 g.L⁻¹), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,222 g.L⁻¹), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,39 g.L⁻¹), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,079 g.L⁻¹), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,040 g.L⁻¹), $C_6H_8O_7$ (0,006 g.L⁻¹) e $FeC_6H_5O_7 (NH_4)_{22}HC_6H_5O_7$ (0,006 g.L⁻¹) (RIPPKA et al., 1979).

A concentração celular na fase exponencial para tomada dos inóculos foi determinada gravimetricamente mediante filtração de volume conhecido de meio de cultura BG-11 contendo as células do micro-organismo. A cultura foi filtrada em filtro Millipore de poro 0,45 µm, previamente seco a 60°C por 24 h. Os filtros foram secos até peso constante e a biomassa quantificada.

2.2 Efluente

A água residuária do processamento de laticínios foi utilizada como meio de cultivo. O efluente foi obtido em uma indústria de processamento de produtos lácteos (Pelotas, RS), coletado na saída do tanque de equalização da estação de tratamento de efluentes por um período de 36 meses. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e congeladas a -18°C. O efluente foi caracterizado quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (N-NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺), P-PO₄⁻³: fósforo total dissolvido; sólidos totais (ST), sólidos suspensos (SS), sólidos fixos e sólidos voláteis (SV), alcalinidade, ácidos voláteis totais (AVT), cálcio e dureza. As análises foram realizadas segundo os procedimentos descritos em Standard Methods para análise de águas e efluentes (APHA, 2005). Foi caracterizado quanto a carboidrato total pelo método fenol-sulfúrico usando glicose como padrão (DUBOIS et al., 1956). As razões C/N e N/P foram determinadas em função das concentrações de DQO, N-NTK e P-PO₄⁻³ presentes no efluente, conforme indicado por Hornes & Queiroz (2004).

2.3 Planejamento experimental

Os experimentos foram conduzidos de acordo com um delineamento fatorial completo 3² em que foram analisados os efeitos do inóculo, nos níveis 100 mg. L⁻¹, 200 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹ e temperatura de cultivo nos níveis 10°C, 20°C e 30°C sob as variáveis respostas produção e produtividade de carboidratos extracelulares bem como cinética de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata, as variáveis e níveis utilizados, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental

Tratamento	Valores reais e codificados	
	X ₁	X ₂
1	-1 (10)	-1 (100)
2	-1 (10)	0 (200)
3	-1 (10)	+1 (300)
4	0 (20)	-1 (100)
5	0 (20)	0 (200)
6	0 (20)	+1 (300)
7	+1 (30)	-1 (100)
8	+1 (30)	0 (200)
9	+1 (30)	+1 (300)

X₁: temperatura de cultivo (°C) X₂: inóculo (mg. L⁻¹).

De acordo com as resposta do planejamento experimental os efeitos de cada variável, foram calculados e as interações entre eles determinadas. As superfícies de respostas foram obtidas, através da definição de modelos empíricos, segundo a Equação 1.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Equação 1

Onde: X₁ e X₂ são os níveis codificados das variáveis independentes; β é o coeficiente de regressão (β_0 : interceptação; β_1 e β_2 : linear; β_{12} : interação e β_{11} , β_{22} : coeficientes quadráticos).

2.4 Desenvolvimento dos experimentos

Experimentos em triplicata na ausência de luz, de acordo com o planejamento experimental (Tabela 1) foram conduzidos, em reator de mistura perfeita em sistema descontínuo com capacidade de 4,5 L, constituído de uma extensão cilíndrica de PVC com dimensões de 100 cm de altura e 10cm de diâmetro. O sistema de dispersão de gases do reator consistiu em um difusor de ar de 1,5 cm localizado no centro da base da coluna para promover a aeração constante e agitação do meio. A cada experimento, o efluente da indústria de laticínio foi descongelado e então esterilizado a 1,1 kgf.cm⁻² (120°C) por 15 min, para a realização dos experimentos. Os experimentos foram

conduzidos em câmara com controle de temperatura (TC-401) da marca Tecnal. No efluente previamente ajustado a pH 7,6, células de *Aphanothece microscopica* Nägeli foram inoculadas. Os experimentos foram monitorados, mediante tomada de amostras a intervalos de 4 em 4 h, filtrados em filtro Millipore de 0,45 μm e a biomassa gravimetricamente determinada, para levantamento dos dados cinéticos.

2.5 Análise dos dados cinéticos

As variáveis cinéticas velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (tg) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{\text{x/s}}$), foram determinadas conforme indicado por Levenspiel (2000). O procedimento de avaliação teve como base as equações 2, 3, 4, 5 e 6.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{equação 2})$$

onde:

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

dx: variação da concentração celular (mg. L^{-1});

dt: variação do tempo (h);

X: concentração celular (mg. L^{-1}).

Integrando-se a equação 2 obtém-se a equação 3.

$$X = X_0 e^{\mu_{\text{máx}}(\Delta t)} \quad (\text{equação 3})$$

onde:

X: concentração celular no final da fase exponencial (mg. L^{-1});

X₀: concentração celular no início da fase exponencial (mg. L^{-1});

$\mu_{\text{máx}}$: máxima velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

Δt : intervalo de tempo do crescimento exponencial (h).

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (\text{equação 4})$$

onde:

tg: tempo de geração (h);

$\mu_{\text{máx}}$: máxima velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (\text{equação 5})$$

onde:

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato em células (mg biomassa. mg S^{-1})

dX = variação da concentração celular (mg. L^{-1})

dS = variação da concentração substrato (mg. L^{-1})

$$P_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (\text{equação 6})$$

onde:

P_x : produtividade ($\text{mg. L}^{-1}\text{h}^{-1}$)

ΔX : variação da concentração final e inicial (mg. L^{-1})

Δt : diferença entre o tempo final e inicial (h)

2.6 Produção de carboidratos extracelulares

A avaliação da produção de carboidratos extracelulares foram realizadas a partir de tomadas de amostras ao longo da curva de crescimento.

2.6.1 Extração de carboidratos extracelulares

A extração dos carboidratos extracelulares foi realizada, segundo a metodologia indicada por Dueñas et al. (2003). Alíquotas de 200 mL de efluente foram centrifugadas a 4000 xg por 30 min, separando-se assim o meio de cultura da biomassa. A biomassa precipitada foi adicionado NaOH 2 N, mantendo a mistura sob agitação por 2 h. Após este período, a biomassa foi descartada e o sobrenadante foi tratado com excesso de etanol (3 v/v) por 24 h a 4°C, para que ocorresse a precipitação dos carboidratos extracelulares. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75 %.

2.6.1.1 Quantificação de carboidratos extracelulares

Após a extração dos carboidratos extracelulares, estes foram analisados quanto a concentração de carboidratos totais quantificados espectrofotometricamente pelo método fenol-sulfúrico usando glicose como padrão. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H_2SO_4 concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor alaranjada (DUBOIS et al., 1956).

2.7 Análise Estatística

Na análise estatística foram considerados os efeitos das variáveis, avaliados por meio do Gráfico de Pareto e Tabela de efeitos. O modelo (regressão) gerado, conforme Equação 1 foi avaliado por meio de análise de variância (ANOVA) e sua validade ou grau de ajuste determinado por meio de teste F, que consiste em relacionar o valor de F calculado (F_{calc}) com o valor de F tabelado (F_{Tab}), se o valor de F_{calc} pela ANOVA for maior que o F_{Tab} , a regressão obtida ajusta os pontos experimentais de forma satisfatória, validando o modelo no intervalo de confiança estudado (MYERS & MONTGOMERY, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do efluente

O caráter quali-quantitativo da água residuária do processamento de laticínio, é dependente da planta de processamento e consequente unidades de processamento, resultando em um efluente com alta carga orgânica, lactose e sais minerais (DEMIREL et al., 2005; FRAPPART et al., 2006; VOURCH et al., 2008; MARKOU & GEORGAKAKIS et al., 2011; CHEN & LIU et al., 2012). Esta constatação se reflete nos resultados expressos na Tabela 2. Avaliando estes resultados, pode-se verificar a alta variabilidade nos valores obtidos para os parâmetros avaliados, principalmente ao que se refere a DQO, N-NTK e sólidos.

Tabela 2. Caracterização do efluente da indústria de laticínios

Parâmetros	Máximos	Mínimos	Média	CV (%)
pH	9,75	6,5	9,05	0,18
NTK (mg. L ⁻¹)	57,27	26,05	42,60	35,13
DQO (mg. L ⁻¹)	2186	677,9	1230	40,30
N-NH ₄ ⁺ (mg. L ⁻¹)	8,0	3,63	5,25	2,36
P-PO ₄ ⁻³ (mg. L ⁻¹)	5,97	2,26	4,98	22,10
Alcalinidade (mg. L ⁻¹)	336	287,5	619,30	32,70
AVT (mg. L ⁻¹)	252	180	253	14,30
Cálcio (mg. L ⁻¹)	103,04	28,43	83,83	26,41
Dureza (mg. L ⁻¹ (CaCO ₃) ⁻¹)	54,70	31	37,65	27,30
SS (mg. L ⁻¹)	540	332	437,1	20,12
ST (mg. L ⁻¹)	2725	1810	2187	27,73
SF (mg. L ⁻¹)	2402	580	1257	35,68
SV (mg. L ⁻¹)	1650	675	930	43,12
Carb. Totais (mg. L ⁻¹)	635,5	358,3	601,7	28,75
Glicose (mg. L ⁻¹)	54,75	23,78	47,51	19,70
Lactose (mg. L ⁻¹)	72,78	30,75	60,50	30,15
Sacarose (mg. L ⁻¹)	70,91	29,18	51,54	29,45
Maltose (mg. L ⁻¹)	48,73	16,30	34,54	30,10
Frutose (mg. L ⁻¹)	66,80	25,87	47,50	29,50
C/N	25	17,3	22,09	36,42
N/P	14,2	6,3	9,7	33,60

pH: potencial hidrogeniônico NTK: nitrogênio total Kjeldahl; DQO: demanda química de oxigênio; N-NH₄⁺: nitrogênio amoniacal; P-PO₄⁻³: fósforo; AVT: ácidos voláteis totais; SS: sólidos suspensos; ST: sólidos totais; SF: sólidos fixos; SV: sólidos voláteis; Carboidratos. Dados amostrais referentes há 36 meses. Dados obtidos a partir de 20 repetições

A produção de efluentes líquidos, se dá de forma intermitente, apresentando variações de vazão horárias e sazonais, de acordo com o ciclo de produção (DEMIRIEL et al., 2005; HAMDANI et al., 2005; ARVANITTOYANNIS & KASSAVETI, 2008;

JANCZUKOWITCZ et al., 2008), o que justifica os altos coeficientes de variação registrados.

O perfil descrito pelos componentes que caracterizam o efluente em análise é muito próximo ao reportado pela literatura. Notadamente constituído, por matéria orgânica biodegradável, lactose, sólidos, nitrogênio e fósforo (BANU et al., 2008; VOURCH et al., 2008; KAEWSUK et al., 2010; FARIZOGLU & UZUNER, 2011; CHEN & LIU et al., 2012).

Salienta-se, quanto aos valores de N-NTK máximo de 57,27 mg. L⁻¹ e mínimo de 26,05 mg. L⁻¹, o fato destas concentrações serem baixas quando comparadas a outros efluentes agroindustriais, como o efluente da parboilização do arroz e da indústria da pesca (QUEIROZ et al., 1998; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; ZEPKA et al., 2007; QUEIROZ et al., 2011). Esta constatação torna-se interessante, no momento em que se visa a produção de exopolissacarídeos, considerando-se que a maioria dos estudos que tratam dos fatores que dizem respeito à produção desses biocompostos por cianobactérias se referem a deficiência de nitrogênio, como estímulo para produção destes compostos por estes micro-organismos (SUTHERLAND, 1998; DE PHILIPPIS & VINCENZI, 1998; DOUMIT & PINOTTI et al., 2004; KAWAI et al., 2006).

De acordo com Aguilar et al. (2002) a concentração em sólidos voláteis, representa uma boa aproximação da quantidade de matéria orgânica presente em uma água residuária. Tomando como base este princípio, bem como os dados expressos na Tabela 2, é possível estimar, que importante fração dos constituintes orgânicos do efluente, é composta por carboidratos, com predominância de lactose e sacarose. Arvanitoyannis & Kassaveti (2008) reportam que entre os carboidratos de maior representação nos efluentes de laticínio, a lactose torna-se destaque, podendo ser fonte de material energético para processos biotecnológicos.

Relações de nutrientes no meio de cultura como razões C/N e N/P tem demonstrado que resultam em diferentes taxas de incorporação destes componentes nas células, influenciando na formação de produtos celulares, ou na formação de biomassa (FAY et al., 1983; PEARSON, 1990; XING et al., 2000; CAMPOS et al., 2002; SUNG & LIU, 2003; LEE et al., 2007; QUEIROZ et al., 2007). Assim, razões C/N 20, têm sido indicadas para o crescimento de micro-organismos em geral (FAY, 1983) e razões de 10 a 16 de N/P, foram consideradas favoráveis para o crescimento de cianobactérias (PEARSON, 1990).

Neste trabalho, as razões C/N e N/P calculadas a partir dos valores médios de DQO, N-NTK, e fósforo como $P-PO_4^{-3}$ foram respectivamente 22,09 e 9,7. Estes valores fazem deste efluente uma fonte em potencial de nitrogênio e fósforo para produção de compostos celulares a partir do cultivo de cianobactérias (FAY et al., 1983; PEARSON et al., 1990; QUEIROZ et al. 1998; QUEIROZ et al. 2004; QUEIROZ et al. 2007).

3.2 Produção de carboidratos extracelulares

3.2.1 Avaliação da cinética de crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli

O comportamento cinético para a *Aphanothece microscopica* Nägeli, cultivada no efluente de laticínio a diferentes temperaturas e concentrações de inóculos, podem ser avaliados nas Figuras 1, 2 e 3. Em se tratando da avaliação de carboidratos extracelulares, de acordo com Lee et al. (2007) a avaliação da cinética de crescimento é um procedimento fundamental, para assegurar que o carboidrato quantificado seja inerente as células viáveis e não a lise celular.

Segundo Pelczar et al. (2007) a curva de crescimento de um sistema fechado de cultivo, é definida por três fases, correspondentes a um período inicial (fase lag), na qual não há um aumento da concentração celular, seguido por um crescimento exponencial (fase log), onde a maior taxa de crescimento celular é registrada, até ao momento, que ocorre o esgotamento do meio de cultura e a biomassa aumenta apenas gradativamente ou permanece constante (fase estacionária). Na fase estacionária, ocorre a lise celular, liberando novos substratos, que serve de fonte de energia, para manter o crescimento lento dos micro-organismos que sobrevivem. O processo termina, quando o número de células viáveis diminui em função da mortalidade, cuja taxa aumenta progressivamente, decrescendo paralelamente a produção de biomassa, devido a autólise sobre ação de enzimas da própria célula. Observa-se pela análise das Figuras 1, 2 e 3, nitidamente, o efeito da temperatura e da concentração do inóculo na definição das fases de crescimento, com máximos de duração da fase logarítmica de 8 h, com registro da fase de declínio de uma forma geral após um tempo de residência de 20 h.

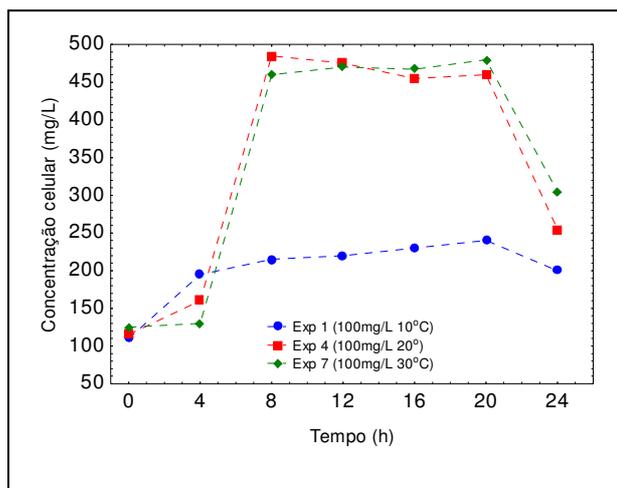


Figura 1. Curvas de crescimento para culturas de *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de 100 mg.L⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.

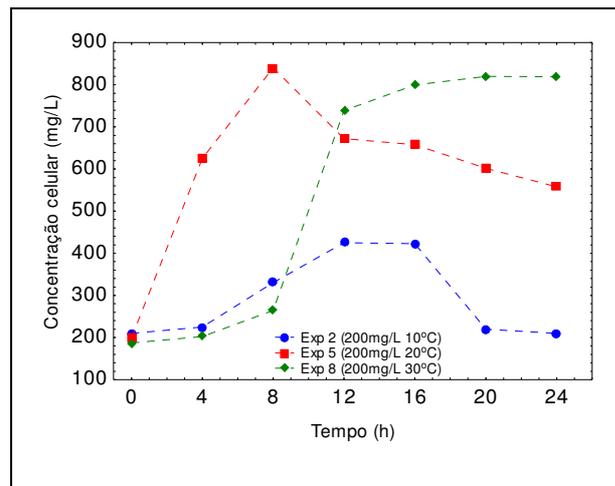


Figura 2. Curvas de crescimento para culturas de *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de 200 mg.L⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.

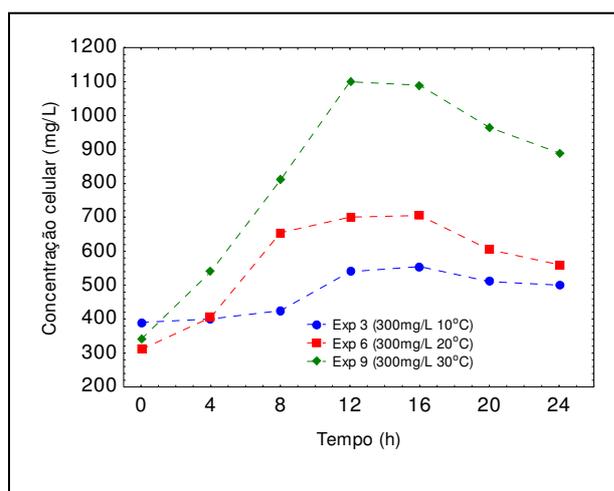


Figura 3. Curvas de crescimento para culturas de *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de 300 mg.L⁻¹ de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C.

Este rápido crescimento é típico de cianobactérias cultivadas no efluente de indústrias de alimentos, o que demonstra a capacidade destes micro-organismos em removerem e assimilarem heterotroficamente compostos orgânicos e inorgânicos de efluente (GUERRERO et al., 1999; OGBONNA et al., 2000; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; HORNES & QUEIROZ, 2004; QUEIROZ et al., 2007). O comportamento descrito pelas curvas de crescimento indicam que o tempo de detenção

celular de 24 h foi suficiente para definir o crescimento da cianobactéria em estudo, quando cultivado no efluente da indústria de laticínio.

A análise dos perfis de crescimento celular sugere que em temperaturas de 30°C, independente do inóculo são obtidas maiores densidades celulares, embora em cultivos conduzidos a 20°C a multiplicação celular ocorre de forma mais rápida. Temperaturas de 10°C foram adequadas ao cultivo da *Aphanothece microscopica* Nägeli, ainda que nessas condições o efeito adverso causado por reduzidas temperaturas da reação biológica tenha sido notadamente verificado. Nos cultivos realizados nesta temperatura o crescimento celular foi inferior quando comparados com os cultivos a 20°C e 30°C, independente das concentrações de inóculos estudados. Conforme pode ser observado, os experimentos a 10°C apresentaram aumento da concentração celular. Contudo, este aumento não foi suficiente para indicar um crescimento exponencial, o que evidencia o efeito da temperatura, se fazendo necessário nestas condições de um período maior de adaptação para atingir o máximo crescimento.

O comportamento das curvas de crescimento, variam de um micro-organismo para outro, em função das condições do meio, idade do inóculo, bem como seu estado fisiológico (MEEKS & CASTENHOLZ, 1971). Pode-se observar nas Figuras 1, 2 e 3 que as curvas de crescimento de *Aphanothece microscopica* Nägeli foram diferentes para cada experimento realizado, o que se reflete nas variáveis de cinéticas registradas (Tabela 3).

A avaliação da cinética de crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria de laticínios pode ser avaliada na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de crescimento

Parâmetros	Experimentos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
X_{\max} (mg.L ⁻¹)	240	335	540	485	841	850	460	1045	1100
TR (h)	12	12	12	8	4	8	8	6	12
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,0186	0,0405	0,0375	0,0799	0,36	0,1261	0,163	0,25	0,0982
tg (h)	37,27	17,11	18,48	3,86	1,92	5,50	4,25	2,77	7,06
$Y_{X/S}$ (mg _{biomassa} /mg _{N-NTK})	21,21	13,63	11,26	8,43	101,7	8,12	25,73	44,52	29,25
P_X (mg.L ⁻¹ h ⁻¹)	4,16	10,41	11,67	46,25	160,2	67,50	41,9	136,7	63,33
Produção Carb. Extracelulares (mg.L ⁻¹)	6,40	9,06	5,63	6,05	15,30	12,23	8,71	17,00	17,27

X_{\max} : concentração máxima de biomassa; TR: tempo de residência celular; μ_{\max} : velocidade específica de crescimento máxima; tg: tempo de geração; $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em célula; P_X : produtividade de biomassa; Produção de carboidratos extracelulares. Média de 27 experimentos em triplicata cada. Experimentos: 1 (10°C, 100 mg. L⁻¹), 2 (10°C, 200 mg. L⁻¹), 3 (10°C, 300 mg. L⁻¹), 4 (20°C, 100 mg. L⁻¹), 5 (20°C, 200 mg. L⁻¹), 6 (20°C, 300 mg. L⁻¹), 7 (30°C, 100 mg. L⁻¹), 8 (30°C, 200 mg. L⁻¹) e 9 (30°C, 300 mg. L⁻¹).

Os dados cinéticos obtidos demonstram o potencial desta água residuária como meio de cultura para a produção de biomassa e compostos celulares, a julgar pelas concentrações celulares registradas, principalmente para o experimentos 8 (200 mg. L⁻¹ de inóculo a 30°C), em curto tempo de geração (2,77 h), com importante produção em carboidrato extracelular (17 mg. L⁻¹) em um tempo de residência de apenas 6 h. Estes valores são substancialmente superiores se comparados às águas residuárias do processamento do pescado e parboilização do arroz (HORNES et al., 2010; QUEIROZ et al., 2007), o que evidencia a potencialidade do uso de resíduos agroindustriais para suportar a produção de biomassa microalgal.

Ainda analisando a Tabela 3, pode-se verificar que as maiores concentrações de biomassa, correspondem as maiores concentrações de inóculo e temperatura de cultivo, atingindo valores de até 1045 mg. L⁻¹ e 1100 mg.L⁻¹ nos cultivos realizados sob as condições dos experimentos 8 (200 mg.L⁻¹ e 30°C) e experimentos 9 (300 mg.L⁻¹ e

30°C), respectivamente. No entanto, no experimento 5 (200 mg. L⁻¹ 20°C), as maiores velocidades específica de crescimento (0,36 h⁻¹), e menores tempo de geração (1,92 h) e maior consumo de substratos, evidenciando o efeito da temperatura da reação biológica na conversão dos poluentes em biomassa. Os experimentos à temperatura de 30°C e 200 mg. L⁻¹ apresentaram velocidade máxima específica de crescimento de 0,25 h⁻¹ sendo este valor substancialmente superior ao obtido por HORNES & QUEIROZ (2008), para o efluente do processamento do pescado e QUEIROZ et al. (2007), para o efluente da parboilização do arroz que foram de 0,04 h⁻¹ e 0,11 h⁻¹, respectivamente.

No que se refere aos experimentos conduzidos à temperatura de 10°C com inóculo 100 mg. L⁻¹, 200 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹ verifica-se os menores valores para velocidade específica de crescimento (0,0186 h⁻¹, 0,0405 h⁻¹ e 0,0375 h⁻¹) e maiores tempos de geração (37,27 h, 17,11 h e 18,48 h), mostrando que a redução da temperatura afetou diretamente o crescimento celular.

Os resultados das variáveis cinéticas (Tabela 3) ainda indicam, que independente da temperatura os cultivos com concentração inicial de inóculo de 200 mg. L⁻¹ apresentaram os melhores resultados, com tempos de geração baixos e velocidades específicas de crescimento elevadas, seguidos dos cultivos com inóculos de 300 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, ficando demonstrado que tanto o inóculo como a temperatura de cultivo influenciaram no crescimento do micro-organismo em estudo. Esta constatação é melhor elucidada na Figura 4.

A análise da Figura 4 evidencia, que não só a temperatura exerce influência no crescimento celular, considerando que tanto este fator como o inóculo possui efeito significativo na produtividade de biomassa, assim como a interação dos fatores ($p \leq 0,05$). Ficou demonstrado ainda um efeito maior do inóculo sob a resposta produtividade de biomassa quando comparado com o efeito da temperatura de cultivo.

O efeito da temperatura no crescimento de cianobactérias tem sido estudado por outros autores, que reportam melhor crescimento em temperaturas de 30°C a 35°C, tais como Martínez et al. (2000), Mathiensen et al. (1999) e Bastos et al. (2002) entre outros. A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, foi avaliada por Bastos et al. (2002), quando cultivada no efluente da parboilização do arroz, sendo registrado maior crescimento celular a 35°C. O efeito da temperatura é corroborada com o trabalho de Matthiensen et al. (1999), que estudaram ao longo de doze meses florações de cianobactérias na região estuarina da Lagoa dos Patos e verificando que o valor máximo

alcançado foi de $1,3 \cdot 10^6$ células.L⁻¹ em dezembro e o mínimo de $1,5 \cdot 10^5$ células.L⁻¹ em agosto, demonstrando o efeito da temperatura no crescimento do micro-organismo.

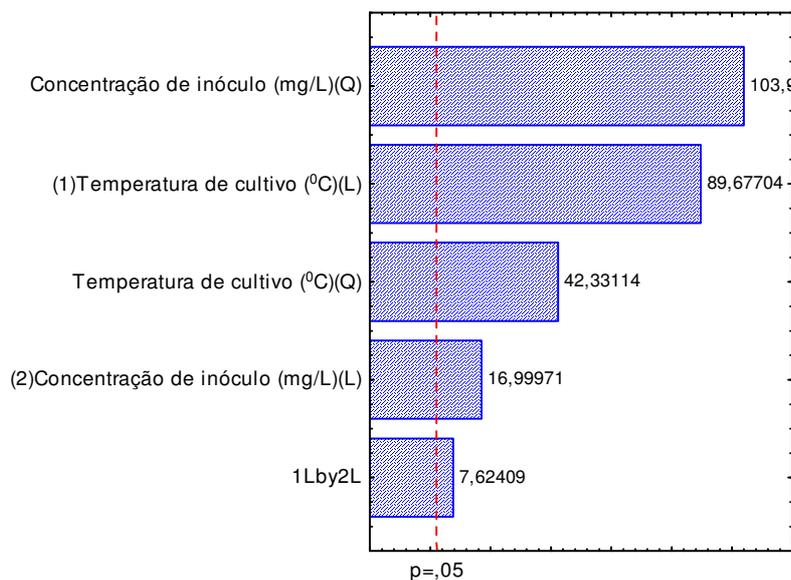


Figura 4. Gráfico de Pareto para a resposta produtividade de biomassa de *Aphanothece microscopica* Nægeli, para nível de significância de 5%.

No que se refere a produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nægeli, ficou demonstrado que utilizando 200 mg. L⁻¹ se obteve as maiores concentrações independente da temperatura utilizada, (experimentos 5, 8 e 9). Concentrações na ordem de 15,97 mg. L⁻¹, 17 mg.L⁻¹, 17,27 mg.L⁻¹, foram quantificadas respectivamente. Pode-se constatar ainda, que as maiores concentrações de carboidratos extracelulares, correspondem as concentrações máximas de biomassa (experimentos 8 e 9), não havendo diferença significativa entre as concentrações de carboidratos entre estes experimentos, ao nível de significância de 5 % (Tabela 4).

3.3 Comportamento da produção de carboidratos extracelulares

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam o comportamento da produção de carboidratos extracelulares nos experimentos realizados ao longo do tempo de cultivo. Observa-se que as maiores concentrações foram registradas, quando foi utilizada, a temperatura de 30°C, independente da concentração do inóculo. Concentrações em torno de 17 mg. L⁻¹, foram obtidas. Considerando os baixos tempos de residência registrados, este resultado é bastante promissor, se comparado a dados da literatura, como no trabalho de Chi et al. (2007). Estes autores, avaliaram a produção de carboidratos extracelulares por

Cyanothece sp. em condições fotossintéticas, registrando uma produção de $22,34 \text{ mg. L}^{-1}$ em 11 dias de cultivo.

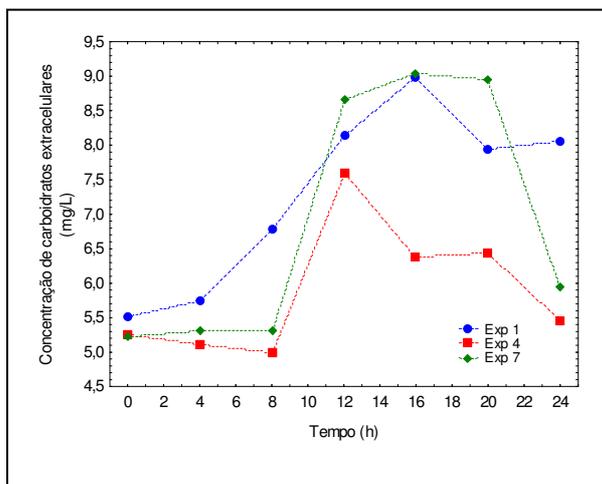


Figura 5. Comportamento da concentração de carboidratos extracelulares ao longo do tempo de cultivo a partir de 100 mg.L^{-1} de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C .

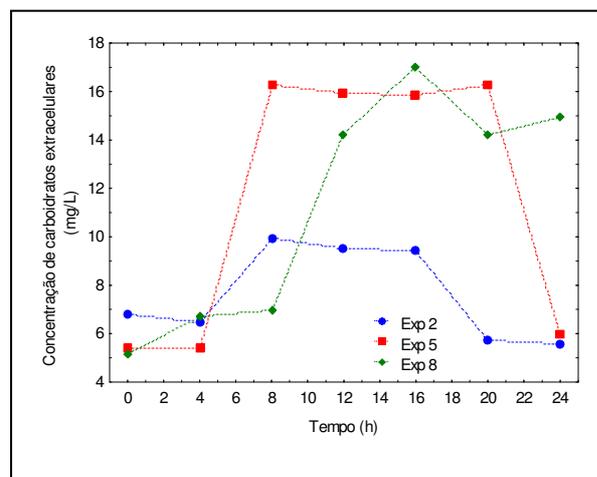


Figura 6. Comportamento da concentração de carboidratos extracelulares ao longo do tempo de cultivo a partir de 200 mg.L^{-1} de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C .

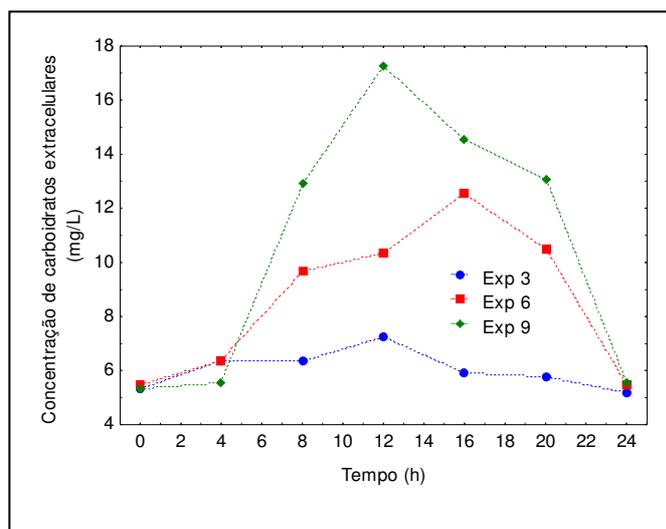


Figura 7. Comportamento da concentração de carboidratos extracelulares ao longo do tempo de cultivo a partir de 300 mg.L^{-1} de inóculo nas temperaturas de cultivos 10, 20 e 30°C .

O comportamento descrito pelas Figuras 5, 6 e 7 indicam que as maiores concentrações de carboidratos foram obtidas nas fases estacionárias de crescimento, independente do inóculo e temperatura de cultivo, evidenciando que a depreciação nutricional ocasionada por esta fase de crescimento estimulou a excreção de carboidratos. Demonstra ainda que na fase de desaceleração do crescimento (após 20 h

de cultivo), os carboidratos extracelulares são consumidos e reduzidos a valores em torno de 5 - 6 mg. L⁻¹ devido a manutenção do metabolismo.

A produção de carboidratos por *Aphanothece microscopica* Nägeli pode ser favorecida pelo meio de cultivo utilizado, uma vez que o efluente de laticínio apresenta em sua composição de uma forma geral, elevado teor de carbono (1500 -3000 mg. L⁻¹) e baixo teor de nitrogênio (16,5 mg. L⁻¹ – 113,18 mg. L⁻¹) favorecendo a síntese e excreção desses biocompostos (VASHITZ & SHEINTUCH, 1991; SARKAR et al., 2005; JANCZUKOWICHZ et al., 2007; BANU et al., 2008; KAEWSUK et al., 2010; KUSHAWHA et al., 2010). Na Tabela 2 podemos verificar os registros médios para estes constituintes na água residuária utilizada (1230 mg. L⁻¹ e 42,60 mg. L⁻¹ para DQO e N-NTK respectivamente), concentrações estas que compreende o intervalo disponível na literatura. De acordo com Namboodiri et al. (2006) em geral o tipo e a concentração da fonte de nitrogênio, influência no fluxo de carbono, bem como na formação de produtos celulares e biomassa. O efluente de laticínio caracteriza-se por apresentar altas concentrações de matéria orgânica e deficiência em nitrogênio o que pode resultar em altas razões C/N, aumentos na razão C/N, favorece um acúmulo de carboidratos extracelulares (PAPA et al., 2000; NAMBOODIRI et al., 2006).

Em geral no desenvolvimento destes bioprocessos, procuram utilizarem-se meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento como para o acúmulo de carboidratos extracelulares (DAVIDSON, 1978). A utilização de efluentes agroindustriais além de fornecer substratos alternativos, a baixo custo minimiza problemas ambientais causados pelo seu descarte no meio ambiente, transformando um resíduo poluente em um subproduto de maior valor agregado (PANDEY et al., 1999; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007).

A análise dos perfis de crescimento celular (Figuras 1, 2 e 3) e concentração de carboidratos extracelulares (Figuras 5, 6 e 7) sugerem que em temperaturas de 30°C são obtidas maiores concentrações celulares (1100 mg. L⁻¹) bem como concentração de carboidratos extracelulares (aproximadamente 17 mg. L⁻¹), quando utiliza-se inóculo 200 mg. L⁻¹. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que, segundo Casas et al. (2000) o crescimento da biomassa e a produção de biopolímeros aumentam com a temperatura, rendendo um máximo em 28°C e que esses estão parcialmente associados ao aparecimento de metabólitos e suas produções são baixas quando o crescimento e a concentração de biomassa também estão baixos.

Os resultados demonstraram que as maiores produções de carboidratos extracelulares por *Aphanothece* são registradas nos cultivos em que foram obtidos as maiores concentrações de biomassa. Com isso, foram selecionados os experimentos que apresentaram esta característica, experimentos 5 (200 mg. L⁻¹ e 20°C), experimento 8 (200 mg. L⁻¹ 30°C) e experimento 9 (300 mg. L⁻¹ 30°C) com concentrações de 15,97 mg. L⁻¹, 17,00 mg.L⁻¹ e 17,27 mg.L⁻¹, respectivamente. Com relação aos experimentos 5 (200 mg. L⁻¹ 20°C), verifica-se um crescimento rápido de células em um curto período (4h), no entanto, não são registrados aumentos significativos na concentração de biomassa, o que se reflete em menor produção de carboidratos extracelulares (15,97 mg. L⁻¹), quando comparado aos experimentos 8 (17,00 mg. L⁻¹) e experimentos 9 (17,27 mg. L⁻¹). Lee et al. (2007), verificaram que a produção de carboidratos extracelulares dependem da concentração de biomassa e que a produção desses biocompostos diferem entre as fases de crescimento.

A Tabela 4 apresenta a análise de diferenças de média segundo o teste de Tukey a nível de confiança de 95 %, para os valores médios de carboidratos extracelulares no que se refere aos experimentos 5, 8 e 9.

Tabela 4. Diferenças de médias pelo teste de Tukey entre os valores médios de carboidratos registrados nos experimentos 5, 8 e 9

Experimento	5	8	9
	*15,97	*17,00	*17,23
5		0,000249	0,000237
8	0,000249		0,542444
9	0,000237	0,542444	

Experimento: 5 (200 mg. L⁻¹ 20°C), 8 (200 mg. L⁻¹ 30°C) e 9 (300 mg. L⁻¹ 20°C); *valores médios da produtividade de carboidratos extracelulares para os experimentos 5, 6 e 8. $p \leq 0,05$ apresenta diferença significativa entre os valores médios de carboidratos extracelulares.

Analisando-se a Tabela 4 verifica-se notadamente haver diferenças, ao nível de 5 % de significância, entre as médias das concentrações de carboidratos extracelulares registradas para os experimentos 5 e 8. Os experimentos utilizando inóculo 300 mg. L⁻¹ e 20°C não apresentam diferença estatisticamente definida dos experimentos com inóculos 200 mg.L⁻¹, nas temperaturas de 20°C, experimentos 8, 9 e 5, respectivamente. Isto fica evidenciado pelos dados apresentados na Tabela 3, velocidades específicas de crescimento obtidas nos experimentos 8 ($\mu_{m\acute{a}x}$. 0,25 h⁻¹) cerca de 3 vezes maior quando comparado com o experimento 9 (0,09 h⁻¹), no entanto, apesar dos experimentos 5

apresentarem as maiores velocidades específica de crescimento ($0,36 \text{ h}^{-1}$), estes apresentaram diferenças nas concentrações de carboidratos extracelulares em relação aos experimentos 8 e 9, portanto, menores concentrações deste biocompostos foram registrados nestas condições. Sendo assim, quando se visa a associação de produção de biomassa microalgal com produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece*, nas condições avaliadas foi possível constatar que a melhor condição foram dos experimentos 8 ($200 \text{ mg. L}^{-1} 30^\circ\text{C}$), ao se variar, temperatura de cultivo e inóculo.

Na Tabela 5 estão expressos os resultados obtidos de produtividade de carboidratos extracelulares para os experimentos selecionados (5, 8 e 9), em que se obtiveram as melhores condições de cultivo de *Aphanothece*, avaliado pelas variáveis cinéticas (Tabela 3). As produtividades de carboidratos extracelulares foram calculadas com base nos tempos de cultivos em que se obtiveram as maiores concentrações de carboidratos (experimentos 5 e 8), conforme expresso na Figura 6. As maiores produções de carboidratos foram obtidas em 16 h de cultivo. Para os experimentos 9 (Figura 7), as maiores produções foram registradas em 12 h.

Tabela 5. Produtividade de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli para os experimentos 5 ($200 \text{ mg. L}^{-1} 20^\circ\text{C}$), 8 ($200 \text{ mg. L}^{-1} 30^\circ\text{C}$) e experimento 9 ($300 \text{ mg. L}^{-1} 30^\circ\text{C}$) em função do tempo de cultivo

	Experimentos					
	5		8		9	
	$t_{(0 \text{ h})}$	$t_{(12 \text{ h})}$	$t_{(0 \text{ h})}$	$t_{(12 \text{ h})}$	$t_{(0 \text{ h})}$	$t_{(12 \text{ h})}$
*Concentração de carboidratos totais (mg.L^{-1})	5,43	15,01	5,14	17,97	5,30	17,26
Produtividade ($\text{mg L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,80 ^a		0,98 ^b		0,99 ^b	

$t_{(0 \text{ h})}$: concentração de carboidratos nas culturas no tempo 0 h. $t_{(16 \text{ h})}$: concentração de carboidratos nas culturas no tempo 16 h. Letras diferentes significam haver diferença estatística ao nível de 5 %, após teste Tukey.

Os resultados demonstram que as maiores produtividades ocorrem a 30°C (experimento 8 e 9) perfazendo $0,98$ e $0,99 \text{ mg L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 12 h de cultivo, respectivamente. No experimento 5 ($200 \text{ mg. L}^{-1} 20^\circ\text{C}$), foi registrado $0,80 \text{ mg L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, indicando haver diferença estatística, ao nível de 5 %, quanto aos resultados das produtividade de carboidratos (experimentos 8 e 9), são comparados. Para os experimentos conduzidos nas condições do experimento 9 ($300 \text{ mg. L}^{-1} 30^\circ\text{C}$), a velocidade específica de crescimento celular nestas condições foi de $0,09 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 3)

substancialmente inferior quando comparada à velocidade específica, registrada para o micro-organismo cultivados segundo as condições do experimento 8 (200 mg. L⁻¹ 30°C) (0,25 h⁻¹). A partir destes dados, pode-se constatar que os experimentos 8 (produtividades de carboidratos de 0,98 mg L⁻¹. h⁻¹), podem serem os mais adequados quando se visa a associação de produção de biomassa microalgal com produção de carboidratos extracelulares. Esses resultados estão de acordo com Lee et al. (2007) em que verificaram que o rendimento destes tipos de carboidratos aumentavam à medida que a temperatura da cultura aumentava 10-25°C. A maior quantidade foi obtido nos cultivos a 25°C (1,2 g.L⁻¹). Estes autores constataram ainda, que as maiores produções de carboidratos extracelulares não foram nos cultivos que apresentaram maior produtividade em biomassa, o que está de acordo com os dados expressos na Tabela 3. Resultados semelhantes para a produção de carboidratos extracelulares foram relatados a partir de cultura de *Agrocybe cylindracea* (LEE et al., 2004) e *Grifola frondosa* (NGUYEN et al., 2012).

3.3.1 Efeitos e influência dos fatores temperatura e inóculo na produção de carboidratos extracelulares

Os resultados dos efeitos e interações entre os fatores, temperatura de cultivo e inóculo, na produção de carboidratos extracelulares são expressos na Figura 8.

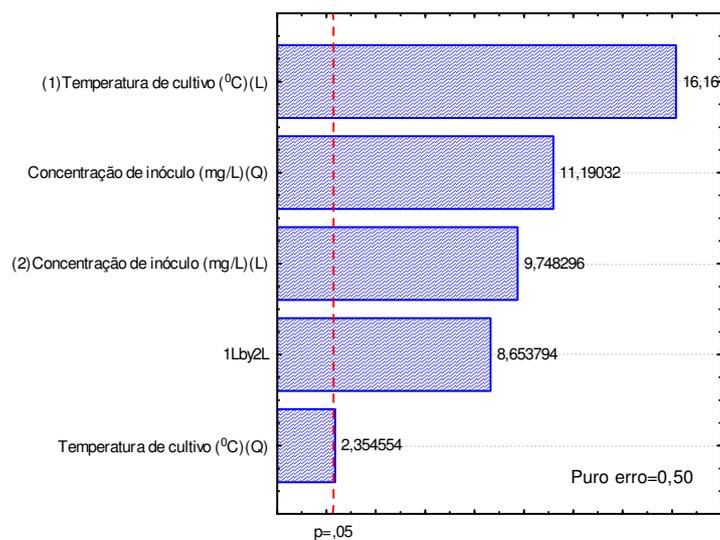


Figura 8. Gráfico de Pareto para resposta produção de carboidratos extracelulares produzidos *Aphanothece microscopica* Nægeli, para o nível de significância de 5%.

Avaliando os dados expressos na Figura 8, observa-se que as variáveis inóculo e temperatura de cultivo apresentam efeitos significativos sob a resposta produção de carboidratos, sendo o maior efeito atribuído a temperatura. São observados efeitos positivos sobre a resposta produtividade de carboidratos, tanto pela temperatura, como inóculo, bem como por suas interações. Isso justifica as elevadas produções de carboidratos, nas maiores temperaturas e concentrações de inóculo (Tabela 3), bem como o registrado nas Figuras 6 (experimentos 5 e 8) e Figura 7 (experimentos 6 e 9). Isso evidencia a habilidade da *Aphanothece microscopica* Nægeli em produzir carboidratos extracelulares nas condições avaliadas.

A temperatura é fator fundamental no desenvolvimento de bioprocessos devido aos seus efeitos nas atividades metabólicas de cianobactérias e micro-organismos em geral. Nesse sentido, a temperatura pode ser mantida e manipulada a níveis ótimos a fim de maximizar a produtividade tanto no crescimento microalgal como na produção de biocompostos (GARZA-SÁNCHEZ et al., 2000; HORNES et al., 2010; PARMAR et AL., 2011; DONOT et al., 2012). Para a maioria das espécies microalgais, a temperatura ótima esta em torno de 25°C e 30°C .

Para o desempenho das atividades metabólicas dos micro-organismos, há uma interação de diferentes fatores, o que justifica o grau de significância dos fatores expressos na Figura 8. Temperaturas elevadas, superiores aos valores ótimo, ocasionam o decréscimo, em níveis bioquímicos, das assimilações de carbono e nitrogênio,

decrecendo conseqüentemente os compostos de carbono (LEVY et al., 1990; MACLER & ZUPAN, 1991).

Shu & Yang (1990) reportam que o melhor intervalo de temperatura para o crescimento celular situa-se entre 24-27°C, enquanto que para a produção de biopolímeros, a temperatura deve se situar entre 30-33°C. Para os resultados obtidos no presente trabalho, tomando como base estes autores, observa-se, que se os experimentos visassem somente avaliar a produção de biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli a temperatura indicada seria 20°C. No entanto, como o objetivo foi avaliar a maior produção de carboidratos extracelulares, 30°C é a temperatura que contempla os objetivos traçados.

O efeito da variável inóculo sob a resposta produção de carboidratos, também foi significativo ($p \leq 0,05$) e positivo, no entanto, esta variável apresentou um menor efeito sob a resposta.

A Equação 1 representa o modelo empírico obtido a partir da análise de regressão para a resposta produção de carboidratos utilizando variável temperatura de cultivo e inóculo, considerando os efeitos significativos e interação dos fatores em estudo na forma codificada (Tabela 1). Verifica-se bom ajuste do modelo aos dados experimentais, expresso pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,97$) registrado, validando assim, os modelos como significativo ao nível de confiança de 95 %.

$$10,70278+7,3150.X_1+0,59083.X_1^2+4,66167.X_2 + 4,53583.X_2^2+4,83250.X_1X_2 \quad \text{Equação 1}$$

$$R^2=0,97$$

A validação do modelo é confirmada pelo valor de F (Tabela 6), indicando que o modelo proposto se ajusta aos dados experimentais, para a resposta produção de carboidratos. Considerando a alta relação apresentada para os valores de F calculado e F tabelado e o índice de significância apresentado, é possível expressar o modelo como significativo e preditivo.

Tabela 6. Análise de variância para a resposta produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli

	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{critico}
Regressão	330	5	66,15	52,12	3,11
Resíduo	15,23	12	1,27		
Falta de ajuste	9,93	3			
Erro puro	5,30	9			
Total	346	17			

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática. F: fonte de variação para 95 % de confiança.

A validação do modelo obtido é representada pelas Figuras 9 e 10. Observa-se que os resíduos distribuem-se de forma aleatória em torno de zero, para os valores preditos e não há a presença de outliers, respectivamente, indicando a validade de utilização da estatística F para verificar a validade do modelo e utilizar as superfícies de resposta para prever o comportamento do processo.

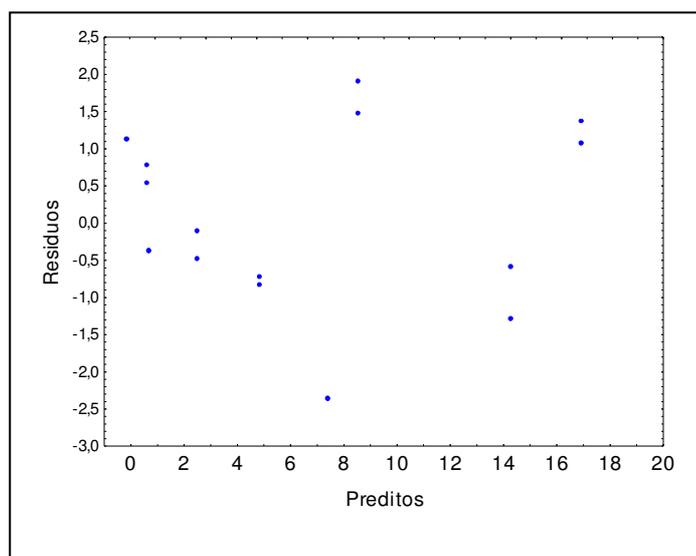


Figura 9. Gráfico dos valores preditos versus resíduos para a resposta produção de carboidratos extracelulares.

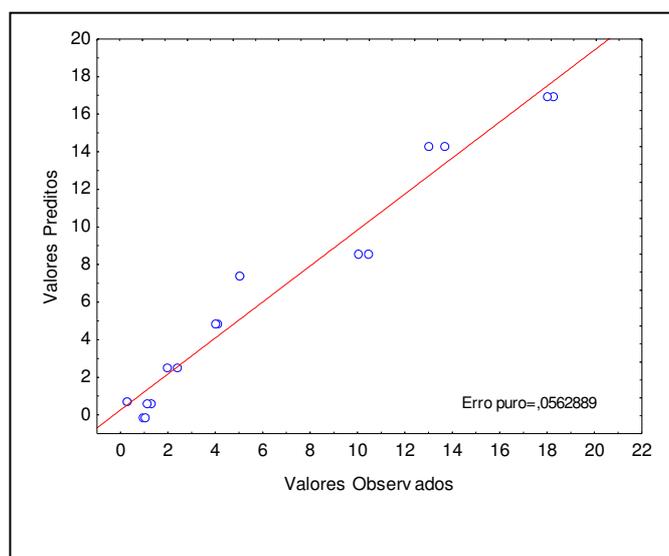


Figura 10. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta produção de carboidratos extracelulares.

Assim, segundo os dados de análise de variância (Tabela 6), verifica-se que o valor obtido para o $F_{\text{calculado}} = 52,12$ foi maior que 3 vezes o $F_{\text{critico}} = 3,11$, portanto a regressão ajusta os pontos de forma satisfatória, demonstrando que o modelo conseguiu

descrever satisfatoriamente a produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli, nas condições estudadas.

A Figura 11 apresenta o diagrama da superfície de resposta elaborado a partir do modelo de regressão, o qual mostra o comportamento da produção de carboidratos em função dos fatores em estudo descritos pela matriz do planejamento experimental (Tabela 1).

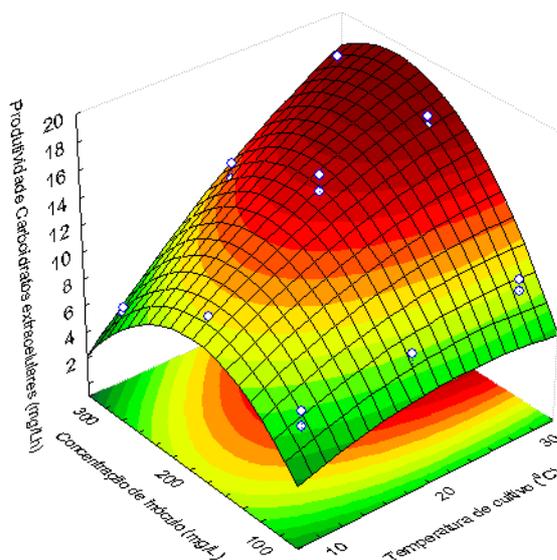


Figura 11. Superfície de resposta para produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli.

Avaliando-se a superfície de resposta obtida pelo modelo, observam-se maiores produções de carboidratos extracelulares quando foi utilizado inóculo de 200 mg. L⁻¹ de *Aphanothece microscopica* Nägeli nas temperaturas de 20°C e 30°C. Fica evidenciado que as condições dos experimentos 8 foram as mais adequadas para a produção de carboidratos extracelulares. Também se observa na Figura 11, que na temperatura inferior estudada (10°C), houve baixa produção de carboidratos extracelulares. Resultados que estes que podem ser corroborados pelos dados representados na Figura 8, em que a temperatura apresentou efeito positivo na produção dos carboidratos extracelulares, bem como o mesmo efeito registrado ao se avaliar a variável independente, inóculo nos cultivos de *Aphanothece*.

4 CONCLUSÃO

O efluente da indústria de laticínio caracterizou-se por apresentar alta variabilidade quanto aos parâmetros avaliados, se caracterizando ainda por apresentar baixa concentração em nitrogênio quando comparada a outros efluentes da indústria de

alimentos regionais o que faz dele um meio de cultivo promissor para a produção de carboidratos extracelulares.

Os resultados indicaram que *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma cianobactéria passível de produzir carboidratos extracelulares quando cultivada no efluente de laticínios.

Em termos cinéticos, a temperatura da reação biológica bem como a concentração celular afetou o crescimento celular e a produção de carboidratos extracelulares.

Os experimentos nas condições de 200 mg. L⁻¹ de inóculo e 20°C se obteve as maiores velocidades de crescimento celular, porém produção de carboidratos extracelulares menores quando comparadas aos experimentos a 30°C.

Quando foram utilizados inóculos de 200 mg. L⁻¹ e 300 mg. L⁻¹ a 30°C não foi observado diferença estatística entre as produções de carboidratos extracelulares.

A melhor condição estatisticamente definida para se obter maiores produtividades de carboidratos extracelulares foi quando utilizou-se 200 mg. L⁻¹ a 30°C.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M. I.; SÁEZ, J.; LLORÉS, M.; SOLER, A.; Ortuño, J. F. Nutrient removal and sludge production in the coagulation – flocculation process. **Water Research**, v. 36, p. 2910 - 2919, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 2005.

ARVANITOYANNIS, I.S.; KASSAVETI, A. Dairy Waste Management: Treatment Methods and Potential Uses of Treated Waste. **Waste Management for the Food Industries**, p. 801 - 860, 2008.

BANU, R.; ANANDAN, S.; KALIAPPAN, S.; YEOM, I.-T. Treatment of dairy wastewater using anaerobic and solar photocatalytic methods. **Solar Energy**, v. 82, p. 812 – 819, 2008.

BASTOS, R. G. **Remoção de matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli**. In: BASTOS, R. G. Aplicação da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no tratamento de efluentes e na produção de proteína unicelular. Rio Grande, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

BASTOS, R. G.; QUEIROZ, M. I. ALMEIDA; T. L.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. V.; PADILHA, M. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de

luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 112 - 116, 2004.

BASTOS, R.; QUEIROZ, M. I. ; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. COD removal of parboiled rice wastewater by cyanobacteria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 3, p. 245 - 250, 2009.

CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; SÁNCHEZ, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. **Water Research**, v. 36, p. 2555 - 2560, 2002.

CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: Molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 282 - 291, 2000.

CHEN, W.; LIU, J. The possibility and applicability of coagulation-MBR hybrid system in reclamation of dairy wastewater. **Desalination**, v. 285, p. 226 – 231, 2012.

CHI, Z.; SU, C.D.; LU, W.D. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1329 – 1332, 2007.

CHOPIN, T.; GALLANT, T.; DAVISON, I. Phosphorus and nitrogen nutrition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta): Effects on total phosphorus and nitrogen content, carrageenan production and photosynthetic pigments. **Journal of Phycology**, v. 31, p. 283 - 293, 1995.

CHOPIN, T.; HANISAK, M.D.; KOEHN, F.E. Effects of seawater phosphorus concentration on floridean starch content in *Agardhiella subulata* (C: Agardh) Kraft et Wynne C(Rhodophyceae). **Botanica Marina**, v. 34, p. 369-373, 1991.

DAVIDSON, I. W. Production of polysaccharide by *X. campestris* in continuous culture. **FEMS Microbiological Letters**, v. 3, p. 347 - 349, 1978.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p.151 - 175, 1998.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T.T. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2583 – 2595, 2005.

DEVI, M.P.; SUBHASH, G.V.; MOHAN, S.V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276 - 283, 2012.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951 – 962, 2012.

DOUMIT, C. N.; PINOTTI, M. H. Exopolissacarídeos de Cianobactérias. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 43 - 52, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 352-356, 1956.

DUEÑAS, M.; MUNDUATE, A.; PEREA, A.; IRASTORZA, A. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 113 – 120, 2003.

FARIZOGLU, B.; UZUNER, S. The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 57, p. 46 – 54, 2011.

FAY, P. **The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)**. First published in Great Britain. p. 01 - 88, 1983.

FRAPPART, M.; AKOUM, DING, L. H.; O.; JAFFRIN, M. Y. Treatment of dairy process waters modelled by diluted milk using dynamic nanofiltration with a rotating disk module. **Journal of Membrane Science**, v. 282, p. 465 – 472, 2006.

GARZA-SÁNCHEZ, F. J. A.; ZERTUCHE-GONZÁLES, CHAPMAN, D. J. Effect of temperature and irradiance on the release, attachment and survival of spores of *Gracilaria pacifica* Abbott (Rhodophyta). **Botanica Marina**, v. 40, p. 205 - 212, 2000.

GUERRA-VIEIRA, J.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, v. 00, p. 1 - 7, 2012.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Anaerobic hidrolisis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. **Water Research**, v. 33, p. 3281 - 3290, 1999.

HAFTING, J. T. Effect of tissue nitrogen and phosphorus quota on growth of *Porphyra yezoensis* blades in suspension cultures. **Hydrobiologia**, v. 398/399, p. 305 - 314, 1999.

HAMDANI, A.; MOUNTADAR, M.; ASSOBBHEI, O. Comparative study of the efficacy of three coagulants in treating dairy factory waste water. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 83 - 88, 2005.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 423 - 434, 2002.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. **Evaluation of the growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in effluent of fishing industry.** In: CHISA – 16 th International Congress of Chemical and Process Engineering. Prague, 2004.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. **Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli.** Universidade Federal do Rio Grande (Tese Doutorado-Engenharia e Ciência de Alimentos), 2008.

HORNES, M.; SILVA, A. G; MITTERER, M. L; QUEIROZ, M. I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 1 - 371, 2010.

JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L. Q., PINTO, L. A. A., QUEIROZ, M. I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium. **Chemical Engineering and Processing**, v.46, p.63 – 69, 2007.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M.; QUEIROZ, M. I. Caracterização da fração protéica da cianobactéria cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482 - 488, 2006.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIN, M.; DE BOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4199 - 4205, 2007.

KAESWUK, J.; THORASAMPAN, W.; THANUTTAMAVONG, M.; SEO, G. T.. Kinetic development and evaluation of membrane sequencing batch reactor (MSBR) with mixed cultures photosynthetic bacteria for dairy wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p.1161 - 1168, 2010.

KAWAI, L.A.; PINOTTI, M.H.P.; CELLIGOI, M.A.P.C. Exopolysaccharide production by the cyanobacteria *Nostoc* sp in different concentrations of nitrogen and glucose. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, p. 33 - 39, 2006.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V.; MALL, I. D. Treatment of dairy wastewater by commercial activated carbon and bagasse fly ash: parametric, kinetic and equilibrium modelling, disposal studies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3474 - 3483, 2010.

LEE, B. C.; BAE, J.T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 369 - 376, 2004

LEE, J. B.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; SANKAWA, U. Structural Analysis of Calcium Spirulan (Ca-SP)-Derived Oligosaccharides Using Eletspray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 136 - 138, 2000.

LEE, W.Y.; PARK, Y.; AHN, J.K.; KA, K.H.; PARK, S.Y. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 249 – 254, 2007.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher, p. 34 - 120, 2000.

LEVY, I.; BEER, S.; FRIEDLANDER, M. Growth photosynthesis and Agar in wild-type strains of *Gracilaria verrucosa* and *G. conferta* (Gracilariales, Rhodophyta), as a strains selection experiment. **Hydrobiologia**, v. 204, p. 381 - 387, 1990.

LIU, C.; LU, J.; LU, L., LIU; Y., WANG; F., XIAO, M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5528 – 5533, 2010.

MACLER, B. A.; ZUPAN, J. R. Physiological basis for the cultivation of Gelidiales. **Hydrobiologia**, v. 221, p. 83 - 90, 1991.

MAGER, D.M.; THOMAS, A.D. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: A review of their role in dryland soil processes. **Journal of Arid Environments**, v. 75, p. 91 - 97, 2011.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. **Apple Energy**, v. 88, p. 3389 - 3401, 2011.

MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; YOUSFI, F. El.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263 - 272, 2000.

MATHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 361 - 376, 1999.

MEEKS, J. C.; CASTENHOZ, R. W. Growth and photosynthesis in the extreme thermophile, *Synechococcus liviolus* (Cyanophyta). **Archives of Microbiology**, v. 78, p. 25 - 71, 1971.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3382 – 3386, 2009.

MORENO, J. VARGAS, M. A.; OLIVARES, H.; RIVAS, J.; GUERREIRO, M. G. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 175 - 182, 1998.

MYERS, R. H. MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology**: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, 2 nd ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.

NAMBOODIRI, A. M. A.; PEETHAMBARAN, A.; MATHEW, R.; SAMBHU, P. A.; HERSHFIELD, J.; MOFFERTT, J. R.; MADHAVARAO, C. N. Canavan disease and the role of N-acetylaspartate in myelin synthesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, p. 216 - 223, 2006.

NGUYEN, H.; WANG, T.; LIN, T.; GUO, J. Optimal conditions for mycelia biomass and extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*: Effect of agitation speed, inoculum ratio and initial Ph. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 6317 - 6326, 2012.

NICOLAUS, B.; PANICO, A.; LAMA, L.; ROMANO, I.; MANCA, M.C.; GIULIO, A.; GAMBACORTA, A. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. **Phytochemistry**, v. 52, p. 639 - 647, 1999.

OGBONNA JC, TOMIYAMA S, TANAKA H Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* z for efficient production of α -tocopherol. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 67 - 74, 1998.

PANDEY, A.; AZMI, W.; SINGH, J.; BANERJEE, U. C. **Biotechnology: food fermentation**. In: V. K. Joshi, A. Pandey (Eds). New Delhi: Educational Publishers & Distributors, v. 1, p. 383 - 4260, 1999.

PAPA, J. L. **Visão geral: tratamento de efluentes em laticínios**. In: Seminário "Efluentes de laticínios: Alternativas Tecnológicas e Viabilidade Econômica". ITAL, 2000.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1822 - 1827, 2006.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10163 - 10172, 2011.

PEARSON, M. J. **Toxic blue-green algae**: Report of the National Rivers Authority Water Quality. Series n. 2, United Kingdom: 1990.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia; conceitos e aplicações**. 1997. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, v. 1, 2.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, E. Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11 - 36, 2011.

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O.; KOETZ, P.; YUNES, J. S.; SOUSASOARES, L. Avaliação do teor de proteínas da *Aphanothece* sp e caracterização em aminoácidos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 1089 - 1092, 1998.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in batch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 130 - 141, 2004.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O. Efeito da razão C/N e do inóculo na remoção de nitrogênio do efluente da indústria da pesca pela cianobactéria. **Revista Vector**, Rio Grande, v. 15, p. 25 - 32, 2005.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; ROSA, L. S.; GOLDBECK, R. Nutricional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Microbiological Research**, v. 101, p. 7107 - 7111, 2006.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 22, p. 10 - 16, 2007a.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; GOLDBECK, R. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying condition. **Chemical Engineering and Processing**, v. 50, p. 1 - 6, 2007b.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; PINTO, L. A. A. Characteristics of Thin-Layer Drying of the Cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 63 - 69, 2007c.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438 - 3443, 2011.

QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2163 - 2169, 2007.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 01 - 61, 1979.

SARKAR, B.; CHAKRABARTI, P. P.; VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. Wastewater treatment in dairy industries—possibility of reuse. **Desalination**, v. 195, p. 1 - 3, 2006.

SATPUTE, S. K., BANAT, I. M., DHAKEPHALKAR, P. K., BANPURKAR, A. G., CHOPADEV, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 436 – 450, 2010.

SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1 – 7, 2003.

SHU, C. H.; YANG, S. T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 454 - 468, 1990.

SILVA, A. G. M.; HORNES, M. O.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Application of coagulants in pretreatment of fish wastewater using factorial Design. **Desalination and Water Treatment**, v. 1, p. 208 - 214, 2009.

SUNG, S.; LIU, T. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. **Chemosphere**, v. 53, p. 43 - 52, 2003.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41 - 46, 1998.

VASHITZ, O; SHEINTUCH, M. Analysis of polymer synthesis rates during steady-state growth of *X. campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 383 - 385, 1991.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**, v. 219, p. 190 – 202, 2008.

XING, X. H.; JUN, B. M.; YANAGIDA, M.; TANJI, Y.; UNNO, H. Effect of C/N values on microbial simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous substances in wastewater by single continuous-flow fluidized-bed bioreactor containing porous carrier particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 29 - 37, 2000.

XU, H., MIAO, X. & WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499 - 507, 2006.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. ; QUEIROZ, M. I. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, p. 368 - 371, 2007.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDECK, R.; SOUSA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M.I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7118 - 7122, 2010.

ARTIGO 2

**INFLUÊNCIA DAS RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO E
NITROGÊNIO/FÓSFORO NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS
EXTRACELULARES POR *Aphanothece microscopica* Nägeli**

**INFLUÊNCIA DAS RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO E
NITROGÊNIO/FÓSFORO NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS
EXTRACELULARES POR *Aphanothece microscopica* Nägeli**

SILVA-MANETTI, Adriana G.; QUEIROZ, Maria I.

Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos Programa de Pós
Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos Laboratório de Biotecnologia. Rio
Grande – RS. E-mail: biotecnofurg@yahoo.com.br; E-
mail:mariaisabel.queiroz@pesquisador.cnpq.br

RESUMO

Neste trabalho foi investigado a relação C/N e N/P na produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria de laticínios. Os cultivos foram conduzidos heterotroficamente em biorreatores tipo coluna de bolhas, pH ajustado a 7,6, reator isotérmico operando na temperatura de 30°C e tempo de retenção celular de 24 h com concentração celular de 200 mg. L⁻¹. Os cultivos foram realizados com o ajuste das razões C/N e N/P do efluente, tomando como base as relações DQO/N-NTK e N-NTK/P-PO₄⁻³ previamente determinadas no efluente. A razão C/N foi ajustada com glicose e a N/P com fosfato dissódico. Foram realizados 9 experimentos, em triplicata, totalizando 27 experimentos seguindo um planejamento fatorial (3²). As variáveis independentes foram razões C/N (20, 40 e 60) e N/P (5, 10 e 15) sob as variáveis dependentes produção e produtividade de carboidratos extracelulares. A melhor condição para produção e produtividade de carboidratos extracelulares, foi registrada quando o efluente foi ajustado a C/N 60 e N/P 10, com máximos de 24,87 mg. L⁻¹ e produtividades de 0,96 mg L⁻¹.h⁻¹. Foram constatadas velocidades máximas de crescimento de 0,22 h, tempo de geração 3,10 h⁻¹, não diferindo ao nível de confiança de 95 % dos experimentos com C/N 20 e N/P 10 (experimento 2). No entanto, a concentração de biomassa apresentou diferença significativa (p ≤ 0,05), indicando que nas maiores razões de C/N 60 e N/P 10, tem-se as maiores produções de carboidratos extracelulares porém não as maiores concentrações de biomassa microalgal.

Palavras-chave: Biocompostos; Cianobactéria; Efluente laticínio.

ABSTRACT

In this work the C/N and N/P ratios were investigated in the production of extracellular carbohydrates by *Aphanothece microscopica* Nägeli cultured in effluent from the dairy industry. The cultures were conducted heterotrophically in bubble column bioreactors, adjusted to pH 7.6, in an isothermal reactor operating at 30°C and hydraulic detention time of 24 hours with cell concentration of 200 mg. L⁻¹. The cultures were performed with the adjustment of the C/N and N/P ratios of the effluent, based on the relationships COD/N-TKN and N-TKN and P-PO₄⁻³ priority defined in the effluent. The C/N ratio was adjusted with glucose and N/P with disodium phosphate. 9 experiments were performed in triplicate, totaling 27 experiments following a (3²) factorial design. The independent variables were C/N (20, 40 and 60) the N/P ratio (5, 10 and 15) under the dependent variables production and yield of extracellular carbohydrates. The optimum conditions for production and productivity of extracellular carbohydrates, was recorded when the effluent was adjusted to C/N 60 and N/P 10, with maximum of 24.87 mg L⁻¹ and yield of 0.96 mg L⁻¹.h⁻¹. Maximum growth speeds of 0.22 h were observed, generation time, 3.10 h⁻¹ not differing from the confidence level of 95 % of experiments with C/N 20 and N/P 10 (experiment 2). However, the biomass concentration was significantly different, indicating that at higher ratios C/N 60 and N/P 10 have the greatest production of extracellular carbohydrates but not the highest concentrations of microalgal biomass.

Keywords: Biocompounds; Cyanobacteria; Dairy effluent.

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são procariontes que incluem uma variedade de espécies com diferenças, morfológicas e bioquímicas altamente peculiares (DE PHILIPPIS & VICENZINI, 1998; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; BARSANTI & GUALTIERI, 2006; DE-BASHAN & BASHAN, 2010). Muitas destas são capazes de sintetizar um envoltório mucilaginoso e liberar este material no meio de cultivo durante o crescimento celular (LEE et al., 2000; OTERO & VINCENZINI, 2003; LEE et al., 2007; MORENO et al., 2008; YUNES, 2009; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Este material comumente denominado exopolissacarídeos ou carboidratos extracelulares é constituído de polímeros de carboidratos, que tem como unidade glicose, galactose, manose, ribose, xilose, arabinose, fucose, ramnose e ácidos glicurônico e galacturônico (LEE et al., 2000; PARIKH & MADAMWAR, 2005; DE PHILIPPIS & VICENZINI, 2006; LEE et al., 2007; PEREZ-GARCIA et al. 2011a).

Os carboidratos extracelulares liberados são facilmente recuperáveis do meio de cultivo, apresentando grandes perspectivas de aplicação industrial, quer na forma convencional como gelificantes, emulsificantes e floculantes ou em outras aplicações como farmacológica e gestão ambiental (LEE et al., 2000; OTERO & VICENZINI., 2003; DE PHILIPPIS & VICENZINI., 2006; LEE et al., 2007; PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

Estes compostos são caracterizados como metabólitos secundários, os quais são produzidos por muitas cianobactérias em condições de estresse. Isso constitui uma estratégia metabólica desses micro-organismos para crescimento e desenvolvimento em condições desfavoráveis (MORENO et al., 1998; DE PHILIPPIS e VICENZINI, 1998; PARIKH & MADAMWAR, 2005).

Analisando do ponto de vista de produção de biomassa, esses organismos apresentam taxas maiores de crescimento e são mais fáceis de manipular quanto às condições de produção de biocompostos do que plantas ou macroalgas (SUTHERLAND, 1998).

Para produção destes biocompostos a composição do meio e as condições de cultivo interferem diretamente em seu rendimento. Fatores limitantes como fontes e quantidade de carbono e nitrogênio, aeração, agitação, microelementos, inóculo entre outros podem afetar a produção e produtividade destes compostos (BARBOSA et al., 2003; DERNER et al., 2006; LEE et al., 2007; LAI et al., 2011; DONOT et al., 2012).

A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma cianobactéria de ocorrência natural nos corpos hídricos adjacentes à cidade de Rio Grande, RS, Brasil, que vem sendo estudada sobre diferentes aspectos, no âmbito de tratamento de águas residuárias, perspectivas de utilização como complemento da dieta alimentar, bem como, na produção de compostos celulares de interesse industrial (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2005; JACOB-LOPES et al., 2006; JACOB-LOPES et al. 2007a; b; ZEPKA et al., 2008; ZEPKA et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2011; QUEIROZ et al., 2011; VIEIRA GUERRA et al., 2012). No entanto, no que se refere a propriedade de produção de carboidratos extracelulares por este micro-organismo, informações técnico-científicas, ainda não tem sido disponibilizadas pela literatura. Por outro lado, a literatura tem contemplado, quando aos fatores que estimulam a produção destes compostos por cianobactérias, salientando a deficiência de nitrogênio como um dos principais fatores (SUTHELLAND, 1996; DE PHILIPPIS & VICENZINI, 1998; DOUMIT & PINOTTI et al., 2004; KAWAI et al., 2006). O efluente de laticínio tem sido caracterizado como portador de baixas concentrações em nitrogênio (PAPA, 2000). Neste contexto, em se tratando da produção de compostos celulares, a taxa de incorporação de carbono e nitrogênio e fósforo, é dependente, das razões C/N e N/P do meio de cultivo (KAWAI et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; GARCÍA- OCHOA et al., 2000). Em face ao exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli, desenvolvida no efluente da indústria de laticínios, em diferentes razões C/N e N/P.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

2.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSMAN92), cedidas pela Unidade de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio Grande, isoladas do estuário da cidade de Rio Grande, RS, Brasil, foram cultivadas e mantidas em meio BG-11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por Rippka et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 25°C e pH 7,6 (QUEIROZ et al., 2004). O cultivo foi realizado em reator de vidro em câmara otimizada quanto à luz e temperatura. Foram utilizadas lâmpadas incandescentes e fluorescentes com intensidade

luminosa e temperatura controlada. A densidade luminosa foi otimizada em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG-11 é composto por $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ($0,04 \text{ g.L}^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,075 \text{ g.L}^{-1}$), Na_2CO_3 (2 g.L^{-1}), $NaNO_3$ ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), EDTA ($0,001 \text{ g.L}^{-1}$), H_3BO_3 ($2,86 \text{ g.L}^{-1}$), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ($1,81 \text{ g.L}^{-1}$), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,222 \text{ g.L}^{-1}$), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ($0,39 \text{ g.L}^{-1}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($0,079 \text{ g.L}^{-1}$), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0,040 \text{ g.L}^{-1}$), $C_6H_8O_7$ ($0,006 \text{ g.L}^{-1}$) e $FeC_6H_5O_7 (NH_4)_{22}HC_6H_5O_7$ ($0,006 \text{ g.L}^{-1}$) (RIPPKA et al., 1979).

A concentração celular na fase exponencial para tomada dos inóculos foi determinada gravimetricamente mediante filtração de volume conhecido de meio de cultura BG-11 contendo as células do micro-organismo. A cultura foi filtrada em filtro Millipore ($0,45 \mu\text{m}$), previamente seco a 60°C por 24 h. Os filtros foram secos até peso constante e a biomassa quantificada.

2.2 Efluente

A água residuária do processamento de laticínios foi utilizada como meio de cultivo. O efluente foi obtido em uma indústria de processamento de produtos lácteos (Pelotas, RS), coletado na saída do tanque de equalização da estação de tratamento de efluentes por um período de 36 meses. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e congeladas a -18°C . O efluente foi caracterizado quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (N-NTK), nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$), P- PO_4^{-3} : fósforo total dissolvido; sólidos totais (ST), sólidos suspensos (SS), sólidos fixos e sólidos voláteis (SV), alcalinidade, ácidos voláteis totais (AVT), cálcio e dureza.

As análises foram realizadas segundo os procedimentos descritos em *Standard Methods* para análise de águas e efluentes (APHA, 2005). Foi caracterizado quanto a carboidrato pelo método fenol-sulfúrico usando glicose como padrão (DUBOIS et al., 1956). As razões C/N e N/P foram determinadas em função das concentrações de DQO, N-NTK e P- PO_4^{-3} presentes no efluente, conforme indicado por Hornes & Queiroz (2004). A Tabela 1 apresenta as características do efluente utilizado.

Tabela 1. Características do efluente de laticínios

Parâmetros	Efluente bruto	
	Média	C.V.
DQO	950	40,3
N-NTK	42,2	35,13
P-PO ₄ ⁻³	4,5	22,10
C/N	22,09	6,42
N/P	9,7	13,60

DQO: demanda química de oxigênio (mg. L⁻¹); N-NTK: nitrogênio total Kjeldahl (mg. L⁻¹); P-PO₄⁻³: fósforo (mg. L⁻¹); C/N: razão carbono nitrogênio; N/P: razão nitrogênio e fósforo; C.V.: coeficiente de variação (%). Dados amostrais referentes a 36 meses.

2.3 Planejamento experimental

Os experimentos foram conduzidos de acordo com um delineamento fatorial completo 3² em que foram analisados os efeitos da razão C/N, nos níveis 20, 40 e 60, e razão N/P nos níveis 5, 10 e 15 sob as variáveis respostas produção e produtividade de carboidratos extracelulares. Os níveis das variáveis independentes foram ajustados, tomando como base as razões C/N e N/P do efluente obtidas a partir da determinação de DQO e N-NTK. A razão C/N foi ajustada com glicose e a N/P com fosfato dissódico. Os experimentos foram realizados em triplicata, as variáveis e níveis utilizados, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental

Tratamento	Valores reais e codificados	
	X ₁	X ₂
1	-1 (20)	-1 (5)
2	-1 (20)	0 (10)
3	-1 (20)	+1 (15)
4	0 (40)	-1 (5)
5	0 (40)	0 (10)
6	0 (40)	+1 (15)
7	+1 (60)	-1 (5)
8	+1 (60)	0 (10)
9	+1 (60)	+1 (15)

X₁: razão C/N; X₂: razão N/P

De acordo com as respostas do planejamento experimental, os efeitos de cada variável foram calculados e as interações entre eles determinadas. As superfícies de resposta foram obtidas através da montagem dos modelos empíricos (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Equação 1

Onde: X_1 e X_2 são os níveis codificados das variáveis independentes; β é o coeficiente de regressão (β_0 : intercepção; β_1 e β_2 : linear; β_{12} : interação e β_{11} , β_{22} : coeficientes quadráticos e Y é a resposta predita para a variável dependente.

2.4 Desenvolvimento dos experimentos

Experimentos em triplicata na ausência de luz, de acordo com o planejamento experimental (Tabela 2) foram conduzidos, em biorreator tipo coluna de bolhas em sistema descontínuo com capacidade de 4,5 L, constituído de uma extensão cilíndrica de PVC com dimensões de 100 cm de altura e 10 cm de diâmetro. O sistema de dispersão de gases do reator consistiu em um difusor de ar de 1,5 cm localizado no centro da base da coluna para promover a aeração de 1 VVM e agitação do meio. A cada experimento, o efluente da indústria de laticínio foi descongelado e então esterilizado a 1,1 kgf.cm (120°C) por 15 minutos, para a realização dos experimentos. Os experimentos foram conduzidos em câmara com controle de temperatura (TC-401) da marca Tecnal. No efluente previamente ajustado a pH 7,6 e quanto às razões C/N e N/P, 200 mg. L⁻¹ de células de *Aphanothece microscopica* Nägeli, na fase exponencial de crescimento foram inoculadas a 30°C. Os experimentos foram monitorados, mediante tomada de amostras a intervalos de 4 em 4 h, filtrados em filtro Millipore (0,45 µm) e a biomassa gravimetricamente determinada, para levantamento dos dados cinéticos e avaliação de carboidratos extracelulares.

2.4.1 Cinética de crescimento celular

As variáveis cinéticas, velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), tempo de geração (tg) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), foram determinadas conforme indicado por Levenspiel (2000). O procedimento de avaliação teve como base as equações 2, 3, 4, 5 e 6.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

(equação 2)

onde:

μ_{\max} : velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

dx : variação da concentração celular (mg. L^{-1});

dt : variação do tempo (h);

X : concentração celular (mg. L^{-1}).

Integrando-se a equação 2 obtém-se a equação 3.

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} (\Delta t)} \quad (\text{equação 3})$$

onde:

X : concentração celular no final da fase exponencial (mg. L^{-1});

X_0 : concentração celular no início da fase exponencial (mg. L^{-1});

μ_{\max} : máxima velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

Δt : intervalo de tempo do crescimento exponencial (h)

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (\text{equação 4})$$

onde:

tg : tempo de geração (h);

μ_{\max} : máxima velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (\text{equação 5})$$

onde:

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato em células ($\text{mg biomassa. mg S}^{-1}$)

dX = variação da concentração celular (mg. L^{-1})

dS = variação do substrato (mg. L^{-1})

$$P_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (\text{equação 6})$$

onde:

P_x : produtividade ($\text{mg. L}^{-1}\text{h}^{-1}$)

ΔX : variação da concentração final e inicial (mg. L^{-1})

Δt : variação entre o tempo final e inicial (h)

2.5 Produção de carboidratos extracelulares

A avaliação da produção de carboidratos extracelulares foram realizadas a partir de tomadas de amostras nas fases lag, logarítmica e estacionária de crescimento celular.

2.5.1 Extração de carboidratos extracelulares

A extração dos carboidratos extracelulares foi realizada, segundo a metodologia indicada por Dueñas et al. (2003). Alíquotas de 200 ml de efluente foram centrifugados a 4000 xg por 30 min, separando-se assim o meio de cultura da biomassa. A biomassa precipitada foi adicionado NaOH 2N, mantendo a mistura sob agitação por 2h. Após este período, a biomassa foi descartada e o sobrenadante foi tratado com excesso de etanol (3 v/v) por 24 h a 4°C, para que ocorresse a precipitação dos carboidratos extracelulares. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75 %. Uma vez centrifugado o sobrenadante foi descartado.

2.5.2 Quantificação dos carboidratos extracelulares

Após a extração dos carboidratos extracelulares, estes foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico usando glicose como padrão. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H_2SO_4 concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor alaranjada (DUBOIS et al., 1956).

2.6 Avaliação do consumo de substrato

O comportamento do consumo de substrato foi avaliado paralelamente a produção de biomassa e de carboidratos extracelulares, em função dos parâmetros

DQO, N-NTK e PO_4^{-3} , determinados segundo os procedimentos descritos em Standard Methods, para análise de águas e efluentes (APHA, 2005).

2.7 Análise dos dados

Na análise estatística foram considerados os efeitos das variáveis independentes sob a resposta produtividade de carboidratos extracelulares. O modelo (regressão) gerado, conforme Equação 1, foi avaliado por meio de análise de variância (ANOVA) e sua validade ou grau de ajuste determinado por meio de teste F, que consiste em relacionar o valor de F calculado (F_{calc}) com o valor de F tabelado (F_{Tab}), se o valor de F_{calc} pela ANOVA for maior que o F_{Tab} , a regressão obtida ajusta os pontos experimentais de forma satisfatória, validando o modelo no intervalo de confiança estudado (MYERS & MONTGOMERY, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da cinética de crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli para as diferentes condições experimentais

3.1.1 Curvas de crescimento

O comportamento das curvas de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente da indústria de laticínios para as diferentes condições experimentais pode ser avaliado nas Figuras de 1 a 9.

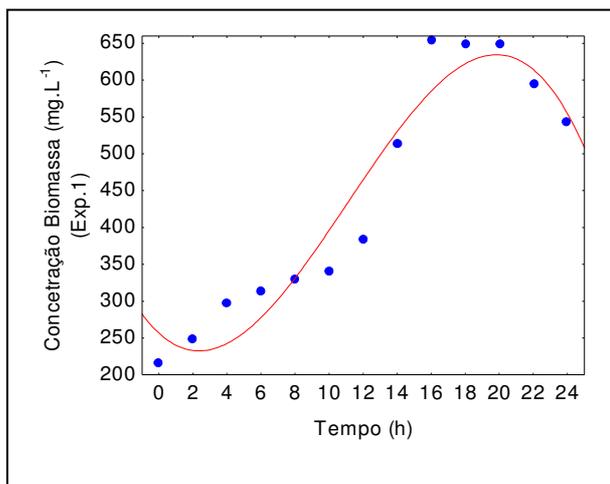


Figura 1. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 1 (C/N20; N/P5) (valores médios de 3 repetições, n=3).

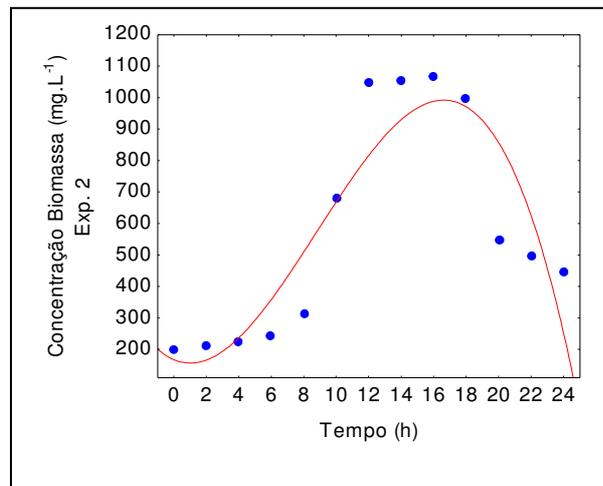


Figura 2. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 2 (C/N20; N/P10) (valores médios de 3 repetições, n=3).

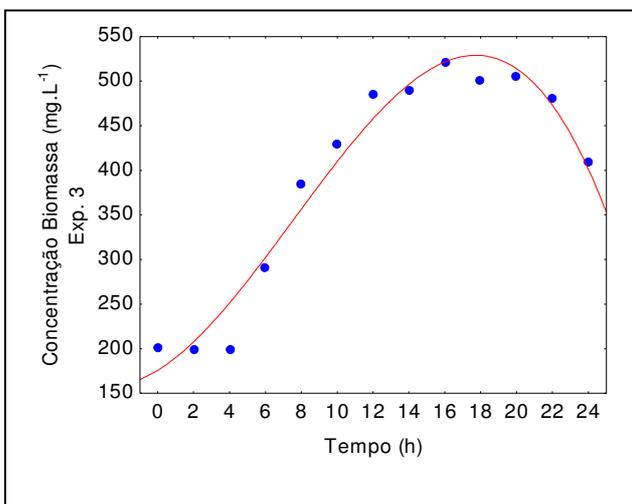


Figura 3. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 3 (C/N 20; N/P 15) (valores médios de 3 repetições, n=3).

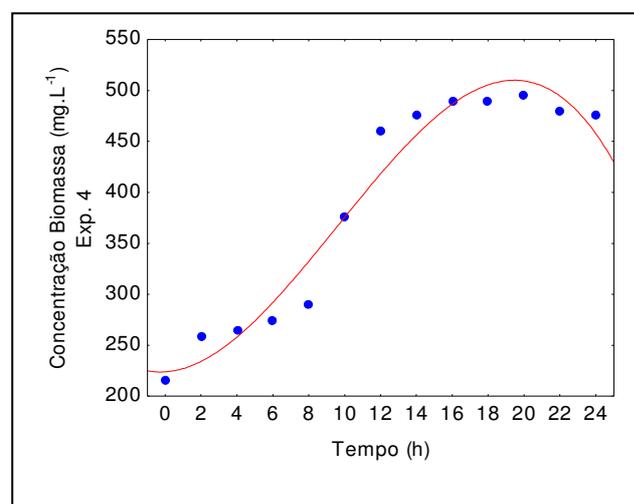


Figura 4. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 4 (C/N 40; N/P 5) (valores médios de 3 repetições, n=3).

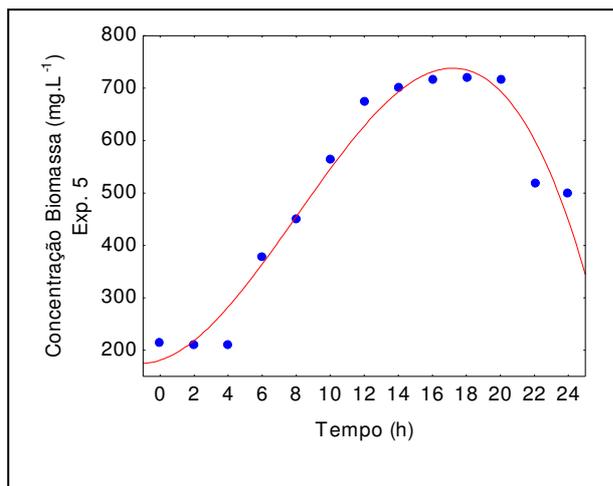


Figura 5. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 5 (C/N 40; N/P 10) (valores médios de 3 repetições, n =3).

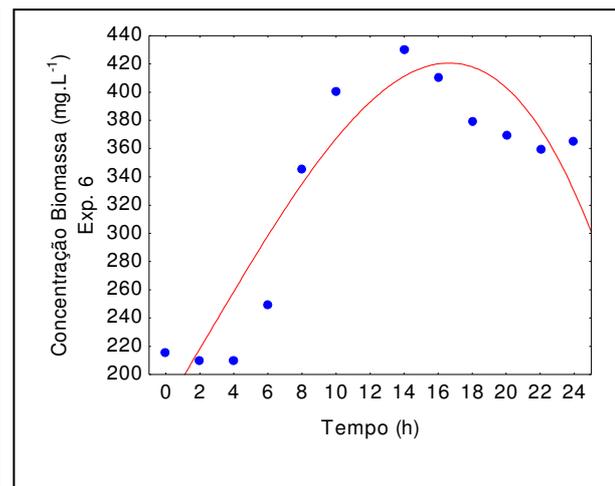


Figura 6. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 6 (C/N 40; N/P 15) (valores médios de 3 repetições, n =3).

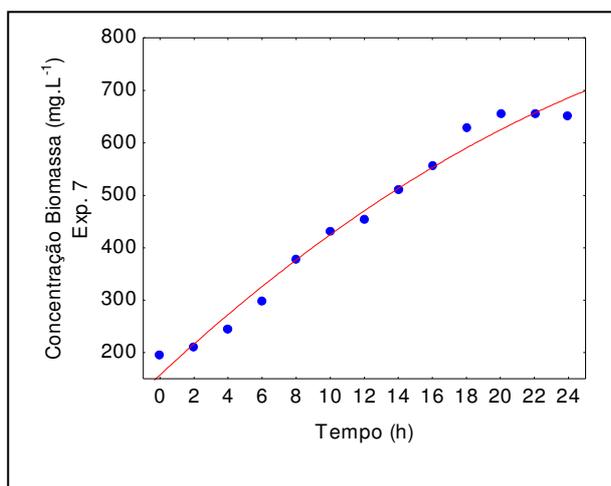


Figura 7. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 7 (C/N 60; N/P 5) (valores médios de 3 repetições, n =3).

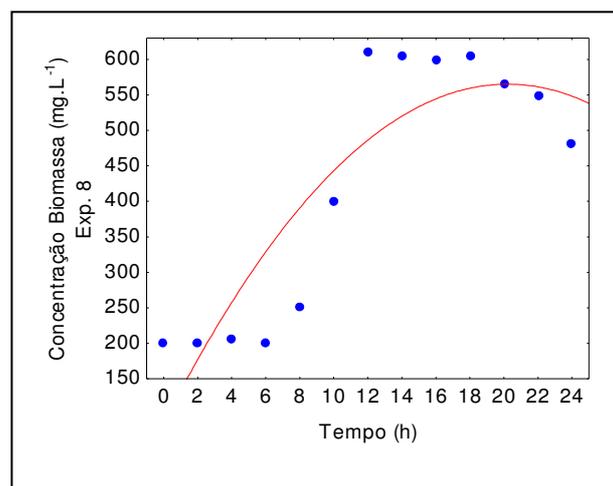


Figura 8. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 8 (C/N 60; N/P 10) (valores médios de 3 repetições, n =3).

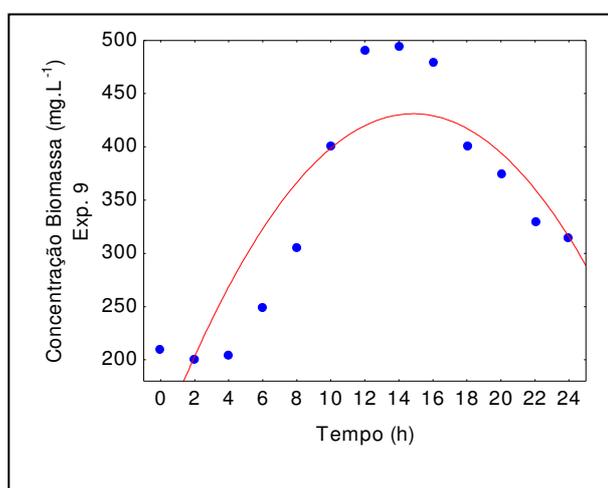


Figura 9. Curva de crescimento para *Aphanothece microscopica* Nægeli cultivada no efluente de laticínios sob as condições do experimento 9 (C/N 60; N/P 15) (valores médios de 3 repetições, n =3).

A análise dos perfis de crescimento demonstram a influência das razões C/N e N/P, na produção celular. Observa-se diferenças notórias no período de duração principalmente no que se refere a fase logarítmica. Estas diferenças são melhor avaliadas em função dos modelos de definição das fases logarítmicas de crescimento (Tabela 3), obtidos a partir dos modelos de crescimento (Tabela 4), preditos para cada experimento, onde são registrados importantes valores de coeficiente de determinação (0,96 a 0,99) demonstrando o bom ajuste dos modelos. Verifica-se, pela análise da Tabela 3, intensas variações no tempo de duração das fases logarítmicas descritas, variando de 12 a 20 h. O maior período registrado (20 h) corresponde ao experimento 7 (Figura 7), quando são utilizadas razões C/N 60 e NP 5.

Tabela 3. Modelos de definição da fase logarítmica de crescimento celular de *Aphanothece microscopica* Nägeli

Experimentos	Modelos	t fase log	R ²
1 (C/N 20; N/P 5)	$y = -225 + 53,75.x$	16	0,97
2 (C/N 20; N/P 10)	$y = -670,7 + 138,05.x$	12	0,96
3 (C/N 20; N/P 15)	$y = 258,25 + 16,5.x$	16	0,99
4 (C/N 40; N/P 5)	$y = 180 + 20.x$	16	0,96
5 (C/N 40; N/P10)	$y = 121,5 + 43,25.x$	16	0,97
6 (C/N 40; N/P 15)	$y = 55,5 + 34,25.x$	12	0,98
7 (C/N 60; N/P 5)	$y = 167,08 + 24,79.x$	20	0,98
8 (C/N 60; N/P 10)	$y = -480 + 90.x$	12	0,99
9 (C/N 60; N/P 15)	$y = -5,5 + 40,75.x$	12	0,98

y: concentração celular (mg. L⁻¹); x: tempo de cultivo (h); t fase log: tempo de duração da fase logarítmica de crescimento celular (h); R²: coeficiente de determinação.

Tabela 4. Modelos de crescimento de *Aphanothece microscopica* Nägeli de acordo com os experimentos

Experimentos	Modelos	R ²
1 (C/N 20; N/P 5)	Biomassa = (256,514)+(-21,154)t+(5,01617)t ² +(-0,15068)t ³	0,97
2 (C/N 20; N/P 10)	Biomassa = (166,844)+(-21,99)t+(11,6195)t ² +(-0,43972)t ³	0,94
3 (C/N 20; N/P 15)	Biomassa = (175,948)+(12,318)t+(1,9827)t ² +(-0,08767)t ³	0,98
4 (C/N 40; N/P 5)	Biomassa = (223,918)+(1,15092)t+(2,14636)t ² +(-0,07452)t ³	0,98
5 (C/N 40; N/P10)	Biomassa = (180,978)+(10,7077)t+(4,40772)t ² +(-0,18298)t ³	0,98
6 (C/N 40; N/P 15)	Biomassa = (177,953)+(19,8138)t+(0,246315)t ² +(-0,03369)t ³	0,90
7 (C/N 60; N/P 5)	Biomassa = (6,60572)+(30,0854)t+(-0,33666)t ² +(5,327)t ³	0,99
8 (C/N 60; N/P 10)	Biomassa = (-61,649)+(47,2735)t+(-1,1697)t ² +(5,30163)t ³	0,90
9 (C/N 60; N/P 15)	Biomassa = (-6,1995)+(40,9753)t+(-1,3805)t ² +(5,10821)t ³	0,90

T: tempo de cultivo (h); Biomassa (mg. L⁻¹); R²: coeficiente de determinação.

Avaliando-se o comportamento descrito na Figura 7, salienta-se a ausência, de um período de adaptação celular. Guerreiro et al. (1999) reportam, que a ausência da fase lag é uma característica de curvas de crescimento de cianobactérias quando inoculadas em efluentes de indústrias de alimentos, o que é atribuído a alta disponibilidade de carbono orgânico. Comportamento similar tem sido evidenciado para este micro-organismo, quando cultivado heterotroficamente, em efluentes como da parboilização do arroz e indústria da pesca (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al. 2004; QUEIROZ et al., 2006; ZEPKA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2011).

Os resíduos agroindustriais apresentam características adequadas para suportar um cultivo heterotrófico, além da elevada concentração em matéria orgânica e nutrientes inorgânicos, que resultam em razões C/N e N/P adequadas, apresentam qualitativamente compostos de fácil assimilação, e na maioria dos casos, ausência de compostos tóxicos inibidores de crescimento (FLORES & HERREROS, 1994). Por outro lado, Sarkar et al. (2006), salientam a importância da utilização de efluentes de laticínios em cultivos que visem o reúso da água residuária em virtude de não conterem compostos que o tornem tóxico. Assim, a ausência da fase lag registrada para o experimento 7, se justifica, pelo tipo de meio de cultivo considerado, bem como pela alta razão C/N ajustada.

Nos demais experimentos, observa-se o comportamento clássico de crescimento microbiano, sendo possível identificar claramente quatro fases (lag, exponencial, estacionária e de morte celular), destaca-se curta duração da fase estacionária. Segundo

Shuler & Kargi (1992) a fase estacionária tem início ao fim da fase de desaceleração de crescimento líquido é zero (ausência da divisão celular), ou quando se iguala a velocidade de mortalidade das células, no entanto mantendo-se metabolicamente ativas.

Em se tratando da produção de carboidratos extracelulares, esta fase de crescimento, torna-se de especial importância, uma vez que estes compostos se caracterizam por serem produzidos, principalmente durante a fase estacionária de crescimento (DE PHILIPPIS & VICENZINI et al., 1993; DE PHILIPPIS & VICENZINI et al. 1998; ROMANO et al., 2000; LEE et al., 2007; MORENO et al., 2008; PEREZ – GARCIA, 2011).

De Philippis & Vicenzini (1998) relatam que quando as condições de cultivo são ajustadas, para um ótimo a produção de carboidratos extracelulares poderá se dar em um curto intervalo de tempo. Isso é notadamente evidenciado pelos resultados descritos na Tabela 5, em que se pode verificar que as maiores concentrações em carboidratos extracelulares, são obtidas quando se utiliza as maiores razões C/N (experimentos 7, 8 e 9), não necessariamente apresentando as maiores fases estacionárias. Para a maioria dos experimentos (Figuras 2, 3, 4, 5 e 8), a duração desta fase foi de 4 h, com exceção dos experimentos 1 e 7 (Figura 1 e 7), que tiveram 2 h de duração e 6 e 9 (Figuras 6 e 9), onde foi registrado o maior período de duração.

A Figura 10 apresenta a estimativa de predição da produção de biomassa em função do tempo de cultivo, calculada mediante os modelos de crescimento descritos na Tabela 4. São registradas as máximas concentrações de biomassa na fase logarítmica de crescimento, bem como, as diferenças de média obtidas.

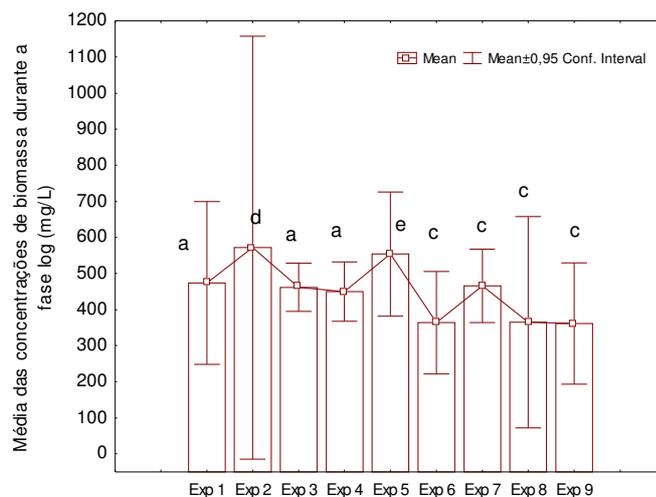


Figura 10. Concentração de biomassa para cada experimento na fase logarítmica (as médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância).

Avaliando o comportamento da Figura 10, verifica-se que as maiores concentrações são registradas para os experimentos 2 e 5, quando são utilizadas as razões C/N20, N/P10 e C/N40, N/P10 (Figuras 2 e 5), o que se reflete em aproximadamente, 600 mg. L^{-1} e 500 mg.L^{-1} , respectivamente, diferindo ($p \leq 0,05$) das demais concentrações de biomassa (experimentos 1, 3, 4, 6, 7, 8 e 9). Comparando estes resultados, com os dados da Tabela 6, observa-se, que as maiores concentrações de biomassa, não correspondem as maiores concentrações de carboidratos extracelulares. Isso se justifica, uma vez que a produção destes carboidratos representa uma estratégia metabólica para a sobrevivência e crescimento destes micro-organismos, especialmente sob condições ambientais desfavoráveis (DE PHILIPPIS & VICENZINI, 1998; OTERO & VICENZINI, 2000; LEE et al., 2007; MORENO e t al., 2008; PEREZ-GARCIA et al., 20011).

3.1.2 Avaliação dos dados cinéticos

A cinética da *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria de laticínios sob as condições experimentais, pode ser avaliada na Tabela 5. São apresentados os parâmetros clássicos de cinética de crescimento, expressos como, máxima velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (tg), produtividade de biomassa (Px) e de conversão de substrato em células ($Y_{s/x}$) com base no consumo de nitrogênio e matéria orgânica.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos de crescimento

Variáveis Cinéticas	Condições experimentais								
	Exp1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp7	Exp 8	Exp 9
Δt (h)	6	6	8	6	8	6	13	4	6
X_{final} (mg. L ⁻¹)	655	1045	520	490	700	460	655	610	490
X_0 (mg. L ⁻¹)	340	225	385	375	380	250	300	250	250
$\mu_{\text{máx.}}$ (h ⁻¹)	0,113	0,250	0,0366	0,0467	0,0814	0,0989	0,0528	0,2230	0,1145
tg (h)	6,14	2,77	18,94	14,84	8,51	7,00	13,13	3,10	6,05
$Y_{X/S \text{ DQO}}$ (mgbiomassa/mg _{DQO})	0,43	0,55	0,56	0,18	0,75	0,78	0,17	0,23	0,17
$Y_{X/S \text{ N-NTK}}$ (mgbiomassa/mg _{N-NTK})	9,35	15,53	6,10	5,22	14,54	17,07	2,83	11,51	20,03
$Y_{X/SP-PO_4^{-3}}$ (mgbiomassa/mg _{p. PO_4^{-3}}})	109	138,47	43,97	29,64	103,22	170,73	76,67	173,07	105,72
P_x (mg. L ⁻¹ . h ⁻¹)	52,50	136,67	16,87	19,16	40,00	35,00	27,30	90,00	40,00

* Δt : Intervalo de tempo da fase exponencial de crescimento; X: Concentração celular final; X_0 : Concentração celular Inicial; $\mu_{\text{máx.}}$: Máxima velocidade específica de crescimento; tg: Tempo de geração; $Y_{X/S}$: conversão de substrato em biomassa; P_x : produtividade de biomassa. Exp.: condições dos experimentos 1 ao 9 conforme planejamento fatorial (Tabela 2).

A análise dos dados da Tabela 5 demonstra, que o maior potencial de cultivo foi quando utilizou-se a condição 2 (C/N 20, N/P 10), potencial este expresso por uma concentração celular máxima de 1045 mg. L⁻¹, velocidade máxima específica de crescimento de 0,250 h⁻¹, tempo de geração correspondendo a 2,77 h e importante valor de tempo de batelada para atingir a máxima concentração celular de 6 h. Estes valores são notadamente diferenciados de qualquer outra condição estudada, no que se refere a produção de biomassa. A literatura é ampla quanto a robustez metabólica das microalgas, refletindo em mínimas exigências nutricionais, desta forma podendo os cultivos heterotróficos ser suportados por águas residuárias de inúmeros processos industriais (GUERRERO, 1999; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; TAM & WONG,

2000; OGBOONA et al., 2000; WANG et al., 2005; QUEIROZ et al., 2007; HARUM al., 2010; BASTOS et al., 2010; BASTOS et al., 2011; DEVI et al., 2012). É importante salientar, que o efluente, utilizado no experimento 2, não sofreu ajuste das razões C/N/N/P, conforme se pode avaliar pelos dados da Tabela 1, que fornecem as características do efluente bruto, utilizado para o desenvolvimento dos experimentos. Isso faz do efluente da indústria de laticínio um excelente meio de cultivo.

O elevado valor obtido para o coeficiente de conversão de matéria orgânica em biomassa, para o experimento 2 indica que as formas carbonadas presentes neste efluente, são mais facilmente bioconvertidas, o que sugere alto consumo de substrato, com baixa conversão em biomassa. De acordo com Perez-garcia et al. (2011a), ao mesmo tempo em que diversas fontes de carbono têm sido propostas para os cultivos heterotróficos de microalgas, poucos substratos, são passíveis de uso pelos microorganismos. As fontes de carbono frequentemente utilizadas para esta categoria de cultivos tem sido a glicose, acetato e glicerol (HEREDIA-ARROYO et al., 2010; HEREDIA-ARROYO et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011a; PEREZ-GARCIA et al. 2011b). Janczukowicz et al. (2007), reportam a alta biodegradação de lactose a acetato, bem como de gorduras a glicerol, no efluente de laticínio, ao que pode ser atribuído os dados cinéticos encontrados para o experimento 2.

Os dados da Tabela 5 evidenciam influência notória das razões C/N e N/P no crescimento celular, com significativas reduções à medida que aumenta a razão C/N, e com as variações de N/P. Este fato se reflete no fator de conversão de nitrogênio em células, que com o aumento das razões C/N, embora os valores dos coeficientes de conversão de nitrogênio em células se reduzem em relação ao valor obtido para o experimento 2, maiores valores são registrados, para as maiores razões N/P. Este comportamento pode ser atribuído a natureza do nitrogênio disponibilizado, mediante o ajuste das concentrações C/N e N/P, caracterizando-se pela presença substancial em nitrogênio amoniacal, quando comparada ao experimento 2, forma nitrogenada esta de destaque, quando se aborda o tema inibição do crescimento microalgal (PRZYTOCKA –JUSIAK, 1976). A fonte e a qualidade da fonte nitrogenada são fatores que afetam significativamente o crescimento celular (CAMPOS et al., 2002; OLAIZOLA, 2003; LEE et al., 2007). No entanto, considerando as velocidades específicas máximas de crescimento, é possível constatar que todos os experimentos apresentaram potencial para a produção de biomassa. Se considerarmos as velocidades de formação de biomassa como parâmetro base, verifica-se que o menor valor obtido ($0,0366 \text{ h}^{-1}$),

registrado para o experimento 3, é comparável a cultivos fotossintéticos ($0,038 \text{ h}^{-1}$), para o micro-organismo em estudo, em condições otimizadas segundo Jacob-Lopes et al. (2008b). Este valor $0,0366 \text{ h}^{-1}$, é em torno de 3 vezes maiores ao registrado para outras espécies em cultivo fotossintético (YUE & CHEN, 2005; CHAE et al., 2006).

Na Tabela 6, apresentam-se os valores médios de produção de carboidratos extracelulares nas diferentes fases de crescimento da *Aphanothece microscopica* Nägeli, definidos através dos modelos gerados segundo os dados cinéticos descritos para as diferentes condições experimentais (Tabelas 3 e 4).

Tabela 6. Médias e coeficientes de variação para os valores de produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli

Experimentos	Produção de carboidratos					
	Fases de crescimento					
	Fase lag		Fase log		Fase estacionária	
	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.
1 (C/N 20; N/P 5)	5,38 ^A	2,02	6,07 ^B	2,50	9,72 ^C	1,33
2 (C/N 20; N/P 10)	5,73 ^A	4,72	8,71 ^B	2,15	16,30 ^C	2,22
3 (C/N 20; N/P 15)	5,36 ^A	3,04	6,76 ^B	3,68	9,32 ^C	2,28
4 (C/N 40; N/P 5)	7,70 ^A	2,21	10,23 ^B	5,01	17,74 ^C	2,21
5 (C/N 40; N/P10)	8,17 ^A	3,80	9,62 ^B	2,61	13,71 ^C	2,46
6 (C/N 40; N/P 15)	7,89 ^A	5,12	9,41 ^B	1,76	15,44 ^C	4,24
7 (C/N 60; N/P 5)	7,95 ^A	3,40	10,28 ^B	2,74	18,30 ^C	1,50
8 (C/N 60; N/P 10)	7,19 ^A	2,32	12,08 ^B	3,33	24,87 ^C	1,70
9 (C/N 60; N/P 15)	7,09 ^A	3,50	8,90 ^B	4,09	22,76 ^C	2,80

Médias: unidade (mg. L^{-1}); C.V.: Coeficiente de variação (%); combinações de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativa ($p \leq 0,05$), entre as concentrações de carboidratos extracelulares para cada fase de crescimento. Experimentos: 1 ao 9 conforme matriz do planejamento (Tabela 2); Média de 27 repetições.

Analisando a Tabela 6 verifica-se que a produção carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli nas diferentes condições experimentais apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$). Constata-se que as condições dos experimentos 7 (C/N 60, N/P 5), experimentos 8 (C/N 60, N/P 10) e 9 (CN 60, N/P 15) foram as mais

propícias para as produções de carboidratos extracelulares, uma vez que nestas condições se registram as maiores concentrações com valores aproximados de 18 %, 25 % e 23 %, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos a verificação da hipótese reportada por Giroldo & Vieira, 2003 do excesso de carbono fotoassimilado, que relaciona a ausência de divisões celulares com a manutenção do metabolismo celular na fase estacionária, gerando assim carboidratos não utilizados no processo de crescimento, desviados então para a excreção.

Neste contexto, observa-se ainda, que as máximas concentrações de carboidratos extracelulares foram obtidas nas fases estacionárias independente das condições dos cultivos, considerando-se que nesta etapa as células estão em pleno desenvolvimento (Figuras de 1 a 9 e Tabela 5). Isso assegura que as concentrações de carboidratos obtidas correspondem ao excretado e não ao extravasamento celular.

Os resultados estão de acordo com a literatura em que vários trabalhos relatam que a maior produção de carboidrato extracelular se dá na fase estacionária de crescimento celular (DE PHILIPPIS & VICENZINI, 1998; MORENO et al., 1998; DOUMIT & PINOTTI et al., 2004; PARIKH & MADAMWAR, 2006; MISHRA et al., 2009; MAGER & THOMAS, 2011; DONOT et al., 2012).

3.2 Avaliação do consumo de nutrientes nas condições experimentais

A literatura relata que as maiores concentrações de carboidratos extracelulares por cianobactérias são registradas quando há limitação de nitrogênio, direcionando-se o carbono consumido para a síntese de carboidratos (DE PHILLIPS & VICENZINI, 1998; MORENO et al., 1998; KNUCKEY et al., 2002; OTERO & VICENZINI, 2003; DUENÑAS et al., 2008; SIEGLER et al., 2011; PEREZ-GARCIA, 2011).

As Figuras de 11 a 19 expressam o consumo dos nutrientes expressos pela concentração de N-NTK, DQO e $P-PO_4^{-3}$, bem como, a concentração celular e de carboidratos extracelulares por *Aphanothece* no efluente da indústria de laticínios. Avaliando o comportamento destes gráficos, verifica-se, que as maiores concentrações são obtidas quando ocorreu um decréscimo significativo de N-NTK, assim como de DQO e $P-PO_4^{-3}$. A exemplo do experimento 9 (Figura 9 e Figura 19), em que elevada produção de carboidrato $24,87 \text{ mg. L}^{-1}$ é obtida, quando é registrado no meio concentrações de nitrogênio em torno de 8 mg. L^{-1} , no período que corresponde a fase estacionária de crescimento. O pleno desenvolvimento celular nestas condições, é evidenciado, quando verificamos o comportamento cinético descrito na Tabela 5, onde

um alto coeficiente de conversão de nitrogênio em células (20,03 mg de biomassa/mg de nitrogênio) é registrado, isto indica, que os carboidratos extracelulares produzidos são de células em desenvolvimento, conforme já evidenciado, podendo ainda ser corroborado pelas importantes correlações positivas obtidas entre as concentrações celulares e produção de carboidrato (Figura 20 A a I). Por outro lado, Donot et al. (2012), reportam, que em uma população microalgal, expostas a condições nas quais os nutrientes são limitantes, a excreção celular aumenta por não ocorrer divisão celular.

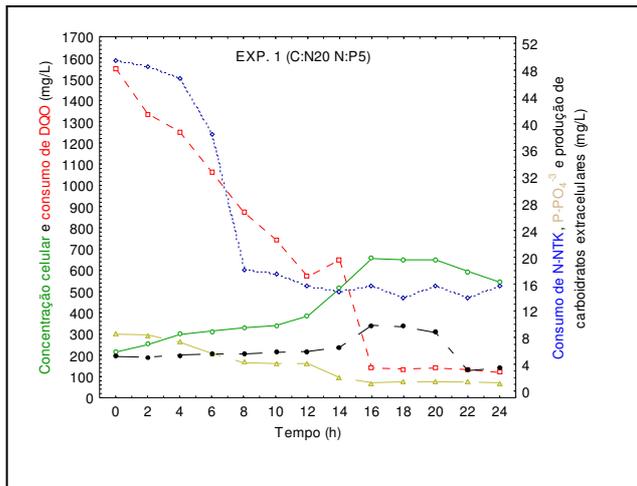


Figura 11. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanothece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 1).

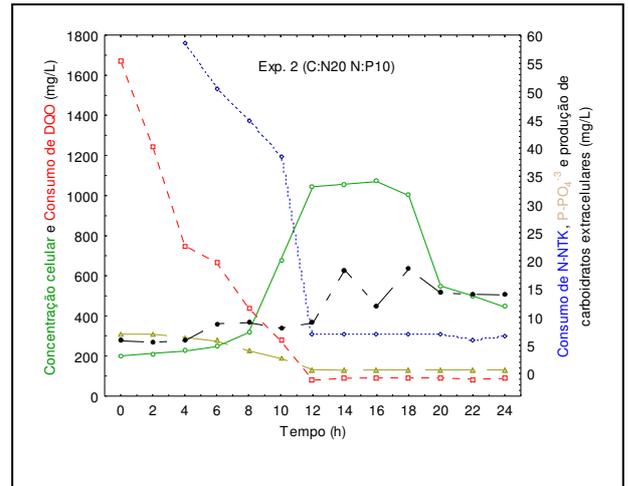


Figura 12. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanothece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 2).

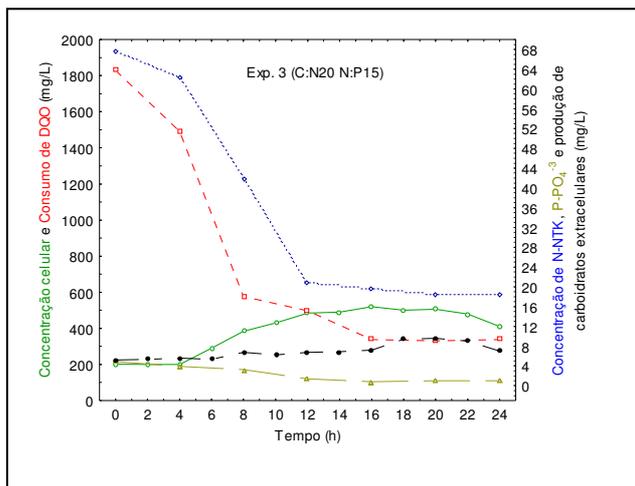


Figura 13. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanothece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 3)

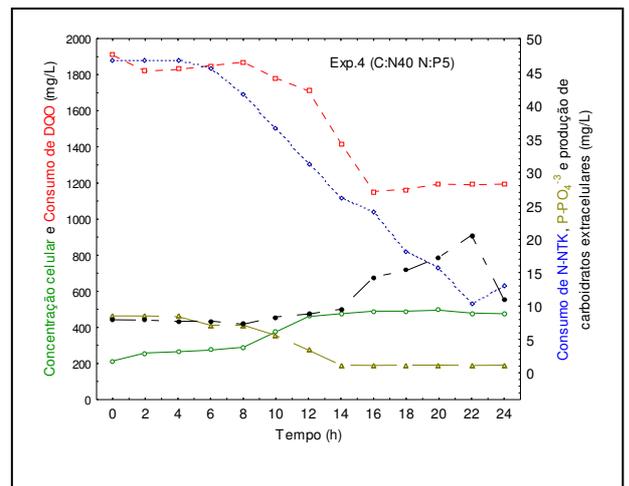


Figura 14. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanothece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 4).

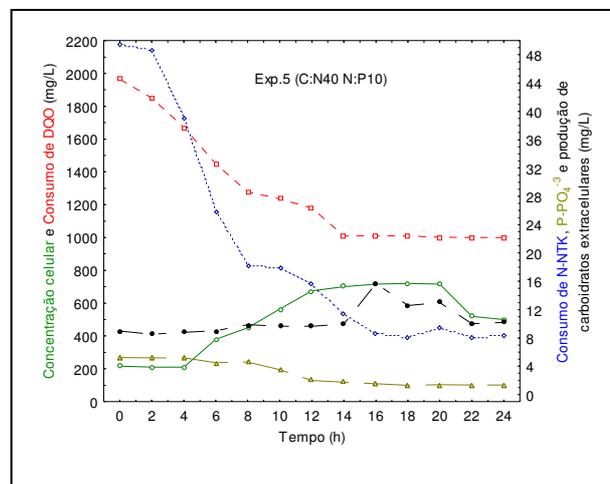


Figura 15. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanothece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 5).

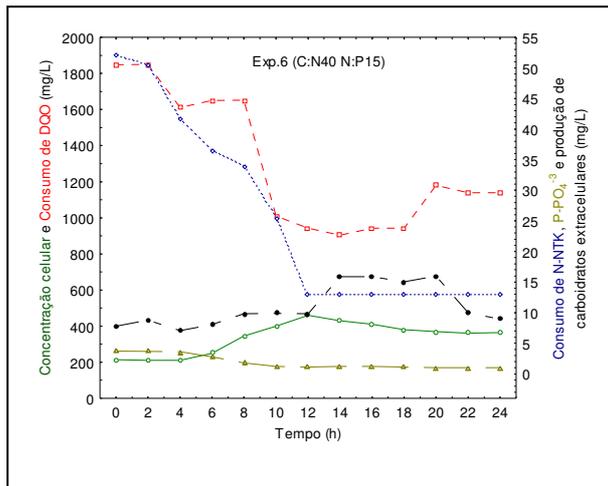


Figura 16. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanthece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 6).

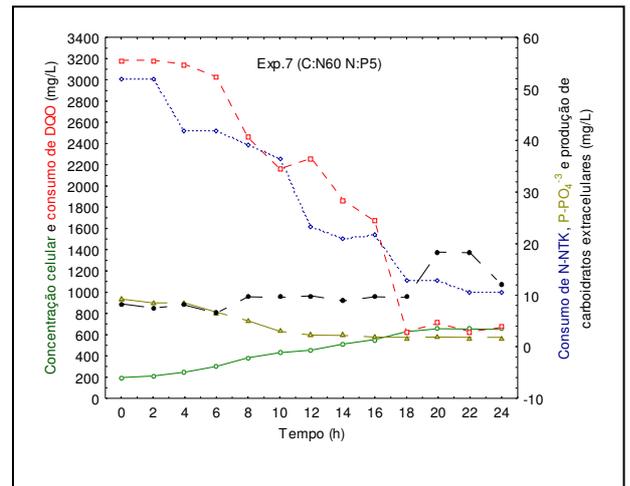


Figura 17. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanthece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 7)

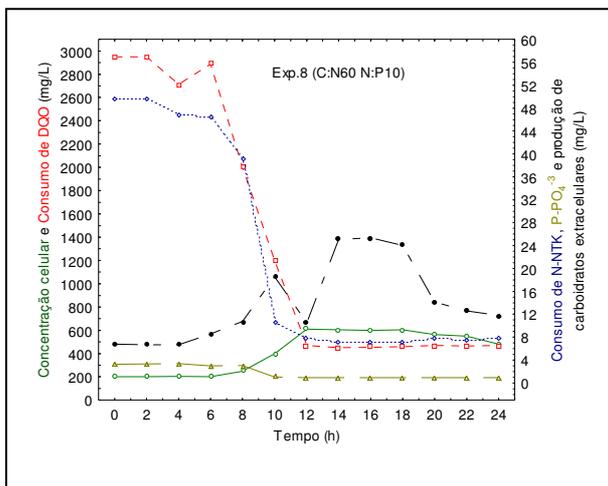


Figura 18. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanthece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 8).

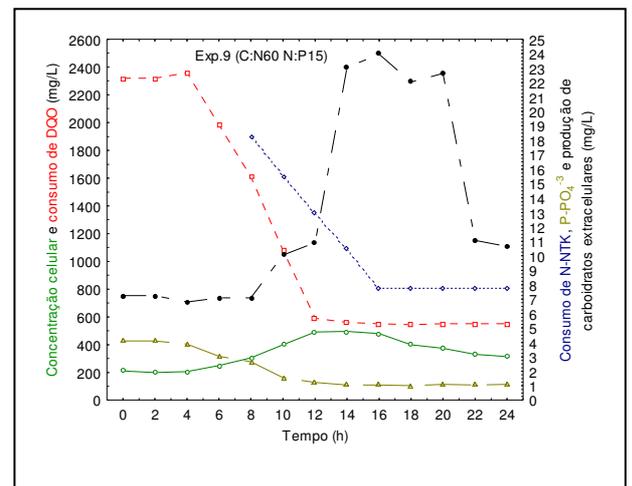


Figura 19. Variação do consumo de nutrientes do efluente de laticínios por *Aphanthece* e produção de carboidratos extracelulares (experimento 9).

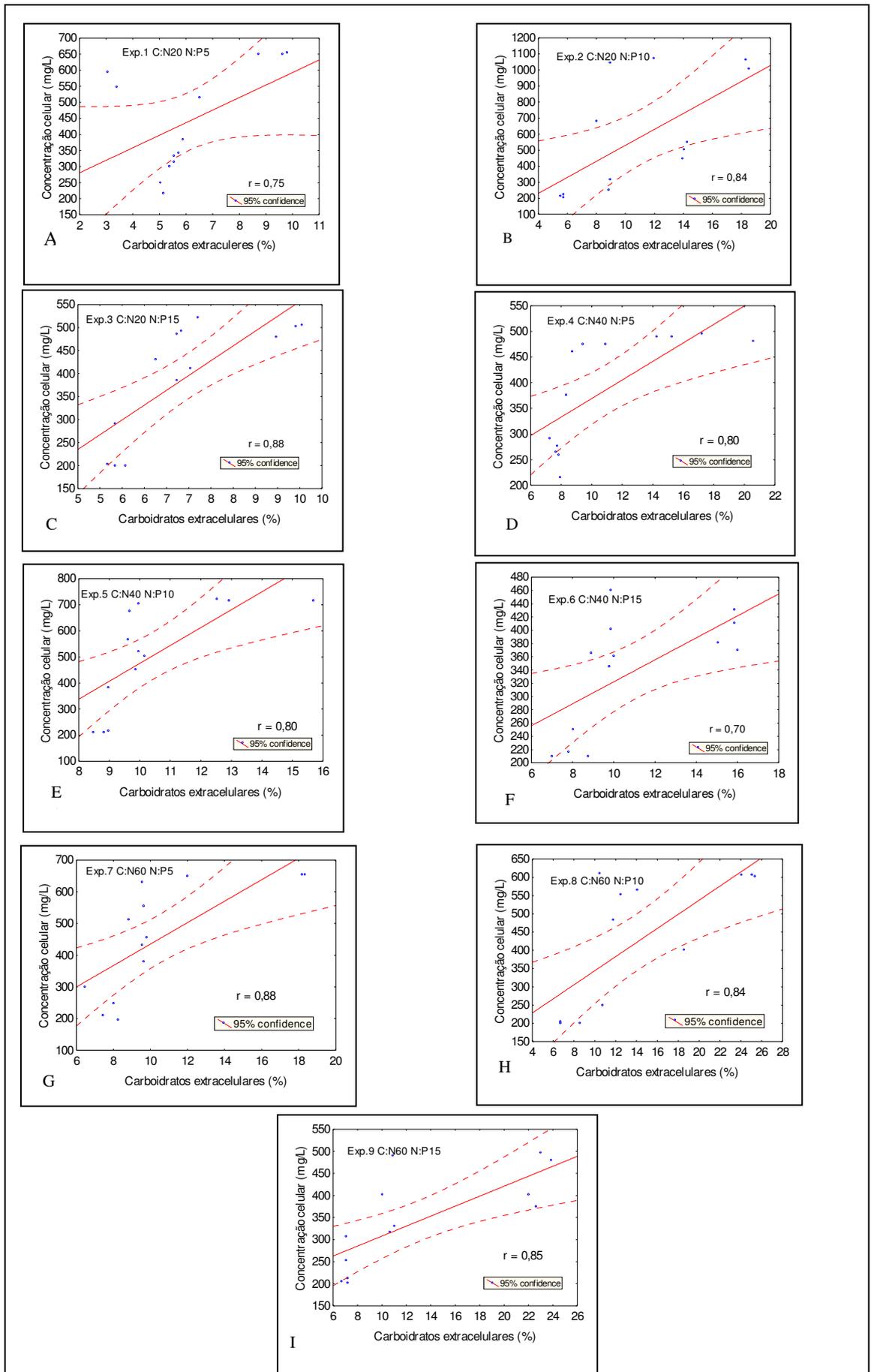


Figura 20. Correlações entre a concentração celular e de carboidratos.

Os modelos propostos para produção de carboidratos extracelulares são expressos na Tabela 7. Avaliando os dados desta Tabela, observa-se o registro de coeficientes de determinações $\geq 0,80$, valores estes que demonstram a viabilidade dos modelos quando aplicados as condições experimentais.

Tabela 7. Modelos de produção de carboidratos extracelulares nas condições dos experimentos 1 ao 9

Experimentos	Modelos	R ²
1 (C/N 20; N/P 5)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (5,83687)+(-0,7279)t+(0,116411)t^2+(-0,00381)t^3$	0,80
2 (C/N 20; N/P 10)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (5,97131)+(-0,37842)t+(0,116725)t^2+(-0,00367)t^3$	0,87
3 (C/N 20; N/P 15)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (5,55655)+(-0,27582)t+(0,051807)t^2+(-0,00151)t^3$	0,90
4 (C/N 40; N/P 5)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (9,52931)+(-1,5229)t+(0,193731)t^2+(-0,00506)t^3$	0,90
5 (C/N 40; N/P10)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (9,32395)+(-0,59235)t+(0,097207)t^2+(-0,00299)t^3$	0,80
6 (C/N 40; N/P 15)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (8,79698)+(-1,0609)t+(0,185888)t^2+(-0,00594)t^3$	0,91
7 (C/N 60; N/P 5)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (8,59195)+(-0,56181)t+(0,072118)t^2+(-0,00155)t^3$	0,80
8 (C/N 60; N/P 10)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (6,64637)+(-0,73114)t+(0,245583)t^2+(-0,00882)t^3$	0,86
9 (C/N 60; N/P 15)	$P_{\text{Carb.Extr.}} = (9,0929)+(-2,5105)t+(0,407406)t^2+(-0,01266)t^3$	0,92

$P_{\text{Carb. Extr.}}$: produção de carboidratos extracelulares (mg. L⁻¹); t: tempo de cultivo (h). R²: coeficiente de determinação.

A Figura 21 de A a I, demonstram a comparação dos valores observados e preditos segundo os modelos de produção de carboidratos extracelulares (Tabela 7) por *Aphanothece*. Observa-se que estes experimentos possuem os valores preditos muito próximos dos valores observados, confirmando a adequação dos modelos descritos.

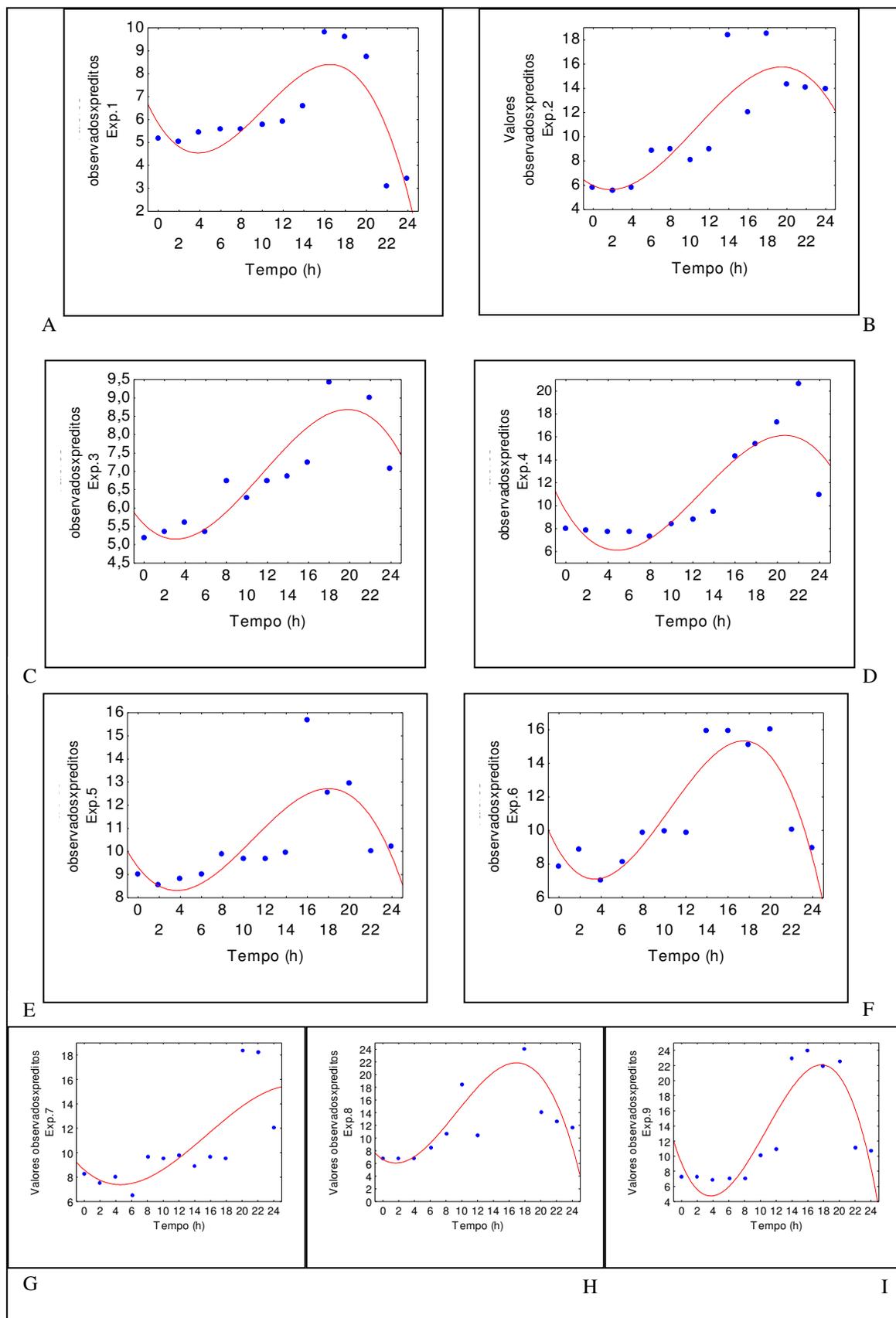


Figura 21. Valores observados e preditos, segundo os modelos de produção de carboidratos extracelulares nas condições experimentais.

3.3 Efeitos das variáveis C/N e N/P na produção e produtividade de carboidratos extracelulares.

A Tabela 8 apresenta os dados de produção e produtividade de carboidratos extracelulares, para cada fase de crescimento com base na Tabela 6 e equações da Tabela 7.

Tabela 8. Valores de produção e produtividade em carboidratos extracelulares em função das fases de crescimento

Experimento 1						
Respostas	Fase lag		Fase log		Fase estacionária	
	início	final	Início	final	início	final
Carboidratos extracelulares	t (0h)	t (8h)	t (10h)	t (14h)	t (16h)	t (18h)
	5,16	5,70	5,76	9,62	9,83	9,62
$P_{\text{fases de crescimento}}$	0,05		0,50		0,10	
P_{total}	0,24					
Experimento 2						
Carboidratos extracelulares	t (0h)	t (4h)	t (6h)	t (12h)	t (14h)	t (18h)
	5,81	5,80	8,50	8,95	18,36	18,55
$P_{\text{fases de crescimento}}$	0,00		0,01		0,05	
P_{total}	0,70					
Experimento 3						
Carboidratos extracelulares	t (0h)	t (6h)	t (8h)	t (16h)	t (18h)	t (20h)
	5,16	5,34	6,72	7,21	9,41	8,98
$P_{\text{fases de crescimento}}$	0,03		0,06		0,10	
P_{total}	0,23					
Experimento 4						
Carboidratos extracelulares	t (0h)	t (8h)	t (10h)	t (16h)	t (18h)	t (22h)
	7,92	7,26	8,35	14,31	15,30	20,60
$P_{\text{fases de crescimento}}$	0,08		0,99		1,32	
P_{total}	0,57					

Continuação Tabela 8

Experimento 5						
Carboidratos extracelulares	t (0h)	t (4h)	t (6h)	t (14h)	t (16h)	t (20h)
	8,99	8,82	9,0	9,96	16,68	12,95
$P_{\text{carboidratos extracelulares}}$	0,04		0,12		0,68	
P_{total}	0,25					
Experimento 6						
Carboidratos extracelulares	t (0h)	t (4h)	t (6h)	t (12h)	t (14h)	t (20h)
	7,81	7,41	8,07	8,85	15,86	16,0
$P_{\text{carboidratos extracelulares}}$	0,18		0,03		0,02	
P_{total}	0,40					
Experimentos 7						
Carboidratos extracelulares	*t (0h)	t (4h)	t (6h)	t (18h)	t (20h)	t (22h)
	8,29	8,07	6,5	9,59	18,38	18,2
$P_{\text{carboidratos extracelulares}}$	0,05		0,25		0,09	
P_{total}	0,45					
Experimento 8						
Carboidratos extracelulares	t (0h)	t (4h)	t (6h)	t (12h)	t (14h)	t (18h)
	6,79	6,7	8,56	16,53	25,06	24,04
$P_{\text{carboidratos extracelulares}}$	1,80		2,01		6,20	
P_{total}	0,96					
Experimento 9						
Carboidratos extracelulares	t (0h)	t (4h)	t (6h)	t (12h)	t (14h)	t (20h)
	7,24	6,80	7,09	10,92	23,05	22,63
$P_{\text{carboidratos extracelulares}}$	0,11		0,64		0,07	
P_{total}	0,77					

Produção de carboidratos extracelulares (mg. L^{-1}); $P_{\text{carboidratos extracelulares}}$: produtividade de carboidratos extracelulares em cada fase de crescimento celular ($\text{mg. L}^{-1}\text{h}^{-1}$); P_{total} : produtividade total nos experimentos de carboidratos extracelulares ($\text{mg. L}^{-1}\text{h}^{-1}$), na fase estacionária (mg. L^{-1}); t: tempo das fases de crescimento (h).

O efeito das variáveis, C/N e N/P, sob a resposta produtividade e produção total de carboidratos extracelulares, podem ser avaliados na Tabela 9. Os parâmetros não

significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 11.

Tabela 9. Efeitos das variáveis C/N e N/P sob as respostas produção e produtividade de carboidratos extracelulares

Fator	Efeito	Produção			Produtividade			
		Erro puro	t(9)	p	Efeito	Erro puro	t(9)	p
Interc.	16,60	0,11	150,66	≤ 0,01	0,54	0,01	41,28	≤ 0,01
X _{1(L)}	10,41	0,26	38,57	≤ 0,01	0,35	0,03	10,82	≤ 0,01
X _{1(Q)}	-0,85	0,23	-3,66	≤ 0,01	-0,14	0,03	-5,07	≤ 0,01
X _{2(Q)}	2,67	0,23	11,42	≤ 0,01	0,20	0,03	7,33	≤ 0,01
X _{1(L)X_{2(I)}}	2,08	0,33	6,30	≤ 0,01	0,16	0,04	4,13	≤ 0,01

X₁: Razão C/N; X₂: Razão N/P; X₁X₂: interação entre a razão C/N e N/P; Interc.: Interceptação; Err.P: Erro puro.

Avaliando-se a Tabela 9 observa-se que os termos X₁ (C/N) e X₂ (N/P) foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) tanto para a resposta produção como produtividade assim como a ação conjunta dos dois fatores (X₁X₂).

Os modelos empíricos codificados da regressão que descrevem as respostas produção (mg. L⁻¹) e produtividade (mg. L⁻¹h⁻¹), respectivamente, em função das variáveis independentes analisadas (razão C/N e N/P), são expressos pelas Equações 7 e 8 (Tabela 10).

Tabela 10. Modelos de regressão para as variáveis respostas

Modelos codificados	R ²	
Produção = 17,80638+5,20728X ₁ +0,85609X ₁ ² - 2,67020X ₂ ² +1,04255X ₁ X ₂	0,93	Eq. 7
Produtividade = 0,585484+0,174561X ₁ +0,141661X ₁ ² -0,204844X ₂ ² +0,081674X ₁ X ₂	0,95	Eq. 8

X₁: Razão C/N; X₂: Razão N/P; X₁X₂: interação entre a razão C/N e N/P; R²: coeficiente de determinação.

A eficiência estatística das equações é validada pelo teste de Fisher, em que 93 e 95 % da variabilidade das respostas produção e produtividade, respectivamente, pode ser explicada pelos modelos propostos, indicando que estes se ajustam aos dados experimentais. A 95 % de confiança o valor de F_{calculado} foi maior que três vezes o F_{crítico} (Tabelas 11) para a produção e produtividade de carboidratos extracelulares, indicando assim que os modelos propostos além de serem significativos também são estatisticamente preditivos.

Tabela 11. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados

Fonte de Variação	Produção EPS					Produtividade EPS				
	SQ	GL	MQ	F _{Calc}	F _{Crit}	SQ	GL	MQ	F _{Calc}	F _{Crit}
Regressão	366	5	73,20	11,86	3,11	1,68	5	0,25	100	3,11
Resíduo	74	12	6,20			0,03	12	0,002		
Falta Ajuste	72	3				0,05	3			
Erro Puro	1,96	9				0,02	9			
Total	440	17				1,25	17			

As Figuras 22 e 23 apresentam os diagramas das superfícies de resposta elaboradas a partir dos modelos de regressão expressos na Tabela 10, os quais descrevem o comportamento da produção e produtividade de carboidratos extracelulares em função dos fatores em estudos descritos pela matriz de planejamento experimental (Tabela 2). Observa-se que para as razões C/N 40 e 60 bem como N/P 10, níveis superiores do planejamento, resultaram em maiores produções e produtividades de carboidratos extracelulares. Fica constatado que para avaliação tanto da produção como da produtividade há a necessidade de avaliar as respostas com o efeito combinado destas variáveis independentes (C/N e N/P), uma vez que, ficou constatado efeitos de interação na ordem de 16 e 0,56 (Tabela 9), para as respostas produção e produtividade, respectivamente. Esses resultados corroboram com o comportamento das superfícies de resposta, em que pode ser observado que nas maiores concentrações e produtividade de carboidratos extracelulares, houve uma interação da razão N/P e C/N, chegando a 24 % de carboidratos extracelulares no total de carboidratos na biomassa da cianobactéria estudada, bem como com razões ajustadas de N/P 10 e C/N 60 produtividades totais de 0,96 mg. L⁻¹.h⁻¹.

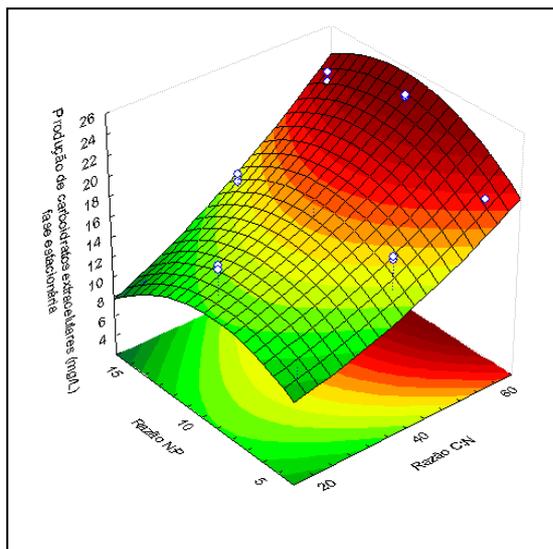


Figura 22. Superfícies de resposta para produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece*.

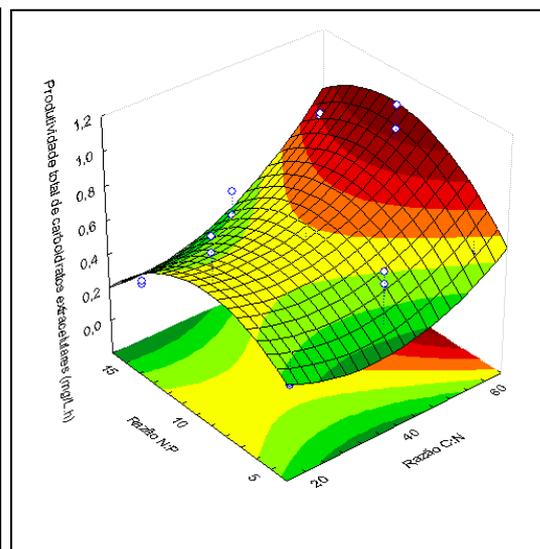


Figura 23. Superfícies de resposta para produtividade de carboidratos extracelulares por *Aphanothece*.

4 CONCLUSÃO

As razões C/N e N/P apresentaram influência significativa ao nível de confiança de 95 % na quantificação de carboidratos extracelulares. As maiores concentrações destes biocompostos foram nas maiores razões C/N e N/P, na fase estacionária de crescimento celular. Conclui-se que a melhor condição avaliada foi nos experimentos utilizando C/N 60 e N/P 10, com produção e produtividades de carboidratos extracelulares de $24,87 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,96 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 2005.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459 - 479, 2000.

BARBOSA, M. J., HOOGAKKER, J., WIJFFELS, R. H. Optimization of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 115 - 123, 2003.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Bioengineering**. Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group, p. 1 - 34, 2006.

BASTOS, G.B.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA L. Q.; QUEIROZ, M. I. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 5, p. 258 - 264, 2010.

BASTOS, R. G. et al. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 112 - 116, 2004.

BASTOS, R. G.; PAIVA, P. R.; RIGO, M.; VEIGA, G.; QUEIROZ, M. I. Cultivo de *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de açúcares. **Bioscience Journal**, v. 27, p. 156 - 161, 2011.

CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; SÁNCHEZ, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. **Water Research**, v. 36, p. 2555 - 2560, 2002.

CHAE, S. R., HWANG, E. J., SHIN, H. S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 322 - 329, 2006

DE PHILIPPIS, R., MARGHERI, M. C., PELOSI, E. VENTURA, S. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. **Journal Applied Phycology**, v. 5, p. 387 - 394, 1993.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 151 - 175, 1998.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611 - 1627, 2010.

DERNER, R. B.; OHSE, S. O.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959 - 1967, 2006.

DEVI, M. P.; SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276 - 283, 2012.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951 - 962, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 352 - 356, 1956.

DUEÑAS, M.; MUNDUATE, A.; PEREA, A.; IRASTORZA, A. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 113 – 120, 2003.

FLORES, E.; HERRERO, A. **Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation**. In: BRYANT, D.A. The molecular biology of cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 409 - 435, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p 549 - 579, 2000.

GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H.; PAULSEN, B. S. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). **Journal Phycology**, v. 39, p. 1109 - 1115, 2003.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Anaerobic hidrolisis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. **Water Research**, v. 33, p. 3281 - 3290, 1999.

HARUN, R.; SINGH, R. M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037 – 1047, 2010.

HEREDIA-ARROYO, T. WEI, W.; RUAN, R. HU, B Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245 - 2253, 2011.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978 - 1995, 2010.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. **Evaluation of the growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in effluent of fishing industry**. In: CHISA – 16 th International Congress of Chemical and Process Engineering. Prague, 2004.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; PINTO, L.A.A.; QUEIROZ, M. I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 63 - 69, 2007a.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G; FRANCO, T. T. Rates of CO₂ removal by in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1365 - 1373, 2007b.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M.; QUEIROZ, M. I. Caracterização da fração protéica da cianobactéria cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482 - 488, 2006.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIN, M.; DE BOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4199 - 4205, 2007.

KAWAI, L. A.; PINOTTI, M. H. P.; CELLIGOI, M. A. P. C. Exopolysaccharide production by the cyanobacteria *Nostoc* sp in different concentrations of nitrogen and glucose. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, p. 33 - 39, 2006.

KNUCKEY, R. M.; BROWN, M. R, ROBERT R, FRAMPTON DMF. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, p. 300 – 313, 2006.

LAI, J.; YU, Z.; SONG, X.; CAO, X.; HAN, X. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 405, p. 6 – 17, 2011.

LEE, J. B.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; SANKAWA, U. Structural Analysis of Calcium Spirulan (Ca-SP)-Derived Oligosaccharides Using Eletspray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 136 - 138, 2000.

LEE, W. Y.; PARK, Y.; AHN, J. K.; KA, K. H.; PARK, S. Y. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 249 – 254, 2007.

MAGER, D. M.; THOMAS, A. D. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: A review of their role in dryland soil processes. **Journal of Arid Environments**, v. 75, p. 91 - 97, 2011.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3382 – 3386, 2009.

MORENO, J. VARGAS, M. A.; OLIVARES, H.; RIVAS, J.; GUERREIRO, M. G. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 175 - 182, 1998.

MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3949 - 3964, 2008.

MYERS, R. H. MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.

OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* z for efficient production of α -tocopherol. **Journal Apple Phycology**, v. 10: p. 67 - 74, 1998.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 143 - 153, 2003.

PAPA, J. L. **Visão geral: tratamento de efluentes em laticínios**. In: Seminário "Efluentes de laticínios: Alternativas Tecnológicas e Viabilidade Econômica". ITAL, 2000.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1822 - 1827, 2006.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, E. Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11 - 36, 2011a.

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 190 - 199, 2011b.

PRZYTOCKA-JUSIAK, M. Growth and Survival of *Chlorella vulgaris* in high concentrations of nitrogen. **Actamicrobiol**, v. 25, p. 287 - 289, 1976.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, R. G.; ALMEIDA, T. L. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 9, p. 112 - 116, 2004a.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in batch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 130 - 141, 2004b.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O. Efeito da razão C/N e do inóculo na remoção de nitrogênio do efluente da indústria da pesca pela cianobactéria. **Revista Veter**, v. 15, p. 25 - 32, 2005.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; ROSA, L. S.; GOLDBECK, R. Nutricional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Microbiological Research**, v. 101, p. 7107 - 7111, 2006.

QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q, BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2163 - 2169, 2007.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438 – 3443, 2011.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 01 - 61, 1979.

ROMANO, I.; BELLITTI, R.; NICOLAUS, B.; LAMA, L.; MANCA, M.C.; PAGNOTTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina genus*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 560 - 568, 2000.

SARKAR, B; CHAKRABARTI, P.P; VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. Wastewater treatment in dairy industries—possibility of reuse. **Desalination**, v. 195, p. 1 – 3, 2006.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Englewood Cliffs: Prentice Hall International Inc., 1992.

SIEGLER, H. H.; BEN-ZVI, A.; BURRELL, R. E.; MCCAFFREY, W. C. The dynamics of heterotrophic algal cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5764 - 5774, 2011.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41 - 46, 1998.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 145 - 151, 2000

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A. (Ed.) **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004. p. 3 - 19.

WANG, Y.; HUANG, X.; YUAN, Q. Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic/aerobic membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1733 - 1739, 2005.

YUE, L., CHEN, W. Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 46, p. 1896 - 1846, 2005.

YUNES, JS. Florações de microcystis na Lagoa dos Patos e o seu estuário: 20 anos de estudos. **O ecologia Brasiliensis**, v. 13, p. 313 - 318, 2009.

ARTIGO 3

**SEPARAÇÃO DE BIOMASSA DO EFLUENTE DE LATICÍNIO E
PERSPECTIVA DE REÚSO DA ÁGUA RESIDUÁRIA**

SEPARAÇÃO DE BIOMASSA DO EFLUENTE DE LATICÍNIO E PERSPECTIVA DE REÚSO DA ÁGUA RESIDUÁRIA

SILVA-MANETTI, Adriana G.; QUEIROZ, Maria I.

Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos Laboratório de Biotecnologia. Rio Grande – RS. E-mail: biotecnofurg@yahoo.com.br; E-mail: mariaisabel.queiroz@pesquisador.cnpq.br

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos coagulantes cloreto férrico, sulfato de alumínio e tanino na separação de biomassa gerada no efluente da indústria de laticínios e reúso da água residuária. Os cultivos foram conduzidos heterotroficamente usando o efluente de laticínios como meio de cultura em biorreatores de coluna de bolhas nas condições de inóculo de 200 mg. L⁻¹, pH ajustado a 7,6, reator isotérmico operando na temperatura de 30°C e tempo de detenção hidráulico de 16 h, C/N 60 e N/P 10. A definição da melhor condição para a separação da biomassa foi obtida, utilizando um planejamento experimental fatorial com três níveis (3²), com os fatores: concentração do coagulante (50 mg L⁻¹; 300 mg L⁻¹; 550 mg L⁻¹) e pH (6,0; 7,0; 8,0) realizados para os três coagulantes. Os ensaios foram realizados em Teste de Jarros, agitação rápida de 110 rpm/30s, lenta de 50 rpm/10s e tempo de sedimentação de 15 min. Foram consideradas como respostas: demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (N-NTK), fósforo (P-PO₄⁻³), turbidez, sólidos suspensos (SS), ST (sólidos totais), SF (sólidos fixos) e SV (sólidos voláteis). No tratamento terciário, visando o reúso do efluente, foi utilizado um sistema de microfiltração constituído por membrana de poli(imida), diâmetro externo das fibras entre 0,6 e 1,0 mm e diâmetro médio de poros na superfície externa entre 0,1 e 0,4 µm. O efluente após tratamento com a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, ação do coagulante e membrana filtrante foi caracterizado segundo os parâmetros de reúso em sistemas de refrigeração, bem como comparado à Portaria 518 do Ministério da Saúde/2004 para potabilidade de água. Nas condições experimentais foi possível concluir que o tipo de coagulante, concentração e pH do efluente influenciam significativamente, ao nível significância de 5 % de probabilidade na separação da biomassa de *Aphanothece*, constatado através dos parâmetros considerados como respostas. Os resultados indicaram aumento da eficiência de remoção dos parâmetros respostas, quando utilizou-se tanino, seguido do FeCl₃ e Al₂(SO₄)₃. A melhor condição indicada foi 300 mg. L⁻¹ de tanino em pH 7,0 na separação da biomassa com eficiência de remoção de DQO, Turbidez e SS de até 91 %, 96 % e 96 %. No que se refere ao reúso da água residuária, os resultados demonstraram que a associação do tratamento por *Aphanothece*, coagulantes e microfiltração é eficaz quando se visa o reúso do efluente de laticínios e se adéqua as características de potabilidade da água.

Palavras-chave: *Aphanothece*; Água residuária; Cianobactéria; Coagulantes; Membrana filtrante.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effect of ferric chloride, aluminum sulphate and tannin coagulants in the separation of the biomass generated in the effluent from the dairy industry and reuse of wastewater. The cultures were conducted heterotrophically using dairy effluents as culture medium in bubble column bioreactors under the following conditions, inoculum concentration of 200 mg L^{-1} , pH adjusted to 7.6, isothermal reactor operating at a temperature of 30°C and a hydraulic retention time of 16 hours, C/N 60 and N/P 10. The definition of the optimum conditions for the separation of biomass was obtained using a factorial experimental design with three levels (3^2), with factors: coagulant concentration (50 mg L^{-1} , 300 mg L^{-1} , 550 mg L^{-1}) and pH (6.0, 7.0, 8.0) performed for the three coagulants. Assays were performed in test jars, rapid stirring of 110rpm/30s, and slow stirring at 50 rpm/10s and a settling time of 15 minutes. Chemical oxygen demand (COD), total nitrogen (TKN-N), phosphorus (P-PO_4^{-3}), turbidity, suspended solids (SS), TS (total solids), FS (fixed solids) and VS (volatile solids) were considered as responses. In the tertiary treatment, in order to reuse the waste water, a microfiltration system comprising a membrane of poly (imide) was used, with an external diameter of the fibers between 0.6 and 1.0 mm and average pore diameter on the outer surface of 0.1 and $0.4 \mu\text{m}$. The effluent after treatment with the *Aphanothece microscopica* Nägeli, coagulant action and filter membrane was characterized according to the reuse parameters in refrigeration systems, as well as in comparison to ordinance 518 of the Ministry of Health/2004 for potable water. Under the experimental conditions it's possible to conclude that the coagulant type, concentration and the pH significantly affect the effluent at the level of significance of 5% for the separation of the biomass of *Aphanothece*, determined by the parameters considered as responses. The results showed increased removal efficiency parameter responses when tannin was used, followed by FeCl_3 and $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. The best condition indicated was 300 mg L^{-1} of tannin at pH 7.0 in the separation of biomass with COD removal efficiency, turbidity and SS of up to 91 %, 96 % and 96 %. Regarding the reuse of wastewater, the results showed that the association of treatment by *Aphanothece*, coagulants and microfiltration is effective when one aims to reuse the dairy effluents and fits the characteristics of the drinking water.

Keywords: *Aphanothece*; Cyanobacteria; Coagulants; Filter membrane; Wastewater;

1 INTRODUÇÃO

O reúso planejado das águas residuárias não é um conceito novo, é praticado há muitos anos. No entanto, com o crescimento concomitante do binômio demanda da água-população, o reúso intencional de efluentes agroindustriais deve ser cada vez mais considerado no planejamento e explorado, uma vez que o reúso da água reduz a demanda sobre os mananciais de água e contribui para a escassez deste bem (BALLANEC et al., 2002; UDUMAN et al., 2010; DE GODOS et al., 2011; SILVA-MANETTI et al., 2011).

Entre as alternativas existentes para viabilizar o reúso das águas, pode-se citar o desenvolvimento de tecnologias que não somente visem o reúso da água residuária

propriamente dita, mas também associe o tratamento deste efluente com o uso de sistemas de tratamentos alternativos, como o uso de cianobactérias. Estes sistemas de tratamento utilizando micro-organismos, não somente irá contribuir para a reutilização das águas residuárias geradas como também a formação de biomassa rica em biocompostos. No entanto, sua separação se torna onerosa uma vez que células de microalgas são negativamente carregadas, como resultado da adsorção de íons provenientes de matéria orgânica e dissociação ou ionização destes grupos funcionais superficiais (MOLINA-GRIMA et al., 2003; CHEN & YEH, 2005; UDUMAS et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2011; CHEN et al., 2012).

O uso de coagulantes entra como uma boa alternativa visando sua coagulação, em que irá interromper a estabilidade do sistema, com isso a sedimentação das células pode ser obtida. Coagulantes a base de ferro, alumínio ou taninos irão neutralizar ou reduzir a carga de superfície, destes micro-organismos. Essas técnicas associadas ao uso de membranas filtrantes irão contribuir para o possível reúso dos efluentes gerados (MOLINA-GRIMA et al., 2002; BILAVONIC et al., 2009; UDUMAN et al., 2010; DE GODOS et al., 2011; SILVA- MANETTI, et al., 2011). As técnicas de separação por membranas apresentam as vantagens de operar sem aditivos e possibilitar a separação seletiva de materiais possibilitando que a água gerada seja passível de ser reutilizada (VOURCH et al., 2006; FARIZOGLU & UZUNER, 2011; LUO et al., 2012).

A associação de cianobactérias a processos físicos e químicos com intuito do reúso da água residuária tratada é destacada em uma gama de trabalhos, com importantes resultados, destacando entre estes, principalmente a aplicação de processos que envolvem a coagulação/floculação, na fase de separação da biomassa, seguido da separação de compostos residuais do efluente submetido ao tratamento biológico (KIM et al., 2005; SARKAR et al., 2005; CHEN et al., 2005; HAMDANI et al., 2005; SILVA et al., 2009; SILVA-MANETTI et al., 2011; BELTRAN-HEREDIA., 2010; LUO et al., 2012). Neste contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos coagulantes cloreto férrico, sulfato de alumínio e tanino na separação de biomassa gerada a partir do cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria de laticínios e perspectiva do reúso da água residuária.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

2.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RS Man92, cedidas pela a Unidade de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio Grande isoladas do estuário da cidade de Rio Grande, RS, Brasil, foram cultivadas e mantidas em meio BG-11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por Rippka et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 25°C e pH 7,6 (QUEIROZ et al., 2004). O cultivo foi realizado em reator de vidro em câmara otimizada quanto à luz e temperatura. Foram utilizadas lâmpadas incandescentes e fluorescentes com intensidade luminosa e temperatura controlada. A intensidade luminosa foi otimizada em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG-11 é composto por $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0,04 g.L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,075 g.L⁻¹), Na_2CO_3 (2 g.L⁻¹), $NaNO_3$ (1,5 g.L⁻¹), EDTA (0,001 g.L⁻¹), H_3BO_3 (2,86 g.L⁻¹), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,81 g.L⁻¹), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,222 g.L⁻¹), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,39 g.L⁻¹), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,079 g.L⁻¹), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,040 g.L⁻¹), $C_6H_8O_7$ (0,006 g.L⁻¹) e $FeC_6H_5O_7 (NH_4)_{22}HC_6H_5O_7$ (0,006 g.L⁻¹) (RIPPKA et al., 1979).

A concentração celular na fase exponencial para tomada dos inóculos foi determinada gravimetricamente mediante filtração de volume conhecido de meio de cultura BG-11 contendo as células do micro-organismo. A cultura foi filtrada em filtro Millipore de porosidade 0,45 µm, previamente seco a 60°C por 24 h. Os filtros foram secos até peso constante e a biomassa quantificada.

2.2 Efluente

A água residuária do processamento de laticínios foi utilizada como meio de cultivo. O efluente foi obtido em uma indústria de processamento de produtos lácteos (Pelotas, RS), coletado na saída do tanque de equalização da estação de tratamento de efluentes. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e congeladas a -18°C. A Tabela 1 apresenta as características do efluente utilizado nos experimentos.

Tabela 1. Características do efluente de laticínios utilizado nos experimentos

Parâmetros	Efluente bruto		*Efluente após trat. biológico	
	Média	C.V.	Média	C.V.
DQO	2949	24,25	455	21,55
N-NTK	49,48	20,45	6,95	25,08
P-PO ₄ ⁻³	4,82	14,40	0,85	16,63
Turbidez	178	12,75	315	13,67
SS	260	14,65	643	11,65
ST	2900	12,48	2215	11,60
SF	823	14,18	1123	20,32
SV	2078	14,94	817	13,90

Parâmetros em mg. L⁻¹ exceto turbidez (NTU); C.V.: coeficiente de variação (%); *Efluente tratado por *Aphanothece*. Dados amostrais referentes há 36 meses.

2.3 Planejamento experimental

Os ensaios de coagulação/floculação da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli foram realizados segundo três planejamentos fatoriais completos 3² resultando em 27 ensaios em triplicata. Os fatores em estudo foram concentração do coagulante e pH do efluente em três níveis (SILVA-MANETTI, et al., 2011). Foram utilizados os coagulantes, cloreto férrico, sulfato de alumínio e tanino (Tanfloc-SG, Tanac), polímero catiônico, obtido por meio de um processo de lixiviação da casca da acácia negra, constituído basicamente de tanato quaternário de amônia, certificado pela *National Saneament Federal* – USA (TANAC, 2008).

Os níveis e variáveis dos valores reais e codificados para os coagulantes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental

Tratamento	Valores reais e codificados	
	X ₁	X ₂
1	-1 (50)	-1 (6,0)
2	0 (300)	-1 (6,0)
3	+1 (550)	-1 (6,0)
4	-1 (50)	0 (7,0)
5	0 (300)	0 (7,0)
6	+1 (550)	0 (7,0)
7	-1 (50)	+1 (8,0)
8	0 (300)	+1 (8,0)
9	+1 (550)	+1 (8,0)

X₁: concentração de coagulante; X₂: pH

De acordo com as resposta do planejamento experimental os efeitos de cada variável, foram calculados e as interações entre eles determinadas. As superfícies de respostas foram obtidas, através da definição de modelos empíricos, segundo a Equação 1.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Equação 1

Onde: X₁ e X₂ são os níveis codificados das variáveis independentes; β é o coeficiente de regressão (β_0 : intercepção; β_1 e β_2 : linear; β_{12} : interação e β_{11} , β_{22} : coeficientes quadráticos).

2.4 Desenvolvimento dos experimentos

Experimentos em triplicata na ausência de luz de acordo com o planejamento experimental (Tabela 2) foram conduzidos em reator de mistura completa em sistema descontínuo com capacidade de 4,5 L, constituído de uma extensão cilíndrica de PVC com dimensões de 100 cm de altura e 10 cm de diâmetro. O sistema de dispersão de gases do reator consistiu em um difusor de ar de 1,5 cm localizado no centro da base da coluna para promover a aeração de 1 VVM e agitação do meio. A cada experimento o efluente da indústria de laticínios foi descongelado e então esterilizados a 1,1 kgf.cm⁻² (120°C) por 15 min para realização dos experimentos. Estes foram conduzidos em

câmara com controle de temperatura (TC-401), da marca Tecnal. No efluente previamente ajustado a pH 7,6, células de *Aphanothece microscopica* Nägeli foram inoculadas. As condições dos cultivos foram: inóculo de *Aphanothece* de 200 mg. L⁻¹, pH do meio ajustado a 7,6, 30°C, ausência de luminosidade, razão C/N 60 e N/P 10. O tempo de residência celular foi de 16 h.

Para separar a biomassa, foram realizados ensaios em teste de jarros (Jar-Test Milan- Modelo JT 101), com seis jarros, com capacidade de 2000 mL, altura de 19 cm e largura de 12,5 cm. Foi utilizada agitação rápida de 110 rpm durante 30 s, seguida de etapa lenta com velocidade de 50 rpm durante 10 s e tempo de sedimentação de 15 min (SILVA-MANETTI, 2011).

A qualidade do líquido clarificado foi avaliada quanto à remoção dos parâmetros descritos na Tabela 1, calculados através da eficiência de remoção conforme equação 2.

$$E = \left(1 - \frac{C_B}{C_A} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

C_A = Concentração do constituinte no efluente antes da adição do coagulante;

C_B = Concentração do constituinte após o tratamento com coagulante.

2.5 Avaliação do reúso da água residuária

Após a coagulação da biomassa o efluente gerado foi filtrado em sistema de microfiltração fabricado pela empresa PAM – Membranas Seletivas. As membranas são de poliamida, do tipo fibras ocas, possuindo diâmetro externo entre 0,8 e 0,9 mm e poro nominal de 0,4 µm. O módulo de membranas possui 1 m² de área útil e a alimentação é feita pelo casco do tubo, sendo que o permeado é recolhido pelo interior das fibras com área nominal (0,05 m²) de permeação. As operações de micro filtração foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C) e pressão de 0,2 bar.

A avaliação da eficiência do sistema foi realizada através de análises da concentração dos parâmetros no permeado. Os parâmetros analisados seguiram as determinações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) com base nos componentes indicados por *Guidelines for Water Reuse, US Environmental Protection Agency Report* para reúso de águas em sistemas de refrigeração (EPA, 1992), sendo eles: sílica, amônia, ST, SS, turbidez, DQO, dureza,

alcalinidade, pH, sulfato, fósforo, alumínio, cálcio, magnésio, manganês, ferro e coliformes totais. Os coliformes totais foram determinados através do método dos tubos múltiplos (SILVA, 1997). A turbidez foi medida em turbidímetro da marca Termo Orion, modelo Aquafast II.

2.6 Análise Estatística

Na análise estatística foram considerados os efeitos das variáveis independentes sobre a resposta eficiência de remoção dos componentes avaliados. O modelo (regressão) gerado, conforme Equação 1 foi avaliado por meio de análise de variância (ANOVA) e sua validade ou grau de ajuste determinado por meio de teste F, que consiste em relacionar o valor de $F_{\text{calculado}}$ (F_{calc}) com o valor de F_{tabelado} (F_{Tab}) (ANEXO), se o valor de F_{calc} pela ANOVA for maior que o F_{Tab} , a regressão obtida ajusta os pontos experimentais de forma satisfatória, validando o modelo no intervalo de confiança estudado (MYERS & MONTGOMERY, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção do coagulante

3.1.1 Eficiências de remoção e efeito do cloreto férrico no tratamento e separação de biomassa

A Tabela 3 apresenta as eficiências de remoção das variáveis respostas, utilizando FeCl_3 , segundo o planejamento experimental.

Tabela 3. Eficiência de remoção dos parâmetros avaliados utilizando o coagulante cloreto férrico

*Tratamentos	Resultados							
	E-DQO (%)	E-N-NTK (%)	E-P-PO ₄ ⁻³ (%)	E-turbidez (%)	E-SS (%)	E-ST (%)	E-SF (%)	E-SV (%)
1	91	23	8	73	68	12	11	14
2	95	44	8	96	88	22	4	63
3	92	30	6	28	75	15	4	40
4	82	24	23	62	71	20	17	36
5	90	57	51	84	85	22	9	53
6	96	52	35	92	95	24	8	58
7	78	23	10	61	65	20	17	27
8	87	32	47	70	87	26	15	49
9	95	9	30	87	69	30	11	72

*Tratamentos: de acordo com a matriz do planejamento experimental (Tabela 2); E-DQO: eficiência de remoção da demanda química de oxigênio; E-N-NTK: eficiência de remoção de nitrogênio total Kjeldahl; E-P-PO₄⁻³: eficiência de remoção de fósforo; E-turbidez: eficiência de remoção de turbidez; E-SS: eficiência de remoção de sólidos suspensos; E-ST: eficiência de remoção de sólidos totais; E-SF: eficiência de remoção de sólidos fixos; E-SV: eficiência de remoção de sólidos voláteis.

O processo de coagulação/floculação utilizando sais inorgânicos, que incluem alumínio e ferro, polímeros sintéticos ou naturais, são técnicas padrões, reconhecidamente, utilizadas em tratamento de efluentes para remoção de sólidos suspensos (SS), DQO e turbidez (AGUILAR et al., 2002; EBELING et al., 2003; ALMUTAIRI et al., 2004; HAMADANI et al., 2005; SARKAR et al., 2006; HENDERSON et al., 2008; VOURCH et al., 2008; UDUMAN et al., 2010). Esta constatação se reflete, nas importantes remoções de DQO (96 %), bem como de nitrogênio (57 %), fósforo (51 %) e até (96 %) de turbidez, obtidas neste trabalho. Salienta-se, que as maiores remoções, foram registradas para DQO e SS independente da condição avaliada.

Os elevados índices de remoção de turbidez podem ser atribuídos a propriedade do cloreto férrico, apresentar cerca de duas a três vezes mais cargas positivas por peso seco de coagulante, do que por exemplo, o sulfato de alumínio e com isso possibilitando a formação de hidróxidos insolúveis de ferro de baixa solubilidade que podem agir sobre ampla faixa de pH, resultando com isso na remoção de determinadas impurezas na

ordem de 100 % (Al-MUTAIRI et al., 2004; AMUDA & AMOO, 2007; SILVA et al., 2009; SILVA-MANETTI et al., 2011).

A superioridade quanto a eficiência do cloreto férrico em relação ao sulfato de alumínio, é constatada na Tabela 6. Nos processos de separação de microalgas dos meios de cultivo, isso tem sido relatado por diferentes autores (LEE et al., 2001; DE GODOS et al., 2011; SILVA-MANETTI et al., 2011).

Silva-Manetti et al. (2011) avaliaram o desempenho do cloreto férrico e do sulfato de alumínio em diferentes combinações de concentração e pH na remoção de biomassa e tratamento do efluente da indústria de pescado. Estes autores verificaram que os coagulantes empregados foram eficientes tanto na remoção de biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli como quando se visava o tratamento do efluente, indicando que a melhor remoção ocorreu na condição de 300 mg. L⁻¹ de cloreto férrico em pH 7,0. As máximas eficiências de remoção de DQO (85 %), sólidos em suspensão (93 %), turbidez (97 %), bem como remoções dos parâmetros fósforo total e N-NTK de 86,7 % e 5,9 %, respectivamente. Neste trabalho, é também verificada a eficiência do cloreto férrico em relação ao sulfato de alumínio na separação da biomassa do meio de cultivo, o que torna-se evidente, quando se compara os dados de remoções efetuados quando se utiliza o cloreto férrico (Tabela 3) e quando se utiliza o sulfato de alumínio (Tabela 6).

O processo de coagulação é influenciado por uma série de fatores como, tipo e concentração dos íons do meio, temperatura, homogeneidade da mistura, tempo de mistura e floculação bem como o pH do efluente (MORAIS, 2007; SILVA et al., 2009; CHEN et al., 2008; LIANG et al., 2009; PARK & YOON 2009; MOGHADDAM et al., 2010; KUSHWAHA et al., 2010; MASSÉ & MASSÉ et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2011). Tomando como base pH do efluente e concentração de cloreto férrico na análise da Tabela 3, as melhores condições são indicadas para os experimentos: 2 (300 mg.L⁻¹ pH 6,0; 5 (300 mg.L⁻¹ pH 7,0) e 6 (550 mg.L⁻¹ pH 7,0), considerando as eficiências de remoção superiores a 80 %, para os parâmetros DQO, turbidez e SS. Esta constatação é corroborada pelo comportamento da Figura 1 de A a F, onde se avalia a influência dos efeitos e significância das variáveis independentes.

Avaliando a Figura 1 de A a H, observa-se, de forma geral, influência significativa ($p \leq 0,05$), para as respostas em análise, apresentando a concentração maior efeito nas respostas, exceto para P-PO₄⁻³ e ST, exercendo o pH efeito positivo para todas as variáveis estudadas.

Estes resultados são equivalentes aos encontrados por Silva-Manetti et al. (2011), ao estudar o desempenho do cloreto férrico para tratamento físico-químico e separação de biomassa microalgal, desenvolvida no efluente da indústria da pesca. Os autores verificaram que tanto o tipo e concentração de coagulante e pH do efluente apresentavam influência significativa, ao nível de confiança de 95 % nas eficiências de remoção de DQO, turbidez e sólidos.

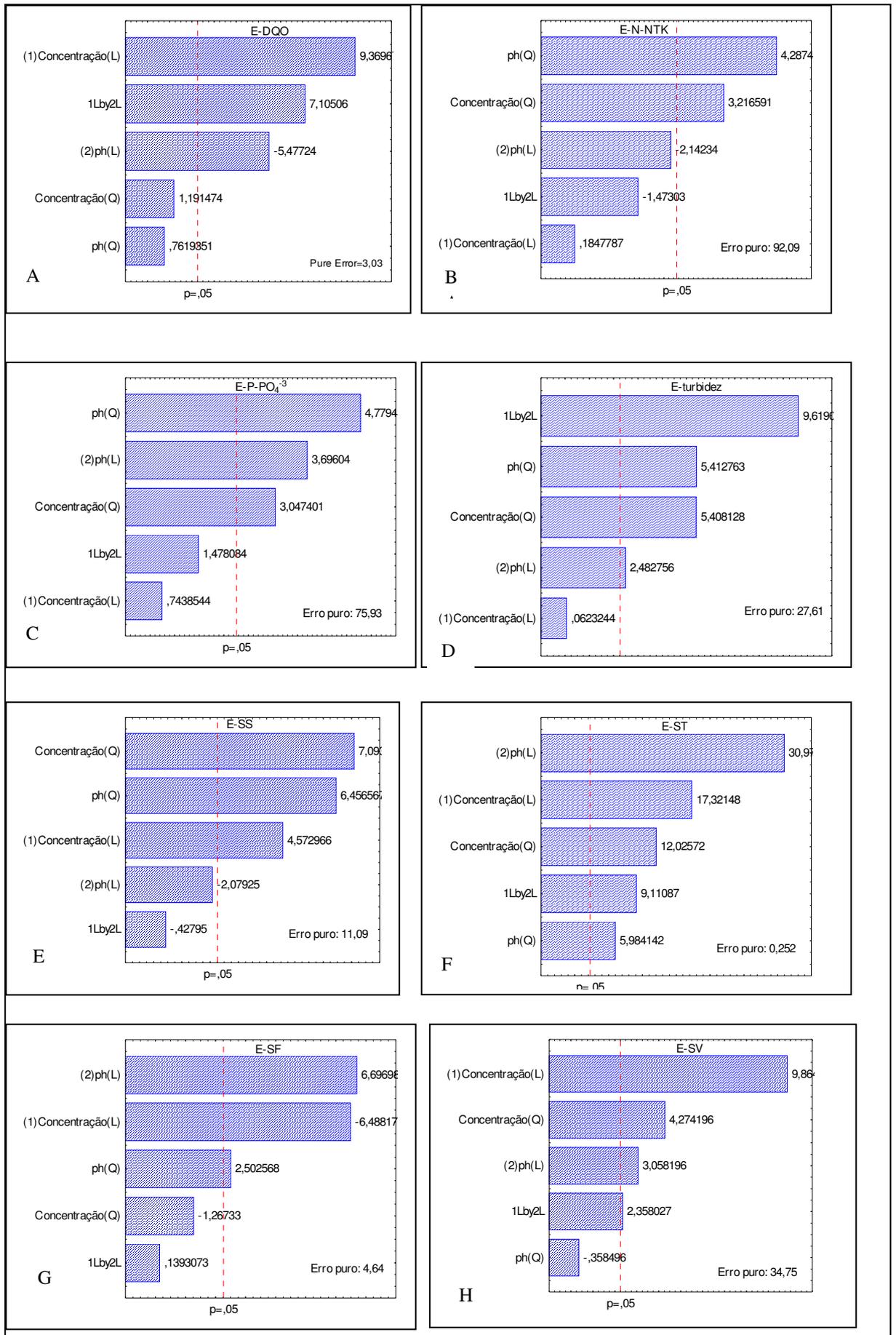


Figura 1. Gráfico de Pareto para as respostas remoção dos parâmetros avaliados ($p \leq 5\%$).

A Tabela 4 apresenta os modelos polinomiais na forma codificada gerados a partir da análise de regressão para as respostas eficiência de remoção de DQO, N-NTK, P-PO₄⁻³, turbidez, SS, ST, SF e SV, quando utiliza-se o coagulante FeCl₃. Os modelos foram gerados somente a partir dos parâmetros estatisticamente significativos ao nível de 95 % de confiança para as respostas.

Tabela 4. Modelos de regressão para as variáveis respostas

Modelos Codificados	R ²	
E-DQO = 89,98517 + 4,71509.X ₁ - 2,75630.X ₂ + 4,37904.X ₁ .X ₂	0,91	Eq. 3
E-N-NTK = 58,5034 - 15,4343.X ₁ ² - 20,5728.X ₂ ²	0,80	Eq. 4
E-P-PO ₄ ⁻³ = 46,2789 - 13,278.X ₁ ² + 9,2978.X ₂ - 20,8247.X ₂ ²	0,80	Eq. 5
E-turbidez = 93,2270 - 14,2111.X ₁ ² + 3,7666.X ₂ - 14,2233.X ₂ ² - 17,8730.X ₁ .X ₂	0,80	Eq. 6
E-SS = 94,4393 + 4,3965.X ₁ - 11,816.X ₁ ² - 10,7515.X ₂ ²	0,80	Eq. 7
E-ST = 24,77184 + 2,51159.X ₁ - 3,0202.X ₁ ² + 4,49169.X ₂ - 1,5028.X ₂ ² + 1,61797.X ₁ .X ₂	0,83	Eq. 8
E-SF = 12,28210 - 4,03459.X ₁ + 4,1644.X ₂ - 2,69540.X ₂ ²	0,87	Eq. 9
E-SV = 52,0715 + 16,7876.X ₁ - 12,5984.X ₁ ² + 5,2044.X ₂ + 4,9147.X ₁ .X ₂	0,80	Eq. 10

X₁: concentração de coagulante; X₂: pH; R²: coeficiente de determinação

A validação dos modelos é confirmada segundo a distribuição de F (Tabela 5), indicando que os modelos propostos se ajustam aos dados experimentais, com coeficientes de determinação $\geq 0,80$. Considerando os parâmetros significativos e 95 % de confiança o valor de F_{Calculado} foi três vezes maior que o F_{Tabelado}. Com base nestes critérios, e considerando ainda os coeficientes de determinação obtidos (Tabela 4) é possível afirmar que os modelos são significativos e preditivos.

Tabela 5. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados para o coagulante cloreto férrico

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
DQO					
Regressão	516	5	103,2	27,9	3,11
Resíduo	44,3	12	3,7		
Falta de Ajuste	16,93	3			
Erro Purro	27,34	9			
Total	561	17			
N-NTK					
Regressão	3263	5	652	7,3	3,11
Resíduo	1076	12	89,6		
Falta de Ajuste	248	3			
Erro Purro	828	9			
Total	4349	17			
P-PO₄⁻³					
Regressão	3686	5	737	7,07	3,11
Resíduo	1250	12	104		
Falta de Ajuste	567	3			
Erro Purro	683	9			
Total	4936	17			
Turbidez					
Regressão	4343	5	868	3,77	3,11
Resíduo	2757	12	230		
Falta de Ajuste	2509	3			
Erro Purro	248	9			
Total	7100	17			

continuação Tabela 5

SS					
Regressão	1303	5	260		
Resíduo	578	12	48	5,4	3,11
Falta de Ajuste	479	3			
Erro Purro	99	9			
Total	1881	17			
ST					
Regressão	385	5	77		
Resíduo	79,3	12	6,6	11,7	3,11
Falta de Ajuste	77	3			
Erro Purro	2,3	9			
Total	464	17			
SF					
Regressão	439	5	88		
Resíduo	69,2	12	5,7	15,3	3,11
Falta de Ajuste	27,5	3			
Erro Purro	41,7	9			
Total	509	17			
SV					
Regressão	4541	5	908		
Resíduo	1486	12	124	7,4	3,11
Falta de Ajuste	1174	3			
Erro Purro	312	9			
Total	6027	17			

As Figuras 2, 3 e 4 apresentam as linhas de contorno elaboradas a partir dos modelos de regressão (Tabela 4), os quais descrevem o comportamento da remoção de DQO, ST e SF em função dos fatores em estudos descritos pela matriz de planejamento experimental (Tabela 2). O comportamento destes diagramas descrevem a tendência do

aumento das eficiências de remoção com a concentração de coagulante. Esta tendência é similar ao encontrado por Chen et al., (2009), trabalhando com a coagulação de biomassa de *Aphanothece halophytica*. Estes autores constataram que doses mais elevadas de cloreto férrico, são necessárias, para atingirem a eficiência de coagulação.

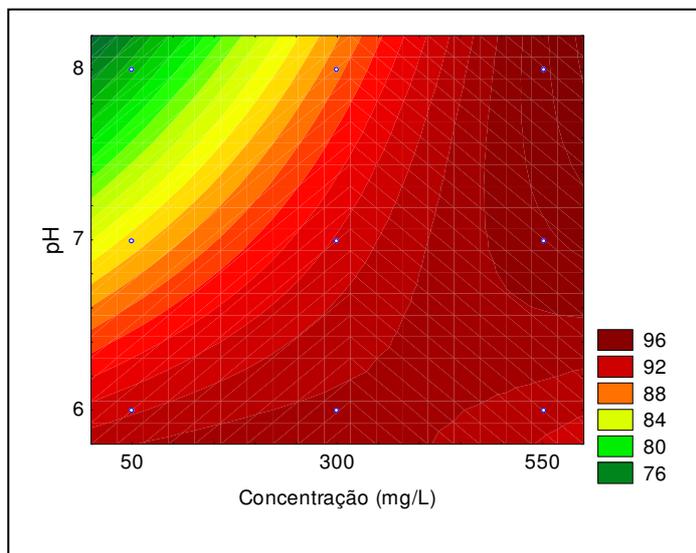


Figura 2. Linhas de contorno para eficiência de remoção de DQO utilizando FeCl_3 .

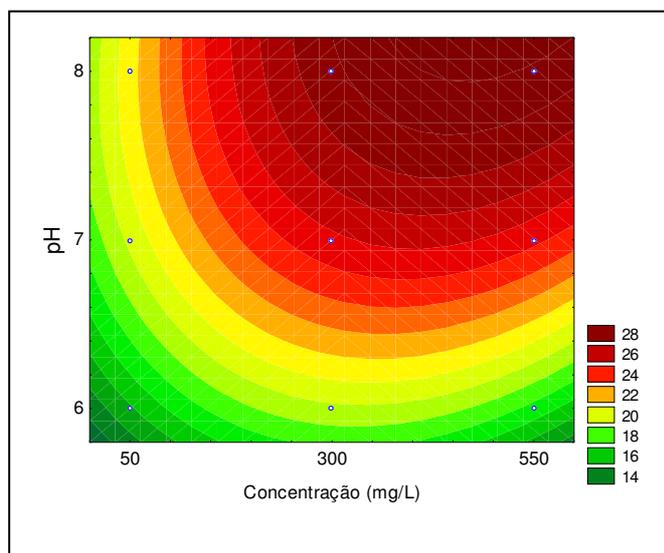


Figura 3. Linhas de contorno para eficiência de remoção de ST utilizando FeCl_3 .

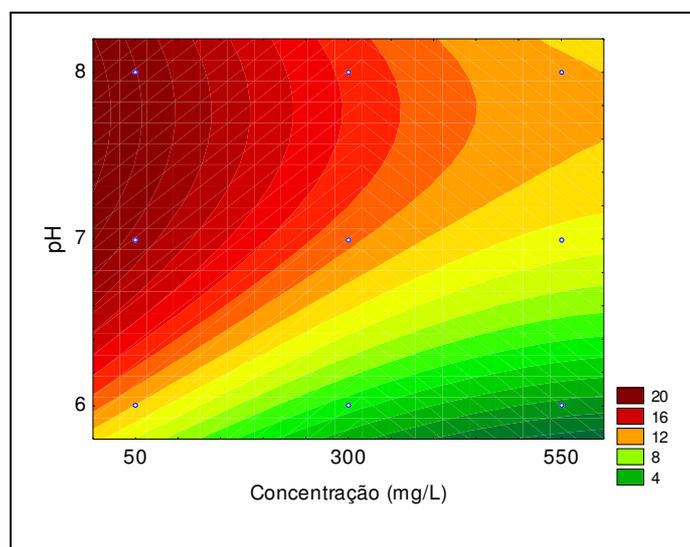


Figura 4. Linhas de contorno para eficiência de remoção de SF utilizando FeCl_3 .

No que concerne à remoção de sólidos totais, fixos e DQO, verifica-se que as maiores remoções são registradas nos valores de pH superiores (pH 7,0 e 8,0). Costa et al.

(2009), também relata, para o referido intervalo de pH, eficiência de remoção da turbidez de 98 e 84 %, respectivamente, para o cloreto férrico.

3.1.2 Eficiências de remoção e efeito do sulfato de alumínio no tratamento e separação de biomassa

A Tabela 6 apresenta as eficiências de remoção das variáveis respostas, utilizando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, segundo a matriz do planejamento experimental (Tabela 2).

A literatura é ampla quanto a ação e fatores que condicionam seus desempenhos, tanto de sais de ferro e de alumínio (LEE et al. 1998; NUÑEZ et al., 2001; VIANNA, 2002; EBELLING et al., 2003; AL MUTAIRI, 2004; MITTAL, 2005; BENSADOK et al., 2007; MATOS et al., 2007; SILVA et al., 2009; KUSHWAHA et al., 2010; SILVA – MANETTI et al., 2011).

Tabela 6. Eficiência de remoção dos parâmetros avaliados utilizando sulfato de alumínio

*Tratamentos	Resultados							
	E-DQO (%)	E-N-NTK (%)	E-P- PO_4^{-3} (%)	E-turbidez (%)	E-SS (%)	E-ST (%)	E-SF (%)	E-SV (%)
1	45	16	7	83	85	15	4	40
2	54	26	8	91	88	14	8	25
3	44	19	6	86	81	7	3	16
4	53	13	6	66	63	18	14	27
5	72	18	16	86	80	20	6	50
6	64	17	12	90	89	22	3	62
7	44	11	9	61	54	20	56	5
8	66	16	12	79	74	26	60	12
9	62	13	14	90	88	18	64	21

*Tratamentos: de acordo com a matriz do planejamento experimental (Tabela 2); E-DQO: eficiência de remoção da demanda química de oxigênio; E-N-NTK: eficiência de remoção de nitrogênio total Kjeldahl; E-P- PO_4^{-3} : eficiência de remoção de fósforo; E-turbidez: eficiência de remoção de turbidez; E-SS: eficiência de remoção de sólidos suspensos; E-ST: eficiência de remoção de sólidos totais; E-SF: eficiência de remoção de sólidos fixos; E-SV: eficiência de remoção de sólidos voláteis.

Os dados da Tabela 6 registram remoções acima de 80 % da turbidez do efluente de laticínios, exceto para os experimentos 4 e 7, nos quais foram utilizadas dosagens de 50 mg. L^{-1} de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ a pH 7,0 e 8,0. Os máximos de remoções em torno de 90 % são registrados para os experimentos 2, 6 e 9, o que corresponde a valores de pH do efluente e concentrações de coagulante de 6,0 7,0 e 8,0 e 300 mg. L^{-1} e 550 mg. L^{-1} ,

respectivamente. Santos (2001), avaliando a eficiência de remoção da turbidez de esgoto sanitário, registra maior desempenho para o sulfato de alumínio, para valores de pH 7,0 e 8,0, o que corrobora os resultados encontrados.

A influência das concentrações de coagulantes e pH do meio, é melhor elucidada na Figura 1 e 5, as quais avaliam os efeitos principais e interações para o desempenho dos coagulantes cloreto férrico e sulfato de alumínio, respectivamente.

Quando comparados os resultados registrados para o cloreto férrico e sulfato de alumínio, constata-se melhor desempenho para o cloreto férrico, atingindo até 96 % de remoção de turbidez, o que se reflete nas maiores remoções de DQO e SS (Tabelas 3 e 6). Estes resultados se justificam, uma vez que a literatura tem relatado maiores eficiências para o cloreto férrico (NUÑEZ et al., 2001; EBELING et al., 2003; Al MUTAIRI et al., 2004; MITTAL et al., 2005, SILVA et al., 2009; SILVA-MANETTI et al., 2011).

Nuñez et al. (2001) e Mittal et al. (2006) reportam que as unidades de coagulação/floculação associadas ao tratamento biológico para recuperação de biomassa, podem alcançar faixas de remoção de DQO de 32 a 90 %. No presente trabalho, são registrados máximos de 72 %, quando se utiliza sulfato de alumínio (Tabela 6) e de 96 % ao utilizar cloreto férrico (Tabela 3).

Os dados registrados indicam que a remoção dos compostos nitrogenados e fosforados foi baixa em todos os tratamentos, com valores máximos de 16,56 % e 10,0 % para o N-NTK e $P-PO_4^{-3}$, respectivamente. Embora o processo de coagulação/floculação não tenha sido efetivo na remoção dos compostos nitrogenados, os percentuais encontrados foram superiores em comparação ao trabalho de El-Bestawy & Hussein (2005), que testaram concentrações entre 50 mg. L⁻¹ e 400 mg. L⁻¹ de sulfato de alumínio e pH entre 5,0-8,0 no tratamento de efluente doméstico e industrial. Quando considerado o efeito do pH, na dose de 200 mg. L⁻¹ a maior remoção de DQO (65,5 %) foi em pH 7,0, enquanto que para os parâmetros fósforo total e N-NTK as maiores remoções (6,7 % e 5,9 %, respectivamente) foram constatadas a pH 6,0. Este mesmo autor relata também que o aumento do pH de 6,0 para 8,0 não provocou mudanças perceptíveis na remoção dos parâmetros avaliados, corroborando com as eficiências de N-NTK apresentadas na Tabela 6. A análise dos dados, não demonstra grandes diferenças entre as eficiências de remoções deste parâmetro. No que se refere as remoções quando se utiliza cloreto férrico (Tabela 3), embora também sejam relativamente baixas, são notadamente superiores, quando comparadas ao sulfato de alumínio, observando-se máximos de 57 % e 51 % para N-NTK e $P-PO_4^{-3}$, respectivamente.

Kushwaha et al. (2010) estudaram o uso simultâneo de coagulantes inorgânicos como policloreto de alumínio (PAC), sulfato ferroso (FeSO_4) e sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, no tratamento de efluente de laticínio, a fim de avaliar a influência do pH inicial e dosagem de coagulante na remoção de DQO). Estes autores verificaram que em pH 8,0 ocorreu a maior eficiência de remoção 69,2, 66,5 e 63,8 % para os diferentes coagulantes, respectivamente. Neste trabalho as maiores eficiências em presença do sulfato de alumínio, ocorrem em pH menor que 8,0. A maior eficiência de DQO é obtida para o experimento 5 (300 mg. L^{-1} pH 7,0) o que evidencia que a concentração de coagulante e pH apresentam efeitos nas respostas. Este fato pode ser visualizado na Figura 5 (A a H), na qual se expressa a influência dos efeitos e significâncias das variáveis em estudo sobre a eficiência de remoção de DQO, N-NTK, P-PO_4^{-3} , turbidez, SS, ST, SF e SV.

Avaliando a Figura 5 (A a H), verifica-se, que a concentração de coagulante influencia positivamente nas eficiências de remoção, para quase todas as variáveis, exceto para SF.

No que se refere ao efeito do pH, verifica-se efeito positivo para as respostas DQO, P-PO_4^{-3} e ST, indicando que nos maiores valores de pH (7,0 e 8,0) e coagulante (300 e 500 mg. L^{-1}) a remoção se torna mais eficiente. Isso pode ser observado na Tabela 6, para os experimentos 5 (300 mg. L^{-1} pH 7,0), 8 (300 mg. L^{-1} pH 8,0) e experimento 9 (550 mg. L^{-1} pH 8,0), os quais resultam em eficiências de remoção de DQO de 72 % e 66 % para os experimentos 5 e 8, P-PO_4^{-3} de 16 % e 14 % para os experimentos 5 e 9.

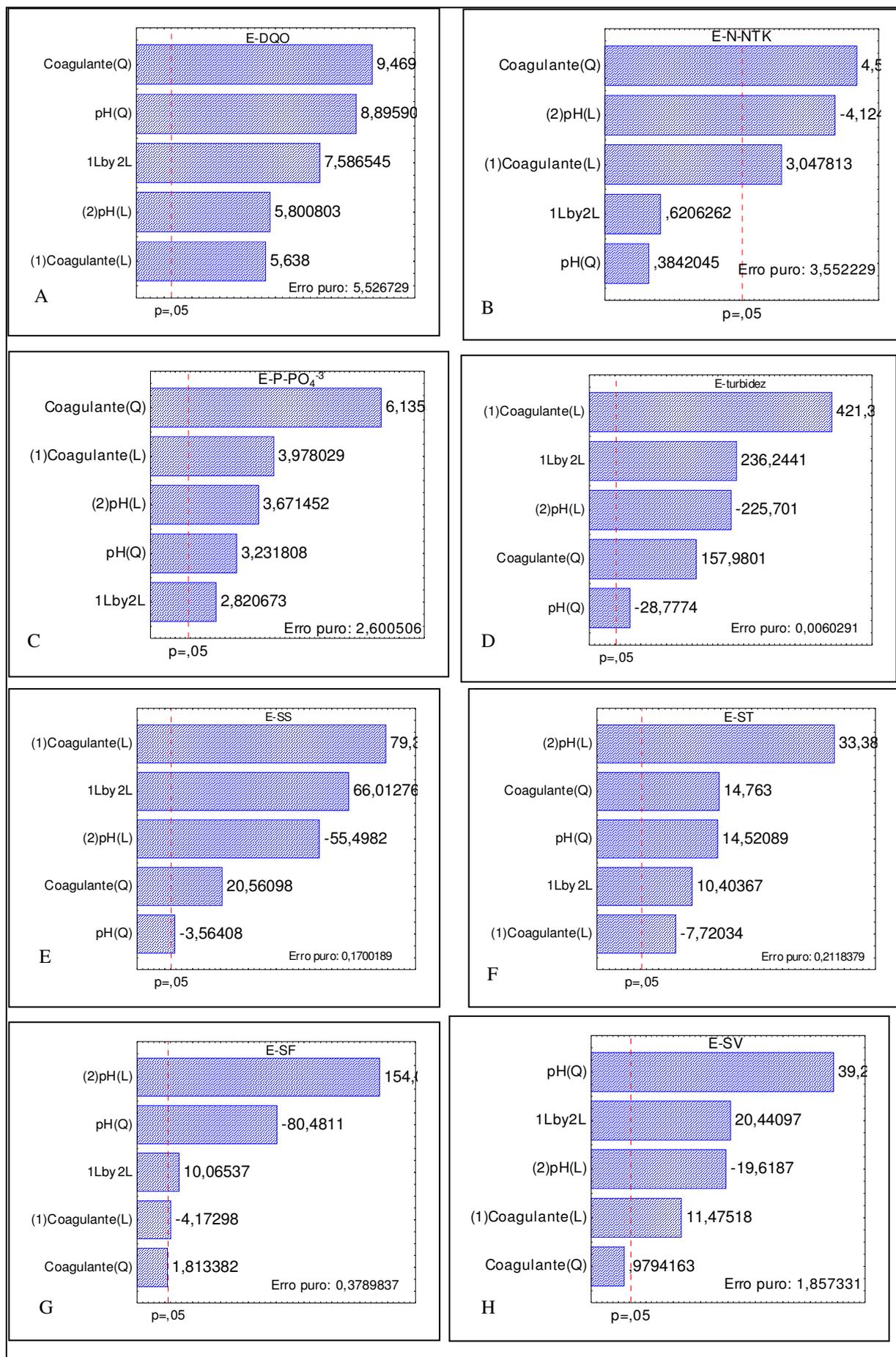


Figura 5. Gráfico de Pareto para as respostas eficiências remoção dos parâmetros avaliados ($p \leq 5\%$).

A Tabela 7 apresenta os modelos polinomiais na forma codificada gerados a partir da análise de regressão para as respostas eficiência de remoção de DQO, N-NTK, $P-PO_4^{-3}$, turbidez, SS, ST, SF e SV, quando utiliza-se o coagulante $Al_2(SO_4)_3$. Os modelos foram gerados a partir dos parâmetros estatisticamente significativos ao nível de 95 % de confiança para as respostas.

Tabela 7. Modelos de regressão para as variáveis respostas

Modelos Codificados	R^2	
$E-DQO = 71,2879 + 3,8262 \cdot X_1 - 11,1311 \cdot X_2^2 + 3,9367 \cdot X_2 - 10,4567 X_1 X_2 + 6,3057 X_1 X_2$	0,94	Eq. 11
$E-N-NTK = 20,1387 + 1,65824 X_1 - 4,2950 \cdot X_1^2 - 2,2442 \cdot X_2$	0,80	Eq. 12
$E-P-PO_4^{-3} = 15,84610 + 1,85185 X_1 - 4,9570 \cdot X_1^2 + 1,7091 \cdot X_2 - 2,6058 \cdot X_2^2 + 1,60812 X_1 X_2$	0,80	Eq. 13
$E-turbidez = 85,27151 + 9,4437 X_1 - 6,13335 \cdot X_1^2 - 5,05905 \cdot X_2 + 1,11724 \cdot X_2^2 + 6,48547 \cdot X_1 \cdot X_2$	0,97	Eq. 14
$E-SS = 80,71190 + 9,44700 \cdot X_1 - 4,23899 \cdot X_1^2 - 6,60598 \cdot X_2 + 0,73480 \cdot X_2^2 + 9,62346 \cdot X_1 \cdot X_2$	0,97	Eq. 15
$E-ST = 22,63757 - 1,02577 \cdot X_1 - 3,39740 \cdot X_1^2 + 4,43590 \cdot X_2 - 3,34168 \cdot X_2^2 + 1,69295 \cdot X_1 \cdot X_2$	0,82	Eq. 16
$E-SF = 8,32889 - 0,74159 \cdot X_1 + 27,38508 \cdot X_2 + 24,77274 \cdot X_2^2 + 2,19076 \cdot X_1 \cdot X_2$	0,99	Eq. 17
$E-SV = 47,8996 + 4,5145 \cdot X_1 - 7,7184 \cdot X_2 - 26,7678 \cdot X_2^2 + 9,8492 \cdot X_1 \cdot X_2$	0,80	Eq. 18

X_1 : concentração de coagulante; X_2 : pH; R^2 : coeficiente de determinação.

A validação dos modelos é confirmada, segundo a distribuição de F (Tabela 7), indicando que os modelos propostos se ajustam aos dados experimentais, com coeficientes de determinação $\geq 0,80$, podendo ser utilizados para prever as respostas de eficiências de remoção de DQO, N-NTK, $P-PO_4^{-3}$, turbidez e sólidos quando se utiliza $Al_2(SO_4)_3$ variando sua concentração e pH do efluente.

Considerando os parâmetros significativos e 95 % de confiança o valor de $F_{Calculado}$ foi três vezes maior que o $F_{Tabelado}$, conforme apresentado na Tabela 8. Com base nestes critérios, bem como do valor dos coeficientes de determinação, pode se afirmar que os modelos são significativos e preditivos.

Tabela 8. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados para o coagulante sulfato de alumínio

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
DQO					
Regressão	1611	5	322	34,45	3,11
Resíduo	112,15	12	9,35		
Falta de Ajuste	62,41	3			
Erro Purro	49,74	9			
Total	1724	17			
N-NTK					
Regressão	168	5	33,7	6,5	3,11
Resíduo	62,6	12	5,21		
Falta de Ajuste	30,60	3			
Erro Purro	31,97	9			
Total	231	17			
P-PO₄⁻³					
Regressão	221	5	44,3	8,12	3,11
Resíduo	65,42	12	5,45		
Falta de Ajuste	42,02	3			
Erro Purro	23,40	9			
Total	287	17			
Turbidez					
Regressão	1870	5	374	74,02	3,11
Resíduo	60,63	12	5,05		
Falta de Ajuste	60,58	3			
Erro Purro	0,05	9			
Total	1930	17			
SS					
Regressão	2408	5	482	58,80	3,11
Resíduo	98,36	12	8,20		
Falta de Ajuste	96,83	3			

continuação Tabela 8

Erro Purro	1,53	9			
Total	2507	17			
ST					
Regressão	361,60	5	72,31		
Resíduo	83,42	12	6,95	10,40	3,11
Falta de Ajuste	81,52	3			
Erro Purro	1,90	9			
Total	445	17			
SF					
Regressão	11500	5	2300		
Resíduo	158,41	12	13,20	174	3,11
Falta de Ajuste	155	3			
Erro Purro	3,41	9			
Total	11659	17			
SV					
Regressão	4603	5	920		
Resíduo	1084	12	90,33	10,20	3,11
Falta de Ajuste	1068	3			
Erro Purro	16,7	9			
Total	5688	17			

DQO: demanda química de oxigênio; N-NTK: nitrogênio total; P-PO₄⁻³: fósforo dissolvido; Turbidez: unidade nefelométrica; SS: sólidos suspensos; ST: sólidos totais; SF: sólidos fixos; SV: sólidos voláteis; SQ: soma quadrática; GL: graus liberdade; MQ: média quadrática; F: fonte de variação para 95 % de confiança.

As Figuras 6 a 9 apresentam os diagramas das superfícies de contorno elaboradas a partir dos modelos de regressão expressos na Tabela 7, nas quais descrevem o comportamento da remoção de DQO, turbidez, SS e ST em função dos fatores em estudo descritos pela matriz de planejamento experimental (Tabela 2), quando se utiliza sulfato de alumínio. Observa-se que a tendência de aumento das eficiências de remoções das variáveis em análise, ocorrem quando foram utilizadas as concentrações de 300 - 550 mg. L⁻¹ a pH 7,0, indicando que neste intervalo de concentrações ocorrem as maiores remoções. Estes resultados são promissores quando comparados com os encontrados na

literatura. Bensadok et al. (2007) relatam remoções de turbidez de até 90 %, quando é utilizado o sulfato de alumínio na concentração de 300 mg. L⁻¹ a pH 7,0. É notório que remoções de DQO e SS se correlacionem com o aumento das remoções de turbidez. Isso é evidenciado nos resultados expressos na Tabela 6 e corroborado pela forte tendência descrita nas superfícies de contorno (Figuras 6 a 9). Pode ser verificado que os experimentos que apresentaram as maiores eficiências de remoção para os parâmetros considerados foram os experimentos 5 e 6, quando as maiores concentrações de coagulantes são utilizadas a pH 7,0.

A Tabela 9 apresenta as diferenças de média segundo Tukey, para os dados obtidos para os experimentos 5 (300 mg. L⁻¹ pH7,0) e 6 (550 mg. L⁻¹ pH 7,0).

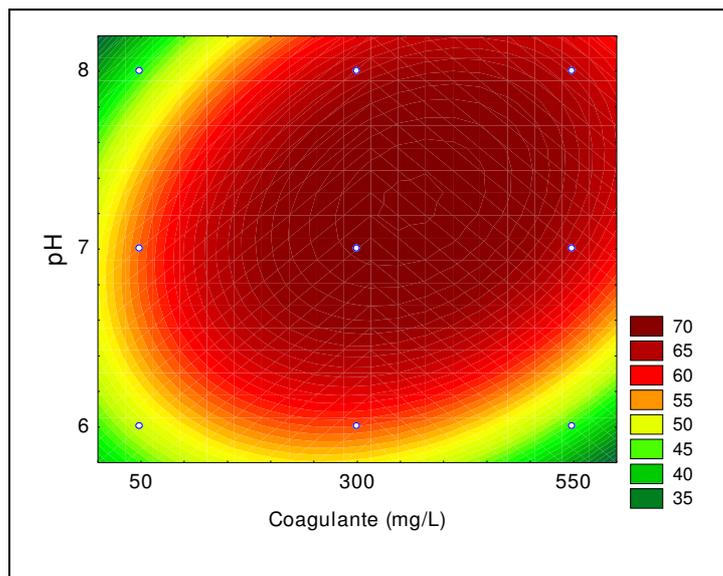


Figura 6. Linhas de contorno para eficiência de remoção de DQO utilizando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

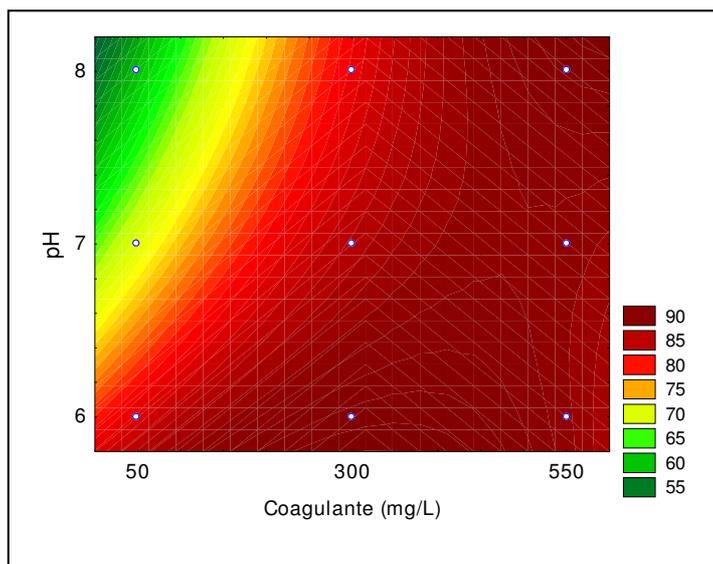


Figura 7. Linhas de contorno para eficiência de remoção de turbidez utilizando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

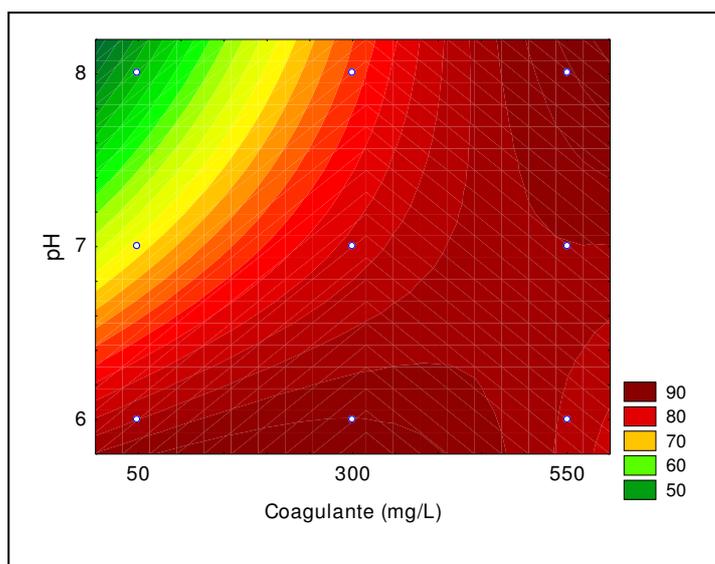


Figura 8. Linhas de contorno para eficiência de remoção de SS utilizando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

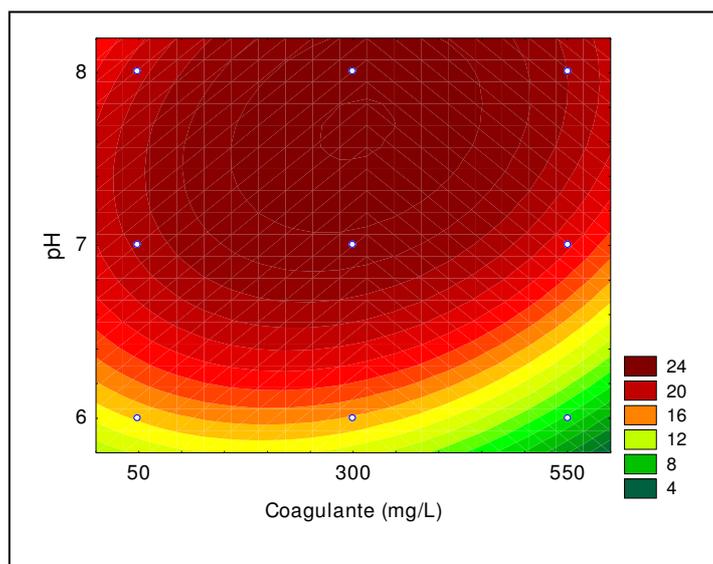


Figura 9. Linhas de contorno para eficiência de remoção de ST utilizando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

Tabela 9. Diferença de médias segundo Tukey para as eficiências de remoções avaliadas

Parâmetros	Experimento 5	Experimento 6	p
E-DQO	72 ^a	64 ^b	0,0082
E-N-NTK	18 ^a	17 ^a	0,1013
E-P-PO ₄ ⁻³	16 ^a	12 ^b	0,0250
Turbidez	86 ^a	90 ^a	0,0648
SS	80 ^a	89 ^b	0,0489
ST	20 ^a	22 ^a	0,6400
SF	6 ^a	3 ^a	0,3488
SV	50 ^a	62 ^a	0,0741

Experimento 5: 300 mg. L⁻¹, pH 7,0; Experimento 6: 550 mg.L⁻¹, pH 7,0; valores médios das eficiências de remoção; p: probabilidade de diferença entre as médias de remoção obtidas nos experimentos 5 e 6 ($p \leq 0,05$).

Avaliando a Tabela 9, observa-se, que para a maioria dos parâmetros em estudo as eficiências de remoção registradas não apresentaram diferença significativa entre os dois experimentos 5 e 6 analisados, ao nível de significância de 95 %. No entanto apresentando diferença nas médias de remoções para os parâmetros DQO e P-PO₄⁻³. Porém as maiores remoções destes parâmetros (72 %, 16 %, respectivamente) foram registradas na menor concentração do coagulante sulfato de alumínio, correspondente ao experimento 5 (300 mg. L⁻¹). Com relação aos SS, nesta condição, houve um decréscimo na eficiência de aproximadamente 10 %. Segundo Vieira (1999), quando se utiliza o coagulante sulfato de alumínio, a remoção de substâncias húmicas se dá por co-precipitação, quando em alta dosagem há formação de espécies insolúveis resultantes da interação entre os compostos hidrolisáveis do alumínio e as substâncias húmicas.

Os resultados apresentados na Tabela 9, indicam que a melhor condição, quando se utiliza o sulfato de alumínio na remoção de células microalgais, foi o experimento 5 em que se utiliza 300 mg. L⁻¹ a pH 7,0.

3.1.3 Eficiências de remoção dos parâmetros avaliados utilizando coagulante tanino

Os resultados que expressam o desempenho de um polímero de tanino, na separação da biomassa gerada por *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínio, podem ser avaliados na Tabela 10.

Os coagulantes orgânicos são motivo de pesquisa de diferentes trabalhos, no tratamento de efluentes agroindustriais, bem como a remoção de lodo gerado durante os tratamentos biológicos, por não causarem uma poluição adicional, substituindo os coagulantes tradicionais como o sulfato de alumínio ou cloreto férrico (ÖZACAR & SENGIL, 2003; ANIRUDHAM et al., 2008; TONDI et al., 2009; BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010). Dentre estes são destacados os taninos, por apresentarem habilidade de desestabilizar colóides aniônicos (BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010) e resultarem em elevadas remoções de matéria orgânica (SCHOFIELD et al., 2001; BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010; SÁNCHEZ-MARTÍN & BELTRÁN-HEREDIA, 2012).

Tabela 10. Eficiência de remoção dos parâmetros avaliados utilizando tanino

*Tratamentos	Resultados							
	E-DQO (%)	E-N-NTK (%)	E-P-PO ₄ ⁻³ (%)	E-turbidez (%)	E-SS (%)	E-ST (%)	E-SF (%)	E-SV (%)
1	58	95	65	88	81	20	6	39
2	54	93	65	95	88	26	4	57
3	36	93	65	94	63	18	1	42
4	92	96	81	87	57	13	8	21
5	90	98	100	95	94	32	11	60
6	49	94	100	92	84	8	1	18
7	71	93	65	84	83	29	16	48
8	36	92	65	96	85	35	14	62
9	54	93	65	92	78	28	28	27

*Tratamentos: de acordo com a matriz do planejamento experimental (Tabela 2); E-DQO: eficiência de remoção da demanda química de oxigênio; E-N-NTK: eficiência de remoção de nitrogênio total Kjeldahl; E-P-PO₄⁻³: eficiência de remoção de fósforo; E-turbidez: eficiência de remoção de turbidez; E-SS: eficiência de remoção de sólidos suspensos; E-ST: eficiência de remoção de sólidos totais; E-SF: eficiência de remoção de sólidos fixos; E-SV: eficiência de remoção de sólidos voláteis.

Bilanovic et al. (1988) relatam que os polieletrólitos de alto peso molecular são geralmente melhores agentes para a neutralização das cargas elétricas e a alta concentração de biomassa na suspensão também ajuda a coagulação/floculação devido aos encontros frequentes entre células. Isto pode justificar as elevadas eficiências de remoção de DQO, turbidez e SS de até 90 %, 95 % e 94 %, respectivamente (Tabela 10). Além de elevadas remoções de N-NTK (90 %) e P-PO₄⁻³ (100 %). Este desempenho pode ser atribuído a disponibilidade, no polímero orgânico utilizado de sítios capazes de adsorver e neutralizar as partículas coloidais, desestabilizando-as (KAWAMURA, 1991; BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010; SÁNCHEZ-MARTÍN & BELTRÁN-HEREDIA, 2012).

Os resultados indicam que a dosagem de 300 mg. L⁻¹ a pH 7,0, experimento 5 foi o mais apropriado, o que refletiu nas maiores eficiências de remoção dos parâmetros analisados, atingindo valores de 90 %, 98 %, 100 %, 95 %, 94 % para os parâmetros DQO, N-NTK, P-PO₄⁻³, turbidez e SS, respectivamente.

Comparando os dados obtidos de remoção quando se utiliza cloreto férrico (Tabela 10) e com sulfato de alumínio (Tabela 6), é notória a superioridade de desempenho do tanino, para qualquer variável resposta avaliada. É de se salientar as importantes remoções de N-NTK, P-PO₄⁻³ e SS, para qualquer condição experimental (Tabela 9). Estes resultados são bastante promissores, considerando que a literatura relata que os coagulantes naturais apresentam várias vantagens em relação aos coagulantes químicos por serem biodegradáveis e não tóxicos, e ainda produzirem lodo em menor quantidade e com menores teores de metais (KAWAMURA, 1991; BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010; SÁNCHEZ-MARTÍN & BELTRÁN-HEREDIA, 2012). Por outro lado, parâmetros como peso molecular, densidade de cargas das moléculas, força iônica, grau de mistura no fluido, bem como a dosagem, pH do efluente e concentração de biomassa de microalgas são parâmetros que mostram ter influência na eficiência de coagulação/floculação alcançada (GRIMA et al., 2003).

A análise da Figura 10 (A a H) apresentam os efeitos e interações para a ação das concentrações de tanino e pH do efluente, na remoção dos parâmetros estudados. Observa-se efeitos significativos a nível de 5 % de confiança para os parâmetros pH e concentração de coagulante, o que demonstra que estas variáveis são altamente influenciáveis, em todas as respostas consideradas. Observa-se que o aumento da concentração de coagulante está relacionado ao aumento de biomassa sedimentada, uma vez que, esta variável, apresentou efeito positivo para quase todos os parâmetros

analisados em especial sob a resposta turbidez e SS, onde a concentração apresentou os maiores efeitos positivos. Isso evidencia que nos níveis superiores do planejamento, ou seja, nas concentrações dos níveis 0 (300 mg. L^{-1}) e +1 (550 mg. L^{-1}) as eficiências de remoção serão maiores. A exceção foi registrada para eficiências de remoção de DQO e N-NTK, em que apresentaram efeito negativo, indicando que para se obter as maiores eficiências de remoção destes parâmetros concentrações na ordem de 50 mg. L^{-1} (nível-1) e 300 mg. L^{-1} (nível 0) são as mais indicadas.

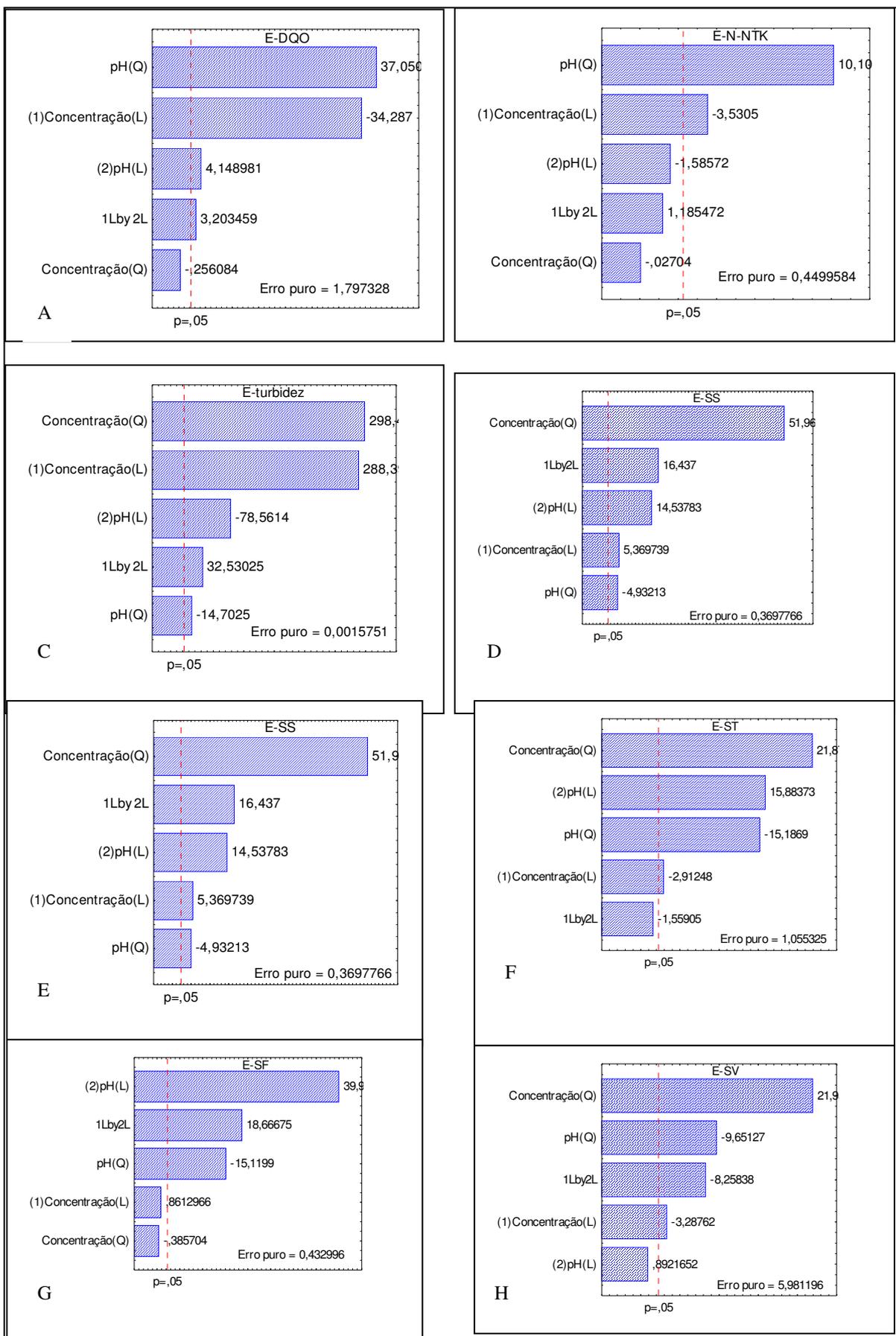


Figura 10. Gráfico de Pareto para as respostas eficiências de remoção dos parâmetros avaliados ($p \leq 5\%$).

A Tabela 11 apresenta os modelos polinomiais na forma codificada gerados a partir da análise de regressão para as respostas eficiência de remoção de DQO, N-NTK, P-PO₄⁻³, turbidez, SS, ST, SF e SV, quando utiliza-se o tanino. Os modelos foram gerados a partir dos parâmetros estatisticamente significativos ao nível de 95 % de confiança para as respostas consideradas.

Tabela 11. Modelos de regressão para as variáveis respostas

Modelos Codificados	R ²	
E-DQO = 90,7574 - 21,4947.X ₁ - 20,4100.X ₁ ² - 9,5510.X ₂ - 45,4171.X ₂ ² + 1,5184.X ₁ X ₂ + 12,3379.X ₁ X ₂ ² + 16,7351.X ₁ ² X ₂ + 30,8724X ₁ ² X ₂ ²	0,95	Eq. 19
E-N-NTK = 99,2537 - 0,96782.X ₁ - 3,42428.X ₁ ² - 6,82395.X ₂ ² + 5,15003.X ₁ X ₂	0,99	Eq. 20
E-P-PO ₄ ⁻³ = 97,6608 - 30,7018.X ₂ ²	0,80	Eq. 21
E-turbidez = 95,50693 + 3,30403.X ₁ - 5,92190.X ₁ ² - 0,90005.X ₂ + 0,29175.X ₂ ² + 0,45645.X ₁ .X ₂	0,97	Eq. 22
E-SS = 95,1105 + 14,1944.X ₁ - 24,7698.X ₁ ² - 1,3318.X ₂ - 7,4720.X ₂ ² + 3,5338.X ₁ .X ₂ - 19,8777X ₁ X ₂ ² + 5,8256.X ₁ ² X ₂ + 13,4574X ₁ ² X ₂ ²	0,97	Eq. 23
E-ST = 26,1763 - 0,8637.X ₁ - 11,2374.X ₁ ² + 4,7104.X ₂ + 7,8007.X ₂ ²	0,85	Eq. 24
E-SF = 7,2189 + 7,5958.X ₂ + 4,9746.X ₂ ² + 4,3427.X ₁ .X ₂	0,99	Eq. 25
E-SV = 52,0106 - 2,3211.X ₁ - 26,8465.X ₁ ² + 11,8010.X ₂ ² - 7,1408.X ₁ .X ₂	0,91	Eq. 26

X₁: concentração de coagulante; X₂: pH; R²: coeficiente de determinação

A validação dos modelos estatísticos é evidenciada a partir da análise da distribuição de F (Tabela 12). Observa-se que os modelos propostos se ajustam aos dados experimentais, com coeficientes de determinação $\geq 0,80$, considerando os parâmetros significativos e 95 % de confiança e que o valor de F_{Calculado} foi três vezes maior que o F_{Tabelado}. Com base nestes critérios é possível afirmar que os modelos são significativos e preditivos.

Tabela 12. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados, quando se utiliza o tanino como coagulante

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
DQO					
Regressão	4610	4	1152	7,36	5,21
Resíduo	2034	13	156		
Falta de Ajuste	2018	4			
Erro Purro	16,17	9			
Total	6645	17			
N-NTK					
Regressão	53,37	5	10,70	4,50	3,11
Resíduo	28,60	12	2,38		
Falta de Ajuste	24,53	3			
Erro Purro	4,04	9			
Total	81,94	17			
P-PO₄³⁻					
Regressão	6357	5	1271	2,91	3,11
Resíduo	5233	12	437		
Falta de Ajuste	1553	3			
Erro Purro	3680	9			
Total	11590	17			
Turbidez					
Regressão	282	5	56,45	69,76	3,11
Resíduo	9,71	12	0,81		
Falta de Ajuste	9,70	3			
Erro Purro	0,014	9			
Total	292	17			

continuação Tabela 12

SS					
Regressão	1095	4	274		
Resíduo	1408	13	108	2,54	5,21
Falta de Ajuste	1405	4			
Erro Purro	3,32	9			
Total	2504	17			
ST					
Regressão	1026	5	205		
Resíduo	186	12	15,5	14,00	3,11
Falta de Ajuste	177	3			
Erro Purro	9,50	9			
Total	1213	17			
SF					
Regressão	942	5	188,42		
Resíduo	215	12	17,91	10,51	3,11
Falta de Ajuste	212	3			
Erro Purro	3,90	9			
Total	1158	17			
SV					
Regressão	3907	5	781		
Resíduo	400	12	33,34	23,43	3,11
Falta de Ajuste	347	3			
Erro Purro	53,83	9			
Total	4318	17			

DQO: demanda química de oxigênio; N-NTK: nitrogênio total; P-PO₄⁻³: fósforo dissolvido; Turbidez: unidade nefelométrica; SS: sólidos suspensos; ST: sólidos totais; SF: sólidos fixos; SV: sólidos voláteis; SQ: soma quadrática; GL: graus liberdade; MQ: média quadrática; F: fonte de variação para 95 % de confiança.

As Figuras de 11 a 14 apresentam as linhas de contorno elaboradas a partir dos modelos de regressão expressos na Tabela 11, os quais descrevem o comportamento da remoção de DQO, turbidez, SS e SV em função dos fatores em estudo descritos pela matriz de planejamento experimental (Tabela 2).

Conforme já verificado, na Figura 10, um dos fatores que interfere no processo de coagulação/floculação é o pH. A concentração dos íons hidrogênio não só governa as cargas das impurezas coloidais, mas também determina a natureza dos produtos formados (BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010; SÁNCHEZ-MARTÍN & BELTRÁN-HEREDIA, 2012). Assim, observa-se pela análise das Figuras de 11 a 14, que as maiores remoções dos parâmetros estudados, ocorrem, a pH 7,0 e 8,0, refletindo-se em altas eficiências de remoções. Quanto a análise das superfícies de contorno, é importante salientar ainda, que as maiores remoções ocorrem no nível intermediário do planejamento, nível zero (Tabela 2) quando se utiliza pH 7,0 e 300 mg. L⁻¹ de coagulante, para todas as variáveis independentes utilizadas.

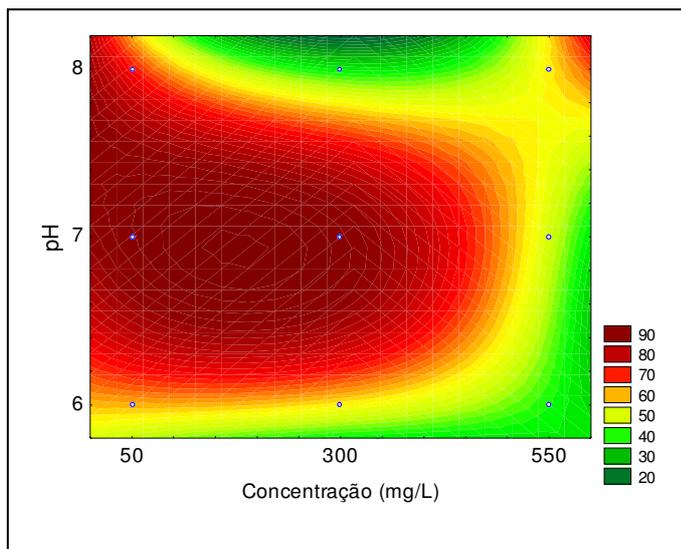


Figura 11. Linhas de contorno para eficiência de remoção de DQO utilizando tanino.

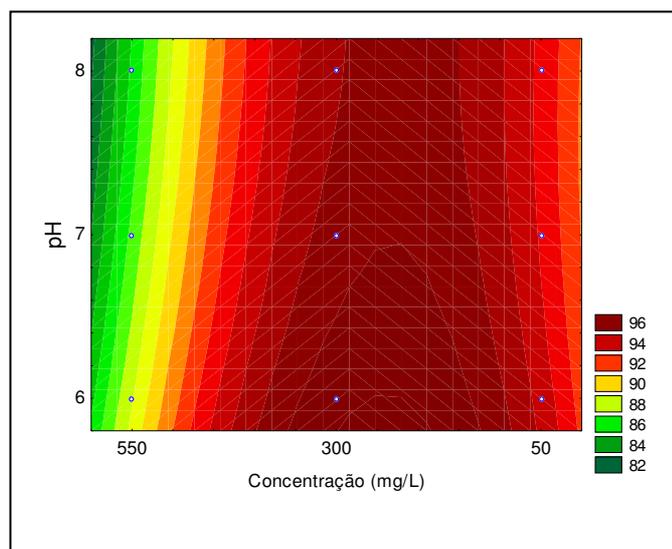


Figura 12. Linhas de contorno para eficiência de remoção de turbidez utilizando tanino.

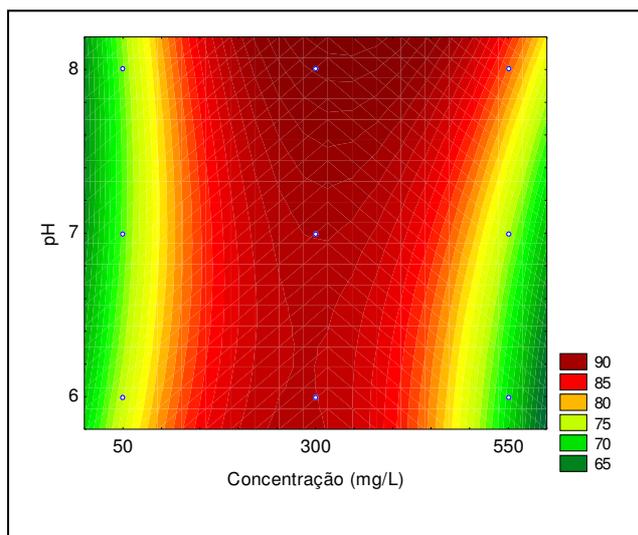


Figura 13. Linhas de contorno para eficiência de remoção de SS utilizando tanino.

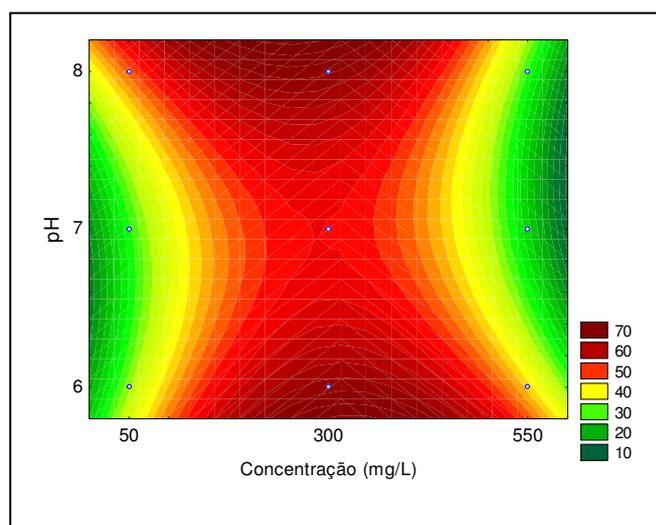


Figura 14. Linhas de contorno para eficiência de remoção de SV utilizando tanino.

A Figura 15 apresenta as diferenças de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05 \%$), para os valores médios das eficiências de remoções, para os três coagulantes estudados, segundo os melhores resultados obtidos (Tabelas 3, 6 e 9), o que corresponde ao experimento 5 (300 mg. L⁻¹, pH 7,0). É notória a eficiência do tanino em relação aos demais coagulantes.

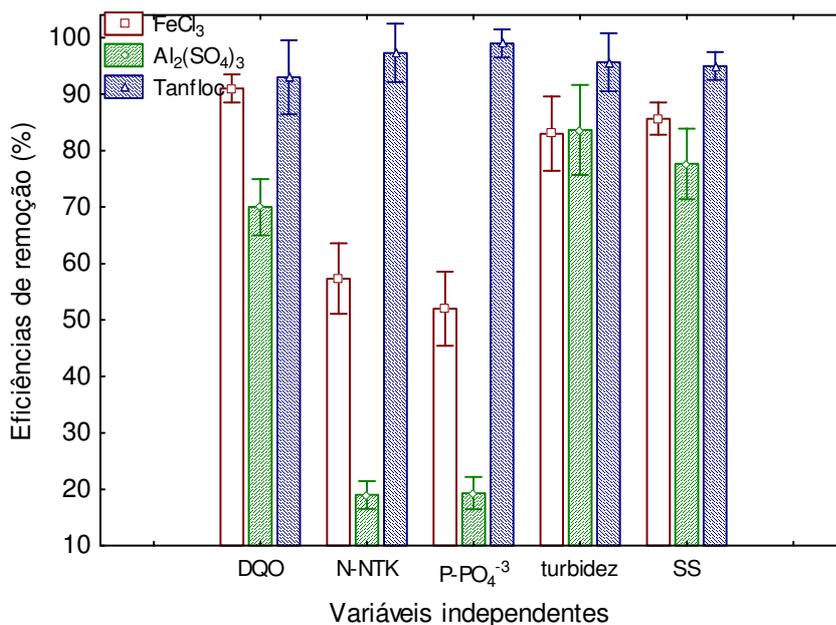


Figura 15. Diferença de médias das eficiências de remoção dos parâmetros avaliados, quando são utilizadas as condições 300 mg. L⁻¹ e pH 7,0 para os coagulantes cloreto férrico, sulfato de alumínio e tanino.

3.2 Avaliação do reúso da água residuária resultante do tratamento biológico e químico

Na Tabela 13 estão expressos a caracterização do efluente da indústria de laticínios, com base nos componentes indicados por *Environmental Protection Agency Report* (EPA, 1992) para reúso de águas em sistemas de refrigeração bem como os limites sugeridos por esta resolução e eficiências de remoção a cada etapa do processo, quando são utilizados o tratamento com *Aphanothece*, coagulante e membrana.

Tabela 13. Comparação das concentrações obtidas para as diferentes etapas de tratamento propostos e os parâmetros para água de reúso em sistemas de refrigeração de acordo com EPA (1992) e Portaria 518 do Ministério da Saúde/2004 para potabilidade de água (BRASIL, 2004)

Parâmetros	EPA	Portaria 518	ETEq	EA	%E ₁	EAC	%E ₂	EMF	%E ₃	%E _t
Sílica (mg.L ⁻¹)	50	N.R.	1,56	1,55	0,64	0,94	45,3	0,85	10,5	45,5
Amônia (mg.L ⁻¹)	1	N.R.	5,33	1,03	80,8	1,0	2,9	0,00	100	100
N-NTK (mg.L ⁻¹)	N.R.	10	49	6,95	85,8	0,10	98,5	0,00	100	100
ST (mg.L ⁻¹)	1000	1000	1917,5	1937,5	-1,0	1315,5	32,1	7,50	99,4	99,6
Turbidez (UNT)	50	5	177,5	315,0	-77,5	15,5	95,0	0,25	98,3	99,8
DQO (mg.L ⁻¹)	75	N.R.	1944,2	432,5	77,8	47,3	89,0	0,00	100	100
Dureza (mg.L ⁻¹ (CaCO ₃) ⁻¹)	650	500	37,2	33,5	10,1	7,5	77,6	6,50 ^b	13,3	82,5
Alcalinidade (mg.L ⁻¹ (CaCO ₃) ⁻¹)	350	N.R.	374,0	285,5	23,7	284,5	0,35	234,5	17,5	37,2
pH	6,9 a 9	6,0-9,5	8,25	7,7	-	7,73	-	7,07	-	-
Sulfato (mg.L ⁻¹)	200	N.R.	125,0	87,25	30,2	15,0	82,8	8,00	46,6	93,6
Fósforo (mg.L ⁻¹)	4	N.R.	4,9	1,25	74,6	0,04	97,2	0,0	100	100
Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,1	N.R.	10,2	6,2	39,21	1,35	78,22	1,18	13,0	88,43
Cálcio (mg.L ⁻¹)	50	N.R.	125	121,0	3,30	21,5	82,23	20,90	2,80	83,3
Magnésio (mg.L ⁻¹)	0,5	N.R.	36,9	35,0	5,15	5,70	58,23	5,60	1,75	84,82
Manganês (mg.L ⁻¹)	0,5	0,1	0,42	0,40	4,72	0,38	5,0	0,37	2,63	11,9
Ferro (mg.L ⁻¹)	0,5	N.R.	5,40	1,70	68,51	0,71	58,23	0,44	38,02	91,85
Coliformes Totais (NMP/100mL)	2,2	ausência	< 2	< 2		< 2		< 2		
Coliformes termotolerantes (NMP/100mL)	N.R.	ausência	ausência	ausência		ausência		ausência		

*EPA, Guidelines for water reuse, US Environmental Protection Agency Report, EPA/625/R-92/004, US Agency for International Development, Washington, DC, 1992; Portaria 518 do Ministério da Saúde/2004; N.R.: não faz referencia; ETEq: efluente tanque de equalização; EA: efluente tratado com *Aphanothece*; E₁: Eficiência de remoção após tratamento por *Aphanothece*; EAC: efluente tratado com a *Aphanothece* e coagulante; E₂: Eficiência de remoção do efluente tratado por *Aphanothece* e coagulante; EMF: efluente após membrana de microfiltração; E₃: Eficiência de remoção do efluente tratado por coagulante e membrana de microfiltração; E_t: Eficiência de remoção total (efluente bruto e membrana filtrante); Parâmetros expressos em mg/L; exceto turbidez (UNT - Unidade Nefelométrica), alcalinidade e dureza em mg.L⁻¹ CaCO₃; sílica: mg.L⁻¹SiO₂. alumínio: mg.L⁻¹Al; ferro: mg.L⁻¹Fe; magnésio: mg.L⁻¹Mg; manganês: mg.L⁻¹Mn; Coliformes totais: nmp.100mL⁻¹

De acordo com Mierzwa (2005), a escolha de uma ou mais combinações de técnicas de tratamento, dependerá do potencial de cada técnica, dos mecanismos envolvidos na redução do contaminante de interesse e da qualidade da água que necessita.

Avaliando-se a Tabela 13, constatam-se mediante a aplicação do teste de diferença de médias de Tukey que para a maioria dos parâmetros em estudo são indicadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os diferentes tratamentos propostos, sendo esta diferença evidenciada quando o efluente de laticínios foi tratado por *Aphanothece*, coagulante e membrana de microfiltração. Evidenciando a aplicabilidade do possível reúso da água residuária quando se utiliza estes três processos associados (tratamento biológico, químico e microfiltração). Observa-se que os perfis do efluente de laticínio bruto (ETeq), quando tratado por *Aphanothece* (EA), por coagulante (EAC) e tratado com membrana filtrante (EMF), comparativamente aos limites indicado por EPA e pela portaria 518 (BRASIL, 2004), verificando-se, que para os dados referenciados por ambos os padrões o processo proposto foi altamente eficiente. Estes resultados são melhor elucidados, “a posteriori”, quando se avalia as Figuras 16, 17 e 18.

Os dados microbiológicos indicam ausência de contaminação da água residuária no final do processo, tomando como base as exigências quanto a parâmetros microbiológicos segundo a resolução EPA/1992, a qual indica 2,2 NMP/100mL para reúso de água, passível de ser utilizado em sistemas de refrigeração índices menores que 2 NMP/100mL foram registrados.

A literatura relata que a coagulação pode ser usada como um passo adicional e de extrema importância antes de um refino no efluente tratado visando o reúso, sendo o tratamento físico-químico de coagulação-floculação um dos mais utilizados pelas indústrias por promoverem a remoção de metais por precipitação e reduzirem o processo de colmatação nas membranas filtrantes (HARUN et al., 2010).

O processo de precipitação química, visando a separação de biomassa microalgal bem como o tratamento do efluente, apesar de muito utilizado pelas indústrias alimentícias no tratamento de seus efluentes, muitas vezes não permite atingir níveis de concentração de alguns parâmetros estabelecidas pela legislação quando se visa o reúso destas águas residuárias, sendo necessária a aplicação de um processo complementar para o polimento final do efluente (VEIT, 2006). Os resultados expresso na Tabela 13 evidenciam que o processo proposto neste trabalho é suficiente para atingir a meta traçada.

A associação de tratamento químico e biológico, embora resulte em altos índices de remoção, não contemplam na totalidade as indicações dos padrões de reúso de água. Estes parâmetros tornam-se adequados quando a água residuária é submetida ao processo de microfiltração, a exemplo de sólidos totais, magnésio e ferro, como podemos observar na Tabela 13.

O comportamento das eficiências de remoção segundo os tratamentos por *Aphanothece*, tanino e *Aphanothece* são elucidados, pelas Figuras 16, 17 e 18, que avaliam as eficiências de remoções dos parâmetros analisados após tratamento por *Aphanothece* (E1), após uso de tanino (E2), e após a última etapa de tratamento com membrana de microfiltração (E3) bem como a eficiência total do tratamento proposto (Et).

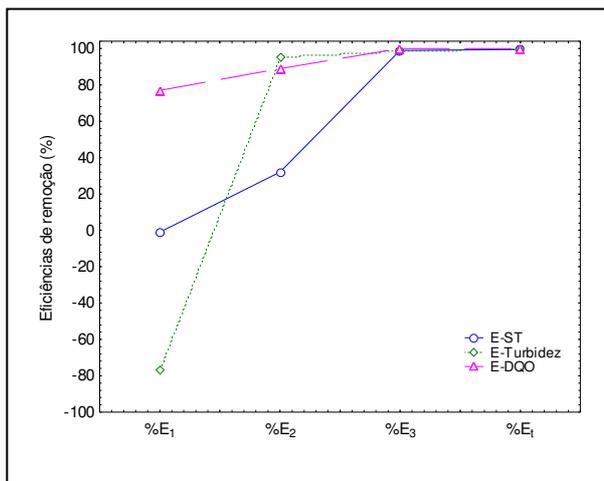


Figura 16. Eficiência de remoção dos parâmetros ST, SS, turbidez e DQO nos tratamentos propostos E₁: eficiência no efluente tratado por *Aphanothece*; E₂: eficiência no efluente tratado por *Aphanothece* e Tanfloc; E₃: eficiência no efluente tratado por Tanfloc e membrana e E_t: eficiência total do processo.

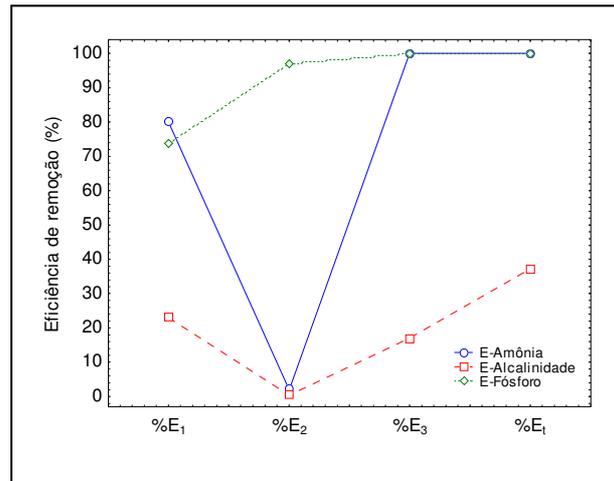


Figura 17. Eficiência de remoção dos parâmetros amônia, alcalinidade e fósforo nos tratamentos propostos E₁: eficiência no efluente tratado por *Aphanothece*; E₂: eficiência no efluente tratado por *Aphanothece* e Tanfloc; E₃: eficiência no efluente tratado por Tanfloc e membrana e E_t: eficiência total do processo.

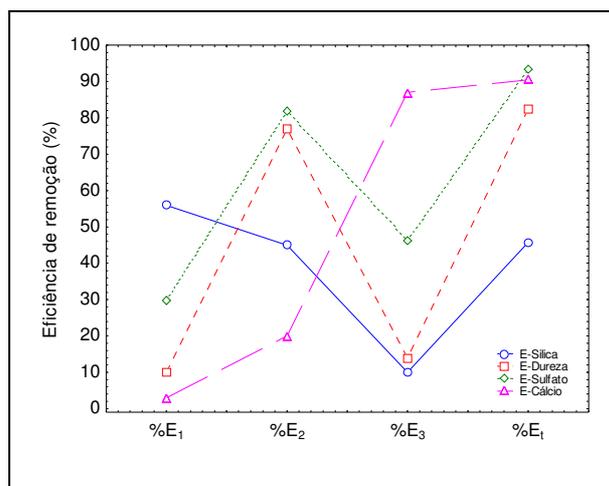


Figura 18. Eficiência de remoção dos parâmetros sílica, dureza, sulfato e cálcio nos tratamentos propostos E₁: eficiência no efluente tratado por *Aphanothece*; E₂: eficiência no efluente tratado por *Aphanothece* e Tanfloc; E₃: eficiência no efluente tratado por Tanfloc e membrana e E_t: eficiência total do processo.

Os valores negativos apresentados para ST e Turbidez (Figura 16) são atribuídos ao crescimento celular. As células de cianobactérias podem apresentar uma carga negativa fazendo com que fiquem suspensas, as quais podem ser atribuídas aos grupos funcionais orgânicos localizados na parede celular que atuam como ligantes altamente

eficientes para a adsorção de metais. Estes ligantes determinam a carga global da superfície celular e, como essa carga elétrica é fortemente negativa em muitas espécies, o fenômeno de repulsão as mantém dispersas no meio impedindo a separação, aumentando assim a concentração de matéria coloidal com resultado no aumento de turbidez e SS no efluente tratado (WANG et al., 1998; BASHAN et al., 2002; MOLINA-GRIMA 2003; CHEN et al., 2005; SILVA et al., 2009; SILVA-MANETTI et al., 2011; CHEN & LIU, 2012).

Em relação a eficiência dos parâmetros estudados no efluente tratado por *Aphanothece* (E₁) (Figuras 16, 17 e 18) pode-se observar que as maiores remoções foram de DQO, amônia, fósforo e sílica, refletindo em eficiências de até 80 %. As cianobactérias agem como agentes de purificação altamente eficientes não somente pela oxigenação da água como também por sua eficiência de remoção de nutrientes e metais (SANCHO et al., 1999; QUEIROZ et al., 2001; BASTOS et al., 2010; SILVA-MANETTI et al., 2012).

Os carboidratos extracelulares excretados por culturas de cianobactérias podem interagir com metais e diminuir sua concentração em águas residuárias. Essas substâncias poliméricas extracelulares apresentam propriedades quelantes a diversas substâncias e quando se complexam com metais, os retiram das águas residuárias, contribuindo para o processo de reúso de efluentes (MOLINA-GRIMA, et al., 2003; LEE et al., 2004b; OZTURK et al., 2009; MISHRA et al. 2010; DONOT et al., 2011). Esta propriedade das cianobactérias é evidenciada, principalmente para o ferro, em que 68 % de remoção é registrada.

Os resultados da eficiência de remoção dos parâmetros analisados no efluente tratado por *Aphanothece* e Tanfloc (E₂) demonstram importante consórcio destes dois tratamentos, quando se visa o reúso do efluente de laticínios, resultando em eficiências de remoção de DQO, turbidez e fósforo de aproximadamente 100 % (Figuras 16 e 17) e dureza e sulfato de até 80 % (Figura 18).

Essas remoções podem ser atribuídas, mediante a propriedade dos taninos em atuarem em sistemas de partículas coloidais, neutralizando cargas e formando pontes entre estas partículas, proporcionando a formação de flocos e consequente sedimentação (GRAHAM et al., 2008). Estes compostos apresentam alta afinidade por proteínas e outras macromoléculas como os polissacarídeos (SCHOFIELD et al., 2001; PIZZI et al., 2008; BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010; SÁNCHEZ-MARTÍN & BELTRÁN-HEREDIA, 2012), o que justifica o destacado desempenho deste polímero, no processo

de coagulação da biomassa microalgal, considerando que estes micro-organismos apresentam uma camada mucilaginosa, rica em carboidratos (SUTHERLAND, 1998; DOUMIT & PINOTTI, 2004; PARK & YOON, 2009; DONOT et al., 2012; ARAD & LEVY-ONTMAN, 2010).

As remoções de amônia (Figura 17) e sílica (Figura 18) após o tratamento E₂ não apresentaram eficiência de remoção significativa após a associação destes tratamentos, o que salienta a importância do tratamento biológico (E₁), responsável por 80,8 % de remoção.

Geralmente a etapa após o tratamento biológico visando o reúso de águas residuárias e remoção de material em suspensão bem como metais é a coagulação química a qual provavelmente influencia significativamente as etapas de tratamento subsequentes, como o uso das membranas (PAVANELLI, 2001; VOURCH et al., 2008; VIDAL & CAMPOS, 2009; LUO, et al., 2010; LUO, et al., 2011; SILVA-MANETTI et al., 2011; LUO, et al., 2012).

Com que diz respeito a eficiência de remoção após tratamento com membrana de microfiltração (E₃) se observa na Figura 16 eficiências de remoção de SS, turbidez e DQO de aproximadamente 100 %, amônia e fósforo (Figura 17) e na Figura 18 também de aproximadamente 100 % de cálcio. Esses resultados corroboram com os experimentos realizados por Malack & Anderson (1996), Vera et al. (1996), no pós-tratamento de efluentes secundários de estações de tratamento de esgoto submetidos à coagulação antes de serem microfiltrados.

Com relação aos parâmetros sílica, dureza e sulfato a associação do tratamento por coagulante e membrana refletiu em eficiências de 10 a 50 %, aproximadamente (Figura 18). Com os resultados obtidos após o uso de microfiltração, ficou evidente que esta água residuária apresenta grande potencial para ser explorada tanto para reúso em sistemas de refrigeração como para sua potabilidade.

A literatura relata que o processo de coagulação permite a transformação de grande parte do material coloidal e dissolvido em fração particulada a qual é mais eficientemente removida nas membranas de microfiltração. Segundo Vera et al. (1996), maiores agregados são mais eficientemente arrastados pelo efeito da velocidade de escoamento tangencial. Vidal & Campos (2009), avaliaram a coagulação associada à microfiltração tangencial para o tratamento avançado de efluente em que os resultados obtidos de eficiências médias de remoção foram bem superiores quando utilizaram coagulação associada a microfiltração com eficiência médias acima de 95 %. Estas

constatações evidenciam a necessidade do processo de coagulação associado a microfiltração na remoção dos parâmetros estudados.

4 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais foi possível concluir que a concentração e pH do efluente influenciam significativamente, ao nível significância de 5 % de probabilidade na separação da biomassa de *Aphanothece*, constatado através dos parâmetros considerados como respostas.

A melhor condição indicada foi 300 mg. L⁻¹ de FeCl₃ e tanino em pH 7,0 na separação da biomassa com eficiências de remoção de DQO, Turbidez e SS de até 91 %, 96 % e 96 %, para o tanino.

A utilização de tanino é uma alternativa viável quando se visa o tratamento de efluente da indústria de laticínios bem como separação da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, contribuindo para um processo de tratamento mais limpo. Pelos dados apontados, o tanino na concentração de 300 mg. L⁻¹ e pH 7,0 foi o coagulante mais apropriado para tratar o efluente da indústria de laticínios bem como para separação da biomassa gerada.

Por fim, os resultados demonstraram que a associação do tratamento por *Aphanothece*, coagulantes e microfiltração é eficaz quando se visa o reúso do efluente de laticínios e se adéqua as características da potabilidade da água.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M.I.; SÁEZ, J.; LLORÉS, M.; SOLER, A.; Ortuño, J.F. Nutrient removal and sludge production in the coagulation – flocculation process. **Water Research**, v. 36, p. 2910 - 2919, 2002.

AL-MUTAIRI, N. Z.; HAMODA, M.F.; AL-GHUSAIN, I. Coagulant selection and sludge conditioning in a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 115 - 119, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 2005.

AMUDA, O.S.; AMOO, I.A. Coagulation/flocculation process and sludge conditioning in beverage industrial wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, p. 778 - 783, 2007.

ANIRUDHAN, T. S.; SUCHITHRA, P. S. Synthesis and characterization of tannin-immobilized hydrotalcite as a potential adsorbent of heavy metal ions in effluent treatments. **Applied Clay Science**, v. 42, p. 214 – 223, 2008.

BALLANEC, B.; GÉSAN-GUIZIOU, G.; CHAUFER, B.; RABILLER-BAUDRY, M.; DAUFIN, G. Treatment of dairy process waters by membrane operation for water reuse and milk constituents concentration. **Desalination**, v. 147, p. 89 – 94, 2002.

BASHAN, L. E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J.-P, BASHAN, Y. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**. v. 36, p. 2941 - 2948, 2002.

BASTOS, G.B.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA L.Q.; QUEIROZ, M.I. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science**. v. 5, p. 258-264, 2010.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN , J.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.C. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 1019 – 1025, 2010.

BENSADOK, K.; BELKACEM, M.; NEZZAL, G. Treatment of cutting oil/water emulsion by coupling coagulation and dissolved air flotation. **Desalination**, v. 206, p. 440 - 448, 2007.

BILANOVIC, D.; SHELEF, G. Flocculation of microalgae with cationic polymers- Effects of médium salinity. **Biomass**, v. 17, p. 65 - 76, 1988.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de 24 março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] União**, 24 mar.

CASTAING, J.-B.; MASSÉ, A. PONTIÉ, M; SÉCHET, V.; HAURE, J.; JAOUEN, P. Investigating submerged ultrafiltration (UF) and microfiltration (MF) membranes for seawater pre-treatment dedicated to total removal of undesirable micro-algae. **Desalination**, v. 253, p. 71 – 77, 2010.

CHEN, J.-J.; YEH, H.-H. The mechanisms of potassium permanganate on algae removal. **Water Research**, v. 39, p. 4420 – 4428, 2005.

CHEN, W.; LIU, J. The possibility and applicability of coagulation-MBR hybrid system in reclamation of dairy wastewater. **Desalination**, v. 285, p. 226 – 231, 2012.

COSTA, E. R. H. **Melhoria da qualidade da água tratada e aumento da capacidade de ETAS através da escolha adequada de coagulantes e auxiliares, em águas com**

alcalinidade alta. In: Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23., 2009, Joinville. Joinville: ABES.

DE GODOS, I.; GUZMAN, H. O.; SOTO, R.; GARCÍA-ENCINA, P. A., BECARES, E.; MUÑOZ, R.; VARGAS, V. A. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 923 – 927, 2011.

EBELING, J. M.; SIBRELL, P. L.; OGDEN, S. R.; SUMMERFELT, S. T. Evaluation of chemical coagulation-flocculation aids for the removal of suspended solids and phosphorus from intensive recirculating aquaculture effluent discharge. **Aquacultural Engineering**, v. 29, p. 23 - 42, 2003.

EL-BESTAWY, E.; HUSSEIN, H. Comparison between biological and chemical treatment of wastewater containing nitrogen and phosphorus. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 195 - 203, 2005.

EPA, **Guidelines for water reuse**, US Environmental Protection Agency Report, EPA/625/R-92/004, US Agency for International Development, Washington, DC, 1992.

FARIZOGLU, B.; UZUNER, S. The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 57, p. 46 – 54, 2011.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F. G.; ROBLES, M. A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491 - 515, 2003.

HAMDANI, A.; MOUNTADAR, M.; ASSOBBHEI, O. Comparative study of the efficacy of three coagulants in treating dairy factory waste water. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 83 - 88, 2005.

HARUN, R.; SINGH, R. M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037 – 1047, 2010.

HENDERSON, R.; PARSONS, S.A.; JEFFERSON, B. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae. **Water Research**, v. 42, p. 1827 – 1845, 2008.

KAWAMURA, S. Effectiveness of natural polyelectrolytes in water treatment. **Journal American Water Works Association**, v. 83, p. 88 - 91, 1991.

KIM, S.-H.; MOON, S. G.-Y.; YOON, C.-H. Role of coagulation in membrane filtration of wastewater for reuse. **Desalination**, v. 173, p. 301 - 307, 2005.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V.C.; MALL, I. D. Treatment of dairy wastewater by inorganic coagulants: Parametric and disposal studies. **Water Research**, v. 44, p. 5867 - 5874, 2010.

LEE, B. K.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 111 - 124, 2001.

LEE, J. S.; SUNG, K. D. Isolation of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalga *Chorella* s.p KR-1. **Renewable Energy**, v. 16, p. 1019 - 1022, 1998.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043 – 1049, 2009.

LUO, J.; CAO, W.; DING, L.; ZHU, Z.; WAN, Y.; JAFFRIN, M.Y. Treatment of dairy effluent by shear-enhanced membrane filtration: The role of foulants. **Separation and Purification Technology**, v. 96, p. 194 – 203, 2012.

MATOS, A. T.; CABANELLAS, C. F. G.; CECON, P. R. Efeito da concentração de coagulantes e do ph da solução na turbidez da água, em recirculação, utilizada no processamento dos frutos do cafeeiro. **Engenharia Agrícola**, v. 27, p. 544 - 551, 2007.

MIERZWA, J. C. **Água na indústria: uso racional e reúso**. p. 143, 2005.

MITTAL, G. S. Treatment of wastewater from abattoirs before land application-a review. **Bioresource Technology**, v. 9, p. 1119 - 1135, 2006.

MOGHADDAM, S.S.; MOGHADDAM, M.R.; ARAMI, M. Coagulation/flocculation process for dye removal using sludge from water treatment plant optimization through response surface methodology. **Journal Hazardous Materials**, v. 175, p. 651 - 657, 2010.

MOLINA-GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F. G.; ROBLES, M. A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491 - 515, 2002.

MORAES, L. C. K. **Estudo da coagulação e ultrafiltração para produção de água potável**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

MYERS, R. H. MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, 2 nd ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.

NUÑEZ, V. J.; VONTOLINA, D.; NIEVES, M.; PINA, P.; MEDINA, A.; GUERRERO, M. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 161 - 164, 2001.

ÖZACAR, M., SENGIL, A. Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for coagulation of colloidal particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 229, p. 85 – 96, 2003

PARK, S.; YOON, T. Effects of iron species and inert minerals on coagulation and direct filtration for humic acid removal. *Desalination*, v. 239, p. 146 – 158, 2009.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in batch reactor. *Food Science and Biotechnology*, v. 13, p. 130-141, 2004.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111. p. 01 - 61, 1979.

SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; BELTRÁN-HEREDIA, J. Nature Is the Answer: Water and Wastewater Treatment by New Natural-Based Agents. *Advances in Water Treatment and Pollution Prevention*, p. 337 - 375, 2012.

SANCHO, M. E. M.; CASTILLO, J. M. J.; YOUSFI, F. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 811 - 818, 1999.

SANTOS, H. R. **Aplicação de coagulantes no afluente de reator anaeróbio de efluente expandido alimentado com esgoto doméstico**. 2001. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

SARKAR, B; CHAKRABARTI, P. P; VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. Wastewater treatment in dairy industries—possibility of reuse. *Desalination*, v. 195, p. 1 – 3, 2006.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science. Technology*, v. 91, p. 21 – 40, 2001.

SILVA, A. G.; HORNES, M.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Application of coagulants in pretreatment of fish wastewater using factorial design. *Desalination*, v. 1, p. 208 - 214, 2009.

SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Valéria Christina Amstalden - São Paulo : Livraria Varela, 1997, p. 31.

SILVA-MANETTI, A. G.; HORNES, M. O.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Fish processing wastewater treatment by combined biological and chemical processes aiming at water reuse. *Desalination and Water Treatment*, v. 29, p. 196 - 212, 2011.

TANAC. **Boletim Informativo**. Montenegro – RS. Brasil, 2008.

TONDI, G.; OO, C. W.; PIZZI, A.; THEVENON, M. F. Metal absorption of tannin-based rigid foams, **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 336 – 340, 2009.

UDUMAN, N., QI Y.; DANQUAH, M. K.; HOADLEY, A. F. A. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 935 – 940, 2010.

VIANNA, M. R. **Hidráulica aplicada às estações de tratamento de água**. Belo Horizonte:Imprimatur, 2002. 576 p.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**, v. 219, p. 190 – 202, 2008.

WANG, Y.; HUANG, X.; YUAN, Q. Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic/aerobic membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1733 - 1739, 2005.

ARTIGO 4

**BIOPROSPECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS POR *Aphanothece*
microscopica Nägeli CULTIVADA NO EFLUENTE DE LATICÍNIOS**

**BIOPROSPECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS POR *Aphanothece
microscopica* Nägeli CULTIVADA NO EFLUENTE DE LATICÍNIOS**

SILVA-MANETTI, Adriana G.; QUEIROZ, Maria I.

Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos Programa de Pós
Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos Laboratório de Biotecnologia. Rio
Grande – RS. E-mail: biotecnofurg@yahoo.com.br; E-
mail:mariaisabel.queiroz@pesquisador.cnpq.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de carboidratos por *Aphanothece
microscopica* Nägeli quando cultivada no efluente da indústria de laticínios, bem como
estimar o potencial de produção de carboidratos. Os cultivos foram conduzidos
heterotroficamente usando o efluente de laticínios como meio de cultivo em biorreatores
de coluna de bolhas nas condições de concentração celular inicial de 200 mg. L⁻¹, pH
ajustado a 7,6, reator isotérmico operando na temperatura de 30°C e tempo de retenção
celular de 16 h, razão C/N 60 e N/P 10. Ao final dos cultivos a biomassa foi separada
usando como coagulante o tanino na concentração de 300 mg. L⁻¹ a pH 7,0. Os resultados
indicaram que as maiores produções de carboidratos são registradas para a fase
estacionária expressos pelas concentrações de 33,5 %, 24,8 % e 8,8 % para carboidrato
total, capsular e parede celular, respectivamente. Os carboidratos se caracterizaram por
apresentar glicose, sacarose, rafinose, ribose e frutose, tendo como açúcar majoritário a
glicose. Os resultados demonstraram ainda, que nas condições experimentais importantes
concentrações de carboidratos foram produzidas por *Aphanothece microscopica* Nägeli
cultivada no efluente da indústria de laticínios. Podendo ser estimada uma produção anual
de 460 t/ano, dos quais 73 % correspondem os carboidratos extracelulares (capsular) e 27
% aos da parede celular.

Palavras-chave: Cianobactéria; Composição química; Cultivo heterotrófico; Biomassa;
Carboidratos capsulares; Carboidratos parede celular.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the production of carbohydrates by *Aphanothece microscopica* Nägeli when cultured in the effluent of the dairy industry, as well as to estimate the potential production of carbohydrates. The cultures were conducted heterotrophically using dairy effluents as culture medium in a bubble column bioreactor under the following conditions, initial cell concentration of 200 mg L⁻¹, pH adjusted to 7.6, isothermal reactor operating at a temperature of 30°C and hydraulic retention time of 16 hours, the C/N ratio of 60 and N/P of 10. At the end of the culturing biomass was separated by using tannin as a coagulant in a concentration of 300 mg L⁻¹ at pH 7.0. The results indicated that the highest yields of carbohydrates are registered for the stationary phase expressed by the concentration of 35.5 %, 24.8 % and 8.8 % for total carbohydrate, capsular and cell wall, respectively. The carbohydrate was characterized by glucose, sucrose, raffinose, ribose and fructose, with glucose as the main sugar. The results also showed that under the experimental conditions important concentrations of carbohydrates were produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli cultured in the effluent from the dairy industry. An annual production of 460 t/year can be estimated, of which 73 % correspond to extracellular carbohydrates (capsular) and 27 % of the cell wall.

Keywords: Biomass; Cyanobacteria; Capsular carbohydrates; Cell wall carbohydrates; Chemical composition; Heterotrophic culture.

1 INTRODUÇÃO

O uso de cianobactérias no tratamento de águas residuárias é uma alternativa técnico-econômica potencial em relação aos sistemas convencionais de tratamento secundário e terciário de efluentes. Esses processos são baseados nas rotas metabólicas respiratórias, que algumas espécies de cianobactérias apresentam, no qual fontes exógenas de carbono orgânico e nutrientes inorgânicos são bioconvertidos em produtos do metabolismo heterotrófico, particularmente em uma biomassa com elevados teores de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos (ZEPKA et al., 2010).

Em virtude das características dessa biomassa, processos baseados na utilização de cianobactérias têm sido considerados nos últimos anos como tecnologias em potencial para converter resíduos industriais em insumos proteicos usados na formulação de rações animais e matérias graxas para a indústria de biodiesel, sendo sua composição química altamente variável e rica em compostos como proteínas, lipídios e carboidratos (QUEIROZ et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; JACOB-LOPES et al., 2010).

Na biosfera, os carboidratos são os principais compostos orgânicos produzidos por estes micro-organismos, seja em cultivos fotossintéticos como heterotróficos, podendo compreender de 20-50 % do peso do seco de microalgas/cianobactérias, servindo como uma importante fonte de energia e estrutural destes micro-organismos (XU et al., 2006; LIANG et al., 2009; O'GRADY & MORGAN et al., 2011).

Muitas cianobactérias podem sintetizar elevada concentração de carboidratos durante o crescimento celular, dependendo das condições de cultivo. Essa propriedade destes micro-organismos, vem atraindo o interesse em virtude do seu potencial em várias aplicações industriais fazendo destes micro-organismos possíveis fontes de novos biocompostos. Dos carboidratos que compõem a célula, alguns são componentes da parede celular, enquanto outros podem ser encontrados formando uma cápsula gelatinosa amorfa fracamente ligada a célula podendo ser excretados para o meio extracelular. Esses carboidratos são conhecidos como exopolissacarídeos. Estas frações (parede celular e capsular) irão compor o total de carboidratos da biomassa de algumas cianobactérias (SUTHERLAND, 1998; DOUMIT & PINOTTI, 2004).

No que se refere a composição de micro-organismo os açúcares livres e combinados constituem uma grande fração da maioria dos organismos e até 60 % do peso seco de algumas algas dependendo das condições de cultivo (MOPPER et al. 1992; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000.).

As microalgas/cianobactérias apresentam-se como uma nova fonte praticamente ilimitada de compostos funcionais pela ampla diversidade e possibilidade de cultivo e possibilidade de crescimento em diferentes condições de cultivo o que pode levar ao enriquecimento de alguns bioativos (PLAZA et al., 2010; ZEPKA, et al., 2010). Neste contexto o trabalho teve por objetivo estimar o potencial de produção de carboidratos por *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando cultivada no efluente de laticínio, bem como caracterizar estes compostos na biomassa gerada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

2.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RS Man92), cedidas pela a Unidade de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio Grande isoladas do estuário da cidade de Rio Grande, RS, Brasil, foram cultivadas e mantidas em meio BG-11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por Rippka et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 25°C e pH 7,6 (QUEIROZ et al., 2004). Os cultivos foram realizados em reator de vidro em câmara otimizada quanto à luz e temperatura. Foram utilizadas lâmpadas incandescentes e fluorescentes com intensidade luminosa e temperatura controlada. A intensidade luminosa foi otimizada em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG-11 é composto por $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0,04 g.L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,075 g.L⁻¹), Na_2CO_3 (2 g.L⁻¹), $NaNO_3$ (1,5 g.L⁻¹), EDTA (0,001 g.L⁻¹), H_3BO_3 (2,86 g.L⁻¹), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,81 g.L⁻¹), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,222 g.L⁻¹), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,39 g.L⁻¹), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,079 g.L⁻¹), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,040 g.L⁻¹), $C_6H_8O_7$ (0,006 g.L⁻¹) e $FeC_6H_5O_7 \cdot (NH_4)_2$ (0,006 g.L⁻¹) (RIPPKA et al., 1979).

A concentração celular na fase exponencial para tomada dos inóculos foi determinada gravimetricamente mediante filtração de volume conhecido de meio de cultura BG-11 contendo as células do micro-organismo. A cultura foi filtrada em filtro Millipore (0,45 µm), previamente seco a 60°C por 24 h. Os filtros foram secos até peso constante e a biomassa quantificada.

2.2 Efluente

A água residuária do processamento de laticínios foi utilizada como meio de cultivo. O efluente foi obtido em uma indústria de processamento de produtos lácteos (Pelotas, RS), coletado na saída do tanque de equalização da estação de tratamento de efluentes por um período de 24 meses. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e congeladas a -18°C . O efluente foi caracterizado quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (N-NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+), P- $\text{PO}_4\text{-3}$; sólidos totais (ST), sólidos suspensos (SS), sólidos fixos (SF) e sólidos voláteis (SV), alcalinidade, ácidos voláteis totais (AVT), cálcio e dureza. As análises foram realizadas segundo os procedimentos descritos em *Standard Methods* para análise de águas e efluentes (APHA, 2005). Foi caracterizado ainda, quanto a carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico usando glicose como padrão (DUBOIS et al., 1956). As razões C/N e N/P foram determinadas em função das concentrações de DQO, N-NTK e $\text{P-PO}_4\text{-3}$ presentes no efluente, conforme indicado por Hornes & Queiroz (2004).

2.3 Desenvolvimento dos experimentos

Experimentos em triplicata na ausência de luz foram conduzidos em reator de mistura completa em sistema descontínuo com capacidade de 4,5 L, constituído de uma extensão cilíndrica de PVC com dimensões de 100 cm de altura e 10 cm de diâmetro. O sistema de dispersão de gases do reator consistiu em um difusor de ar de 1,5 cm localizado no centro da base da coluna para promover a aeração de 1 VVM e agitação do meio. A cada experimento o efluente da indústria de laticínios foi descongelado e então esterilizado a $1,1 \text{ kgf.cm}^{-2}$ (120°C) por 15 min para realização dos experimentos. Estes foram conduzidos em câmara com controle de temperatura (TC-401) da marca Tecnal. No efluente previamente ajustado a pH 7,6, células de *Aphanothece microscopica* Nägeli foram inoculadas. As condições dos cultivos foram: inóculo de *Aphanothece* de 200 mg. L^{-1} , pH do meio ajustado a 7,6, 30°C , ausência de luminosidade, razão C/N 60 e N/P 10. As razões C/N, foram ajustadas mediante a adição de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e a razão N/P através da adição de fosfato dissódico (Na_2HPO_4).

Os experimentos foram monitorados, por um período de 24 h, mediante tomada de amostras a intervalos de 2 em 2 h. O efluente foi filtrado em filtros Millipore de $0,45\mu\text{m}$ de porosidade e a biomassa gravimetricamente determinada. No filtrado foi avaliado

DQO, N-NTK e P-PO₄⁻³, de acordo com a metodologia descrita em *Standard Methods*, para análise de águas e efluentes (APHA, 2005). Os carboidratos totais, também foram analisados no filtrado, conforme indicado por DUBOIS et al. (1956). Paralelamente a cinética de crescimento celular foi avaliada.

2.4 Cinética de crescimento celular

As variáveis cinéticas, velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (tg) e fator de conversão de substrato em células (Yx/s), foram determinadas conforme indicado por Levenspiel (2000). O procedimento de avaliação, teve como base as equações 2, 3, 4, 5 e 6.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{equação 2})$$

onde:

μ : velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

dx: variação da concentração celular ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

dt: variação do tempo (h);

X: concentração celular ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Integrando-se a equação 2 obtém-se a equação 3.

$$X = X_0 e^{\mu_{\text{máx}}(\Delta t)} \quad (\text{equação 3})$$

onde:

X: concentração celular no final da fase exponencial ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

X₀: concentração celular no início da fase exponencial ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

$\mu_{\text{máx}}$: máxima velocidade específica de crescimento do micro-organismo (h^{-1});

Δt : intervalo de tempo do crescimento exponencial (h)

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (\text{equação 4})$$

onde:

tg: tempo de geração (h);

$\mu_{\text{máx}}$: máxima velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (\text{equação 5})$$

onde:

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato em células (mg biomassa. mg S^{-1});

dX = variação da concentração celular (mg. L^{-1});

dS = variação do substrato (mg. L^{-1}).

$$P_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (\text{equação 6})$$

onde:

P_x : produtividade ($\text{mg. L}^{-1}\text{h}^{-1}$);

ΔX : variação da concentração final e inicial (mg. L^{-1});

Δt : variação entre o tempo final e inicial (h).

2.5 Separação da biomassa

A biomassa foi se separada do meio de cultivo em cada fase de crescimento, por coagulação/floculação, utilizando como coagulante tanino (Tanfloc SG – Tanac), polímero catiônico obtido por meio de um processo de lixiviação da casca de acácia negra, constituído basicamente de tanato quaternário de amônia, certificado pela *National Saneament Federal-USA* (TANAC, 2008).

A concentração de coagulante utilizada foi de 300 mg. L^{-1} e pH aferido a 7,0. O procedimento foi realizado em *Jar-Test* (Nova ética, 218 MBD, Brasil). Utilizou-se agitação rápida de 110 rpm durante 30 s, seguida de etapa lenta com velocidade de 50 rpm durante 10 s e tempo de sedimentação de 15 min (SILVA-MANETTI, 2009), obtendo-se assim as células coaguladas para então serem analisadas quanto a quantificação e identificação de carboidratos.

2.6 Determinação de carboidratos

2.6.1 Determinação de carboidratos totais

Os carboidratos totais foram determinados na biomassa por espectrofotometria, pelo método fenol- sulfúrico, utilizando glicose como padrão (DUBOIS et al., 1956).

2.6.2 Extração de carboidratos extracelulares

A extração dos carboidratos extracelulares foi realizada, segundo a metodologia indicada por Dueñas et al. (2003). Alíquotas de 200 mL de efluente foram centrifugados a 4000 xg por 30 min, separando-se assim o meio de cultura da biomassa. À biomassa precipitada foi adicionado NaOH 2N, mantendo a mistura sob agitação por 2h. Após este período, a biomassa foi descartada e o sobrenadante foi tratado com excesso de etanol (3 v/v) por 24 h a 4°C, para que ocorresse a precipitação dos carboidratos extracelulares. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75 %. Uma vez centrifugado o sobrenadante foi descartado, e o precipitado quantificado, conforme item 2.6.3. Os carboidratos da parede celular foram determinados pela subtração dos carboidratos da cápsula mucilaginosa do total na biomassa.

2.6.3 Quantificação de carboidratos extracelulares

Após a extração dos carboidratos extracelulares, estes foram analisados quanto a concentração de carboidratos totais quantificados espectrofotometricamente pelo método fenol-sulfúrico usando glicose como padrão. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H₂SO₄ concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor alaranjada (DUBOIS et al., 1956).

2.6.4 Identificação dos carboidratos na biomassa gerada

A identificação dos carboidratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em aparelho SHIMADZU equipado com detector por índice de refração (RID 10A) da marca SHIMADZU. Para a separação dos açúcares foi utilizada uma coluna para ácidos orgânicos (coluna HPX-87H 300x 7,80 mm), a uma temperatura de 40°C, sendo utilizada como fase móvel a solução de ácido sulfúrico 8 mM. L⁻¹ em H₂O mQ. Os tempos de retenção dos carboidratos componentes das amostras foram comparados com padrões. As percentagens relativas dos açúcares foram calculadas por integração de áreas, sendo feito o ajuste de resposta ao detector para cada carboidrato.

2.7 Avaliação dos resultados

Os resultados foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias por teste de Tukey utilizando o *software* Statistica 7.0 (MYERS & MONTGOMERY, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comportamento do consumo de carboidratos, nitrogênio e DQO na produção de carboidratos extracelulares

Meios de culturas com altas razões C/N, os quais refletem altas concentrações de matéria orgânica e baixo teor de nitrogênio, tem sido frequentemente reconhecidos, como adequados para produção de carboidratos (DE PHILIPPIS & VICENZINI, 1998; YANG et al., 2000; NETO et al., 2004; NAMBOODIRI et al., 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2011a; MAGER & THOMAS, 2011).

As Figuras 1, 2, 3 e 4, refletem o comportamento do consumo de carboidratos, DQO, N-NTK, bem como a produção de biomassa e carboidratos extracelulares (capsular ou mucilaginoso), por *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria de laticínio ajustado a razão C/N 60. Observa-se (Figura 2), máximos de carboidrato capsular (24 mg.L^{-1}), quando são registrados os maiores índices de consumo de carboidratos total (aproximadamente 97 %), bem como de DQO e N-NTK (Figuras 1 e 3), na fase estacionária de crescimento (Figura 4). Isso sugere, que não houve liberação destes carboidratos, para o meio de cultivo, mas que constituem as cápsulas mucilaginosas, as quais permanecem associadas as células. Sutherland et al., (1998), reportam que os carboidratos extracelulares, ao serem sintetizados, podem permanecer aderidos à célula, formando cápsulas, as quais são estruturas compactas associadas a superfície celular ou como massa mucilaginosa amorfa fracamente ligada as células, ou serem liberadas no meio de cultivo, como material amorfo.

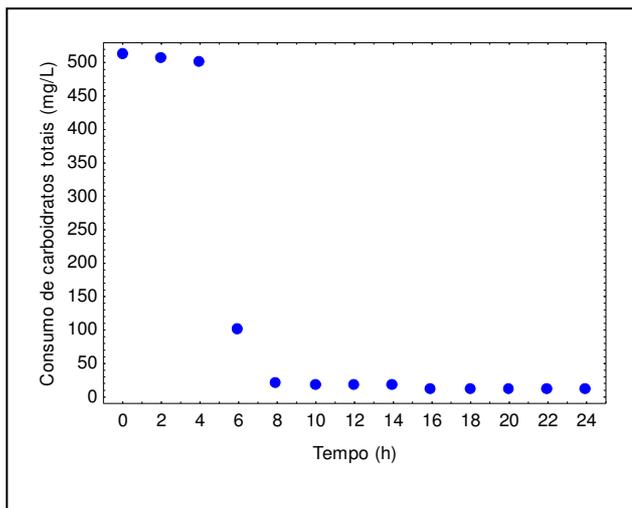


Figura 1. Comportamento do consumo de carboidratos contidos no efluente da indústria de laticínios nas condições C/N60, N/P10, por *Aphanethece microscopica* Nägeli em função do tempo.

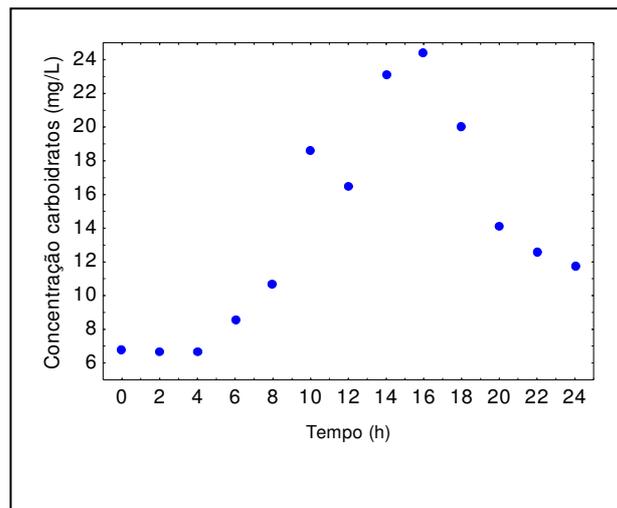


Figura 2. Comportamento da concentração de carboidratos extracelular produzidos por *Aphanethece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente de laticínios nas condições C/N60, N/P10 em função do tempo.

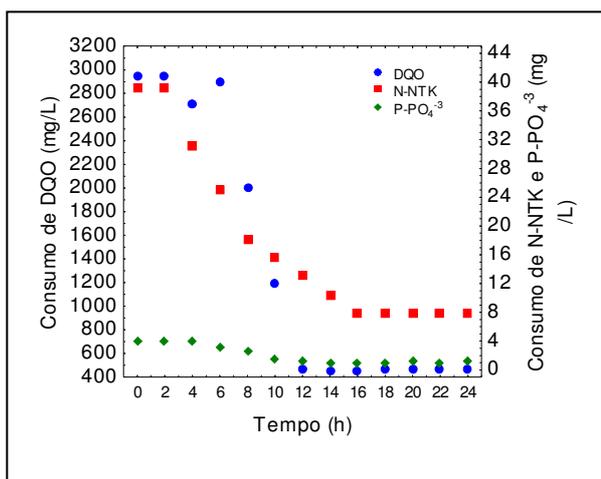


Figura 3. Comportamento do consumo de DQO, N-NTK, P-PO₄³⁻ contidos no efluente da indústria de laticínios nas condições C/N60, N/P10, por *Aphanethece microscopica* Nägeli em função do tempo.

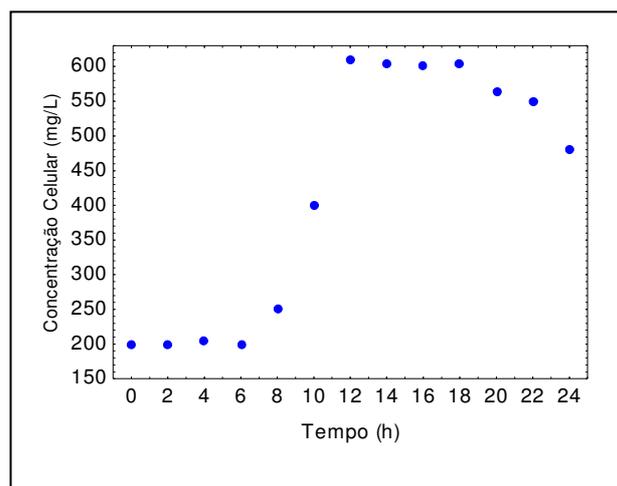


Figura 4. Comportamento do crescimento celular de *Aphanethece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente da indústria de laticínios nas condições C/N60, N/P10, em função do tempo.

Considerando o comportamento da Figura 3, verifica-se, que em 16 h de cultivo, quando as maiores concentrações de carboidrato capsular são registradas (Figura 2) menores concentrações de N-NTK são obtidas. Segundo diferentes autores, quando as concentrações em nitrogênio no meio são baixas, este nutriente torna-se limitante e o carbono fixado é dirigido para a síntese de carboidratos extracelulares (DE PHILIPPIS & VICENZINI, 1998; RAMOS et al., 2001; PEREZ –GARCIA et al., 2011; MAGER & THOMAS, 2011).

A literatura relata que a produção de carboidratos extracelulares por cianobactérias apresenta correlação negativa com o consumo de carboidrato contidos nos meios de cultivo, indicando que parte do carboidrato presente no meio de cultivo é convertido a carboidratos extracelulares (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998; YANG et al., 2000). A relação existente entre consumo de carboidrato total no efluente por *Aphanothece* e a concentração de carboidratos extracelulares produzidos por ela ao longo das 24 h de cultivo pode ser avaliada segundo o comportamento da Figura 5, que relaciona as concentrações registradas em cada tempo de cultivo. A forte correlação negativa registrada (-0,67) entre estas variáveis demonstra que ocorre o consumo de carboidrato no efluente de laticínios por *Aphanothece* há uma elevada produção de carboidratos extracelulares. O mesmo comportamento ocorre com o consumo de DQO, N-NTK e P-PO₄⁻³ com correlações registradas de (-0,77, -0,73, -0,79), respectivamente (Figuras 6 a 8). Os resultados indicam que elevada parcela destes nutrientes são convertidos a metabólitos produzidos por *Aphanothece microscopica* Nägeli, Figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

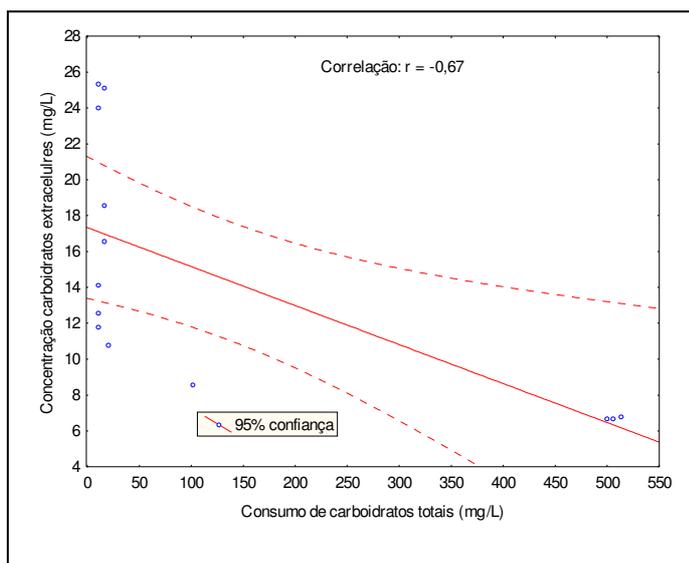


Figura 5. Relação entre consumo de carboidratos totais no efluente e produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli.

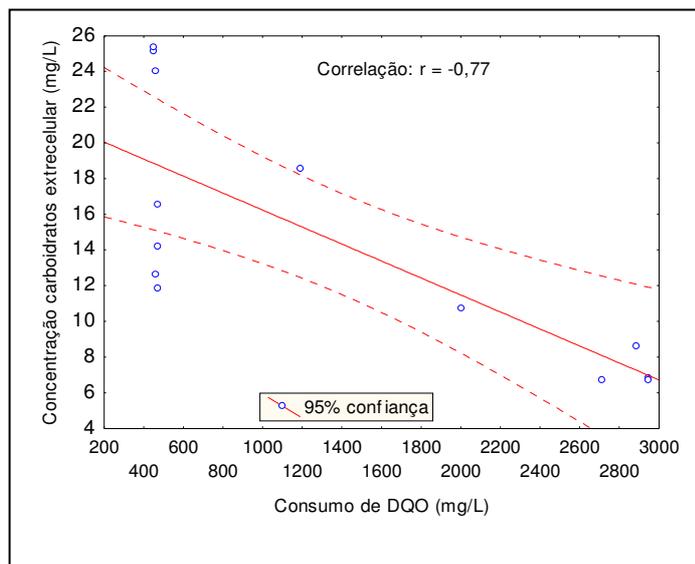


Figura 6. Relação entre consumo de DQO no efluente e produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli.

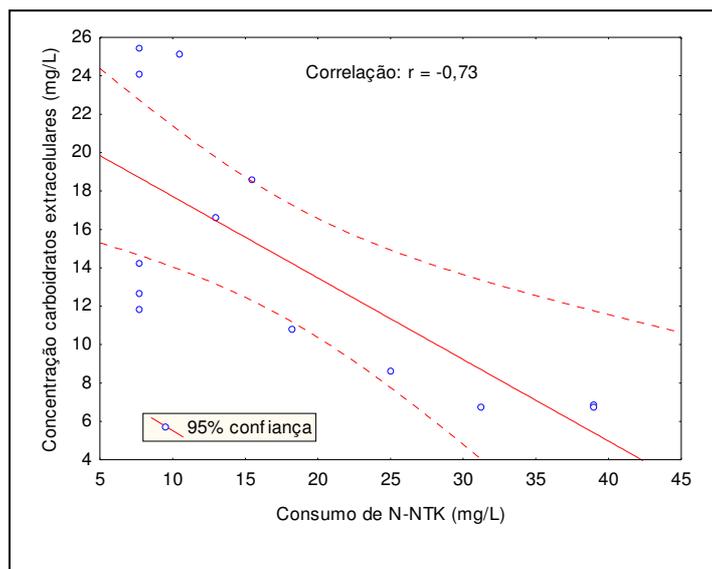


Figura 7. Relação entre consumo de N-NTK no efluente e produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli

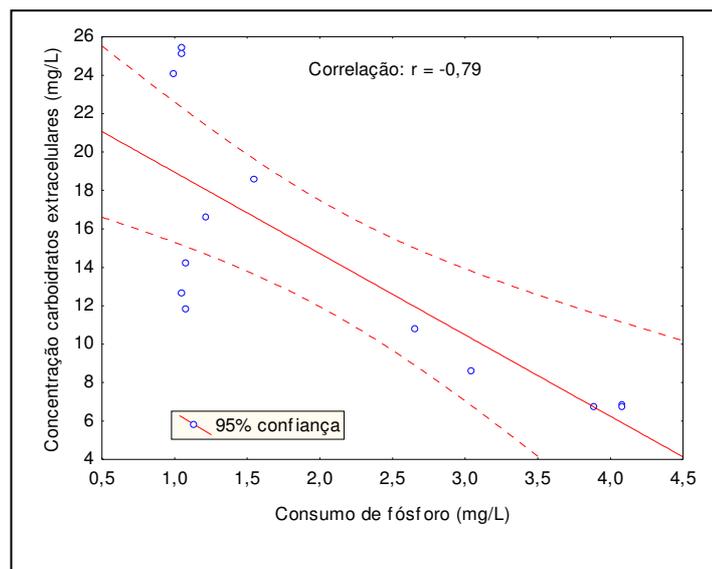


Figura 8. Relação entre consumo de P-PO₄⁻³ no efluente e produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli

A Tabela 1 apresenta as conversões ($Y_{x/s}$) de carboidrato total, N-NTK, fósforo e DQO em carboidratos extracelulares, nas diferentes fases de crescimento, definidas segundo o comportamento da Figura 4, bem como a produtividade média em carboidratos.

Tabela 1. Valores médios de fator de conversão dos substratos contidos no efluente em carboidratos extracelulares, por *Aphanothece microscopica* Nägeli, nas diferentes fases de crescimento

	Fases de crescimento			
	Lag	Log	Estacionária	Morte
$P_{\text{Carb.extrac.}}$	1,79 ^a	2,01 ^b	6,20 ^c	3,20 ^d
$Y_{\text{Carb.extrac./N-NTK}}$	0,20	0,75	2,85	1,64
$Y_{\text{Carb.extrac./DQO}}$	0,002	0,008	0,05	0,027
$Y_{\text{Carb.extrac./P-PO}_4^{-3}}$	1,78	6,41	24,07	11,93
$Y_{\text{Carb.extrac./carboidrato efluente}}$	0,01	0,35	2,00	1,28

$P_{\text{Carb. extrac.}}$: produtividade média de carboidratos extracelulares em cada fase ($\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$); $Y_{x/s}$ ($\text{mg carboidratos extracelulares/mg}^{**}\text{substratos}$): fator de conversão dos substratos ** (N-NTK-nitrogênio total; DQO-demanda química de oxigênio; P-PO₄⁻³-fósforo total; carboidrato efluente-concentração de carboidratos totais no efluente) em carboidratos extracelulares; Os valores apresentados são médias de 6 repetições; Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as fases de crescimento.

Avaliando a Tabela 1, observa-se que a produtividade máxima de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli nas condições experimentais foi de 6,20 mg. L⁻¹.h⁻¹, registrada na fase estacionária.

Maziero et al. (1999) avaliaram a produção de carboidratos extracelulares por *P. flabellatus*, *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus* e *P. sajour-caju*, cultivadas em meio de cultivo padrão, encontrando valores de 2,0, 0,32, 2,38 e 1,72 g.L⁻¹, respectivamente. Obtendo produtividades de até 0,75 g.L⁻¹. dia⁻¹, estes valores foram semelhantes ao encontrados por Hess et al. (2006). No presente trabalho foram obtidos maiores produtividades em menor tempo de cultivo (16 h). Este fato pode ser justificado pelo meio de cultivo utilizado, considerando o rápido crescimento típico de cianobactérias desenvolvidas em efluentes agroindustriais de micro-organismos, demonstrando a capacidade de removerem e assimilarem heterotroficamente compostos orgânicos e inorgânicos (GUERRERO et al., 1999; OGBONNA & TANAKA, 2000; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; HORNES & QUEIROZ, 2004; QUEIROZ et al., 2007).

O perfil dos carboidratos extracelulares e o rendimento de produção é, na maioria dos casos, extremamente dependente de fatores ambientais, bem como condições fisiológicas como teor de nitrogênio e fósforo disponível, fonte de carbono, aeração, temperatura e pH da cultura (ALVES, 2001; PACE & RHIGELATO, 2008). Dentro deste cenário se observa haver diferença estatisticamente definida através do teste de Tuckey ao nível 95 % de confiança entre as produtividades de carboidratos extracelulares nas fases de crescimento (Tabela 1). É registrado um aumento de aproximadamente 30 % na produtividade de carboidratos extracelulares da fase logarítmica para a fase de morte celular. Este fato pode ser atribuído a lise celular. Assim, a definição da curva de crescimento (Figura 4) é destacada como de suma importância, para a garantia da quantificação dos carboidratos extracelulares, assegurando que os carboidratos extracelulares sejam secretados por células viáveis, fator importante para não se classificar como exopolissacarídeos o material de lise celular.

Com relação aos fatores de conversão dos substratos em produto ($Y_{x/s}$), entre os nutrientes avaliados destaca-se o fósforo (24 mg de carboidratos extracelulares/mg de P-PO₄⁻³), registrado na fase estacionária de crescimento, como para os demais nutrientes, demonstrando a importância do fósforo nos valores de produtividade registrados.

Esta elevada produção de carboidratos extracelulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli pode estar associada ao aumento da concentração de carbono fornecido ao meio a fim de adequar a razão C/N a 60, bem como ao ajuste da razão N/P a

10 associado com a intensa atividade metabólica celular o que ocasionou elevada produtividade ($6,20 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$) de carboidratos extracelulares.

A Tabela 2 descreve a estimativa da produtividade de carboidratos extracelulares (cápsula mucilaginosa), total, bem como da parede celular, calculada mediante a diferença de carboidratos capsulares da concentração de carboidratos totais em função da produção de efluente gerado na indústria de laticínios da qual o efluente utilizado como meio de cultura deste trabalho foi originado. Foi estimada uma produtividade em carboidratos de 460 t/ano, 338 t/ano e 120 t/ano de carboidratos totais, capsular e da parede celular respectivamente, considerando a produção anual de efluente de 950.000 L. De acordo com a disponibilidade de nitrogênio, fósforo e carboidratos totais do efluente de laticínios, é possível considerar, através dos resultados obtidos, uma alta conversão destes nutrientes em carboidratos. Esses resultados são bastante promissores, uma vez que, indicam que o efluente da indústria de laticínios quando otimizadas suas condições de C/N e N/P, bem como a temperatura de cultivo pode ter grande potencial para produção destes biocompostos, indicando que a concentração tanto de nitrogênio, fósforo e carboidratos no meio de cultivo, apresenta grande importância ao se estimar a produção por ano no efluente da indústria de laticínios.

Tabela 2. Estimativa da produção de carboidratos por *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente de laticínios

Parâmetros utilizados para o cálculo	Valor estimado
Carb. totais	10,5-33,5
Carb.capsular	6,79-24,82
Carb.parede celular	3,0-12
$Y_{\text{Carb.total/N-NTK}}$	3,86
$Y_{\text{Carb.capsular/N-NTK}}$	2,85
$Y_{\text{Carb.parede celular/N-NTK}}$	1,01
$Y_{\text{Carb.total/carb.efluente}}$	2,80
$Y_{\text{Carb.capsular/carb.efluente}}$	2,07
$Y_{\text{Carb.parede celular/carboidrato efluente}}$	0,73
$Y_{\text{Carb.total/P-PO}_4^{-3}}$	32,52
$Y_{\text{Carb.capsular/P-PO}_4^{-3}}$	24,07
$Y_{\text{Carb.parede celular/P-PO}_4^{-3}}$	8,54
L água.L de leiteprocessado ⁻¹	1-10 L água.L.leiteprocessado ⁻¹
Volume efluente.ano ⁻¹	950.000 L.ano ⁻¹
¹ Carb.total.ano ⁻¹	44,24 t.ano ⁻¹
¹ Carb.capsular.ano ⁻¹	32 t.ano ⁻¹
¹ Carb.parede celular.ano ⁻¹	11,62 t.ano ⁻¹
² Carb.total.ano ⁻¹	460 t.ano ⁻¹
² Carb.capsular.ano ⁻¹	338 t.ano ⁻¹
² Carb.parede celular.ano ⁻¹	120 t.ano ⁻¹
³ Carb.total.ano ⁻¹	4,0 t.ano ⁻¹
³ Carb.capsular.ano ⁻¹	2,96 t.ano ⁻¹
³ Carb.parede celular.ano ⁻¹	1,05 t.ano ⁻¹

$y_{x/s}$: conversão de N-NTK, carboidrato do efluente, P-PO_4^{-3} em: carboidratos capsulares, parede celular e carboidratos totais ($\text{mg}_X (\text{Carb. extracel}) / \text{mgS}$); ¹Carboidrato gerado/ano: com base na média N-NTK no efluente (42 mg. L⁻¹); ²Carboidrato gerado/ano: com base na média carboidratos totais no efluente (600 mg. L⁻¹); ³Carboidrato gerado/ano: com base na média P-PO_4^{-3} no efluente (4,5 mg. L⁻¹).

Observa-se através da análise da Tabela 2 que, nas condições estudadas *Aphanothece microscopica* Nägeli é capaz de produzir diferentes concentrações de carboidratos extracelulares dependendo do nutriente biodisponível. Este fato ficou evidenciado pelas diferentes concentrações obtidas pelas fontes de nitrogênio, expressas

pela concentração de N-NTK do efluente da indústria de laticínios (42 mg. L⁻¹). Com esta biodisponibilidade de nitrogênio *Aphanothece* foi capaz de produzir cerca de 32 t/ano. Com a fonte de fósforo disponível, cerca de 4,5 mg. L⁻¹, ela produziu 2,96 t/ano e com a concentração de carboidratos totais contidos no efluente de laticínios (600 mg.L⁻¹) aproximadamente 340 t/ano. Estas constatações estão de acordo com a literatura que reporta concentrações de carboidratos extracelulares diferentes conforme a fonte de nutrientes (MORENO et al., 1998; NICOLAUS et al., 1999; LIN & CHEN, 2007; XIN et al., 2010; LAI, et al., 2011).

Estes carboidratos uma vez produzidos podem permanecer em contato com as células (cápsulas), ou podem ser liberados no meio, sem que haja relação física com a célula que os produziram, são carboidratos somáticos, localizados no citoplasma dentro da membrana plasmática (STACEY & BARKER, 1960; SMITH, 1983; BERTOCCHI et al., 1990 SUTHERLAND, 1990; MORENO et al., 1998; DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998; DOUMIT et al., 2004; SHENG et al., 2006; SHENG et al., 2010).

3.2 Carboidratos totais, capsular e da parede celular da biomassa produzida por *Aphanothece microscopica* Nägeli sob as condições de cultivo

Segundo Doumit & Pinotti (2004) os carboidratos sintetizados por cianobactérias dividem-se em três grupos: intracelulares, integrantes da parede celular e extracelulares (ou cápsula mucilagínosa fracamente ligada a célula, segundo sua localização morfológica). A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos das concentrações de carboidratos nas frações (capsular, parede celular e carboidrato total na biomassa) de *Aphanothece microscopica* Nägeli nas fases de crescimento lag, exponencial, estacionária e morte celular.

Tabela 3. Frações de carboidratos (capsulares, parede celular e carboidrato total) nas fases de crescimento celular de *Aphanothece microscopica* Nägeli

Fases de crescimento	*Frações		
	Capsular	Parede Celular	Total
Lag	7,0 ^{aA} ±0,5	3,5 ^{cB} ±0,25	10,5 ^{aC} ±0,35
Log	12,0 ^{cA} ±4,7	9,0 ^{aB} ±2,5	21,5 ^{bC} ±5,8
Estacionária	24,8 ^{bA} ±0,7	8,8 ^{bB} ±0,8	33,5 ^{cC} ±0,4
Morte	12,84 ^{cA} ±1,2	5,2 ^{cB} ±3,3	18,4 ^{dC} ±1,8

*Frações de carboidratos: capsular, parede celular e carboidrato total (mg. L⁻¹); ± desvio padrão; *Letras minúsculas (na vertical) e maiúsculas (na horizontal) indicam diferentes significativa ($p \leq 0,05$) entre as concentrações de carboidratos nas fases de crescimento.

Na Tabela 3 fica demonstrado valores de até 33,5 % de carboidratos, este valor pode ser comparado ao registrado por Becker & Baddiley (2004) que encontrou para as microalgas *Anabaena cylindrica* e *Porophyridium cruentum*, concentrações de carboidratos na ordem de (25 - 30 %) e (40 – 57 %), respectivamente.

Os carboidratos extracelulares (capsulares) caracterizam-se como metabólitos secundários, sendo produzidos, predominantemente, na fase de crescimento estacionária do micro-organismo (DOUMIT & PINOTTI, 2004). Os dados apresentados na Tabela 3 estão de acordo com a literatura, uma vez que, que a maior produção (24,8 mg. L⁻¹) deste constituinte é registrada na fase estacionária de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli diferindo ao nível de confiança de 95 % da concentração destes biocompostos durante as fases de crescimento celular, adaptação (7 mg. L⁻¹); logarítmica (12 mg. L⁻¹) e fase de morte perfazendo aproximadamente 12 mg. L⁻¹. A maior parcela de carboidratos totais na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli perfazem os carboidratos da mucilagem (capsulares), independente das fases de crescimento, sendo diretamente proporcional com a concentração de carboidratos totais, perfazendo até 24,8 % na fase estacionária (Tabela 3). A parede celular das cianobactéria compreende cerca de 5 a 6 % de sua constituição total composta na sua maioria por pectinas, hemicelulose e polissacarídeos (RAVEN et al., 1992, BOROWITZKA et al., 1994; BOROWITZKA et al., 1999). Na Tabela 3 constata-se que 3 a 12 % perfazem do total de carboidratos na biomassa a parede celular de *Aphanothece*, quando cultivada no efluente de laticínios sob as razões C/N, N/P ajustadas.

Os resultados apresentados na Tabela 3 também podem ser corroborados pelos obtidos por Melo et al. (2008) que analisaram a produção de carboidratos extracelulares na mucilagem de duas cianobactérias em meio padrão. A análise demonstrou que A.

halophytica apresenta o dobro de produção de carboidrato, quando comparado com *C. minutus*. O pico de produção de *A. halophytica* e *C. minutus* ocorrem ambos em 72 h com um valor de 2,3 g.L⁻¹ e 1,3 g.L⁻¹, respectivamente. Entretanto, na fase de desaceleração do crescimento os polissacarídeos foram consumidos e reduzidos a valores de 0,7 g.L⁻¹ para *A. halophytica* e 0,6 g.L⁻¹ para *C. minutus*. A concentração de carboidratos extracelulares produzidos por *Aphanothece microscopica* Nägeli em 16 h de cultivo foi de 0,024 g.L⁻¹ com produtividade na fase estacionária de crescimento de 6 mg.L⁻¹.h⁻¹. A diferença nas concentrações destes biocompostos, pode ser atribuída a espécie e ao meio de cultivo. Nicolaus et al. (1999) descreveram a influência de alguns fatores físicos e nutricionais sobre a produção de exopolissacarídeos de cianobactérias. *Phormidium* sp. apresentou maior produção de exopolissacarídeos em condição de crescimento padrão (meio de cultura BG-11, aeração e iluminação contínua). A *Spirulina* sp. apresentou quantidade total de biossíntese de exopolissacarídeos em condição de crescimento padrão em relação ao aumento de nitrogênio de 4 g.L⁻¹ e também em relação ao aumento de fosfato. A ausência de NaCl e aumento da temperatura causou uma pequena redução na produção de exopolissacarídeos. A síntese de exopolissacarídeos foi maior através da limitação de nitrogênio e, menor, pela limitação de fósforo. Moreno et al. (1998) estudaram a produção de carboidratos extracelulares pela cianobactéria *Anabaena*, constatando que a falta de nitrogênio no meio de cultivo leva a uma maior produção de carboidratos extracelulares sem afetar o crescimento celular, e que as maiores produções foram na fase estacionária de crescimento celular.

Ainda se observa que grande parte do carboidrato total de *Aphanothece* perfazem a cápsula mucilaginosa, conforme se observa na Figura 9, constituindo cerca de 66 %, 56 %, 74 % e 69 % nas fases lag, logarítmica, estacionária e morte, respectivamente. Com relação aos carboidratos da parede celular, estes constituem cerca de 33 %, 42 %, 26 % e 28 % nas fases lag, logarítmica, estacionária e morte, respectivamente, dos carboidratos totais (Figura 9).

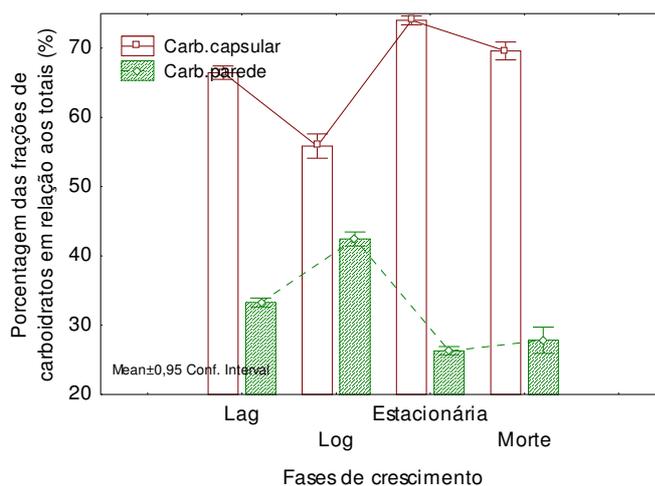


Figura 9. Porcentagem das frações de carboidratos em relação ao carboidrato total (33,5 %) nas fases de crescimento de *Aphanothece microscopica* Nægeli

Na Figura 9 observa-se que a maior parte dos carboidratos presentes na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nægeli está na massa mucilaginosa (carboidratos extracelulares) representando do total cerca de 60 % em todas as fases de crescimento. São registradas diferenças ($p \leq 0,05$) entre as porcentagens de carboidratos extracelulares (massa mucilaginosa), em relação ao total, nas fases de crescimento (Tabela 4) bem como das médias das porcentagens de carboidratos da parede celular que perfazem do total (Tabela 5).

Tabela 4. Teste de Tukey para a avaliação das diferenças de média das quantidades de carboidratos da massa mucilaginosa em relação ao carboidrato total

Fases de crescimento	Lag	Log	Estacionária	Morte
	*66,45	56,87	74,03	69,60
Lag		0,000231	0,000231	0,000444
Log	0,000231		0,000231	0,000231
Estacionária	0,000231	0,000231		0,000237
Morte	0,000444	0,000231	0,000237	

Fases de crescimento, Lag: Fase Lag ou de adaptação; Log: logarítmica ou fase exponencial; Morte: fase de declínio ou morte celular. *valores médios da quantidade de carboidrato da mucilagem perfazem o carboidrato total (%); $p \leq 0,05$: apresenta diferença significativa na concentração de carboidratos entre as fases de crescimento.

Tabela 5. Teste de Tukey para a avaliação das diferenças de média das quantidades de carboidratos da parede celular em relação ao carboidrato total

Fases de crescimento	Lag	Log	Estacionária	Morte
	*33,27	42,43	26,28	27,80
Lag		0,000231	0,000231	0,000231
Log	0,000231		0,000231	0,000231
Estacionária	0,000231	0,000231		0,015793
Morte	0,000231	0,000231	0,015793	

Fases de crescimento, Lag: Fase Lag ou de adaptação; Log: logarítmica ou fase exponencial; Morte: fase de declínio ou morte celular. *valores médios da quantidade de carboidrato da parede celular que perfazem o carboidrato total (%). $p \leq 0,05$: apresenta diferença significativa na concentração de carboidratos entre as fases de crescimento.

Vários autores relatam que a composição química de microalgas, depende naturalmente de uma série de fatores que incluem o estágio da divisão celular, o ciclo de crescimento e a composição de micro e macro nutrientes (LOURENCO et al., 1997; FIDALGO et al., 1998; BENNING et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008; HORNES et al., 2010).

Considerando a variação dos teores de carboidratos com a temperatura e quantidade de nitrogênio disponível, a associação deste fator à fonte de nitrogenados disponível pode resultar em importante critério a ser utilizado para a produção de compostos de interesse. Santos et al. (2003) salientam a importância destes fatores no cultivo de *Spirulina máxima*. Os autores reportam aumento de 39 % na concentração de carboidratos quando utilizam meio de cultivo contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de KNO_3 , variando a temperatura de 35°C para 25°C .

Os resultados do presente trabalho, em relação a concentração de carboidratos totais (33,5 %) também corroboram com os apresentados por Fuentes et al. (2000) encontraram concentrações de carboidratos na biomassa da microalga *Porphyridium cruentum* de 22,8 a 49,3 %, verificando que as maiores concentrações ocorreram com tempos de residência maiores, no entanto, essas concentrações foram maiores do que as determinadas em *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Isochrysis galbana*, as quais apresentaram valores médios de 15,36, 8,08 e 16,98 %, respectivamente (TOKUSOGLU & ÜNAL, 2003). Por outro lado em meio com alta concentração de nitrogênio dissolvido há o favorecimento à síntese e ao acúmulo de proteína. Este fato pode ter contribuído para o elevado teor de carboidratos na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli, uma vez que, o efluente de laticínio na sua composição média apresenta uma

concentração de nitrogênio relativamente mais baixa em torno de 42 mg. L⁻¹ (Figura 3) quando comparado ao efluente, por exemplo, da parboilização do arroz (70 mg.L⁻¹) e pescado (100 mg/L) (QUEIROZ et al., 2007; HORNES et al., 2010). Alguns exemplos de trabalhos podem ser citados nos quais os autores estudaram a composição química de *Aphanothece*. Queiroz et al. (2004) avaliaram a conversão dos nutrientes presentes no efluente da parboilização do arroz em componentes bioquímicos como proteínas, carboidratos e lipídeos. Os experimentos foram realizados em um reator biológico de mistura perfeita, a 30°C, ausência de luminosidade e tempo de detenção hidráulica de 72 h. O perfil bioquímico da biomassa na fase exponencial de cultivo apresentou 43,73 % de proteína, 17,81 % de carboidratos, 8,0 % de lipídeos. Queiroz et al. (2007) estudaram a composição de *Aphanothece* quando esta foi cultivada no efluente da parboilização do arroz no qual os resultados indicaram a biomassa gerada na fase exponencial como importante fonte de carboidrato (18,62 %), proteína (50,46 %), lipídios (7,49 %). Hornes et al. (2010) verificaram que o meio de cultivo influencia a composição da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli. No presente trabalho as concentrações de carboidratos na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli foi substancialmente superior aos relatados por estes autores, aproximadamente 25 % maior, indicando que a manipulação do meio de cultivo e fase de crescimento apresentam diferença na composição de *Aphanothece*, visto pelos dados apresentados na Tabela 3, uma vez que, a biomassa caracterizada se encontrava na fase estacionária de crescimento, o que pode ter contribuído para diferença na concentração de carboidratos e nitrogênio do efluente de laticínios. De um modo geral, o comportamento fisiológico da cianobactéria em estudo sob baixas concentrações de nitrogênio e aumento da concentração de carbono no meio, faz com que haja acúmulo de produtos não nitrogenados, tais como carboidratos.

Borowitzka et al. (1994) descreveu para cianobactéria *Dunaliella* entre 30 a 40 % de carboidratos compondo sua composição bioquímica. Carboidratos estes constituídos por mono e dissacarídeos, galactose, glicose, manose, xilose, ribose e polissacarídeos, especialmente α 1,4-glucose. Este mesmo autor relata ainda que condições de nitrogênio limitante no meio de cultivo na composição desta cianobactéria se reflete um incremento do conteúdo de carboidrato proporcional ao aumento da fração lipídica. Resultados semelhantes foram obtidos conforme Tabela 3, estes resultados corroboram com os encontrados por Marson-Ascêncio et al. (2012) que encontraram concentrações de carboidratos totais de 45 % para microalga *Coscinodiscus wailessi*.

A maior parte dos carboidratos em cianobactérias possuem um ou dois tipos de pentoses, açúcares que normalmente estão ausentes em outros polissacarídeos de procariontes. A maioria dos carboidratos de cianobactérias é relativamente complexa, sendo esses compostos de seis ou mais tipos de monossacarídeos, uma característica que também não é apresentada por outros micro-organismos ou macroalgas (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998).

Geralmente a glicose estava presente em maior quantidade em espécies examinadas, com exceção de algumas espécies que apresentaram manose e xilose em maior quantidade. De uma maneira geral estes micro-organismos apresentam na sua constituição xilose, manose, glicose, e arabinose sendo extremamente variáveis na sua composição monossacarídica (RAVEN et al., 1992, BOROWITZKA et al., 1994; GAROZZO et al., 1998; DOUMIT & PONOTTI, 2004; SHENG et al., 2006; MARSON-ASCÊNCIO et al., 2012).

De Philippis & Vincenzini (2006) relataram que, mais de 70 cepas haviam sido estudadas com relação à produção de carboidratos sendo a maior parte dos estudos referentes à determinação da composição em açúcares. Na Tabela 6 está expressa as concentrações dos tipos de carboidratos encontrados na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli.

Tabela 6. Identificação de carboidratos na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente de laticínios (A) e meio BG-11 (B)

Carboidratos	Meio	
	A	B
Rafinose	3,54	*ND
Frutose	2,13	1,26
Ribose	2,45	*ND
Sacarose	3,43	1,70
Glicose	12,88	5,0
Manose	*ND	1,40
Arabinose	*ND	*ND
Lactose	*ND	*ND
Galactose	*ND	*ND
Manitol	*ND	*ND
Xilose	*ND	*ND
Arabitol	*ND	*ND
Sorbitol	*ND	*ND
Inositol	*ND	*ND
Xilitol	*ND	*ND
Lactitol	*ND	*ND
Adonitol	*ND	*ND
Maltitol	*ND	*ND

*ND: não detectado; unidade: g/100g; A: biomassa cultivada no efluente de laticínios; B: biomassa cultivada no meio BG-11.

A Figura 10 apresenta a porcentagem dos tipos de carboidratos em relação aos totais, em que pode-se constatar que glicose perfaz em torno de 26 % dos carboidratos totais na biomassa, seguido da rafinose (7 %), ribose (7,4 %), sacarose (5 %) e frutose (4 %).

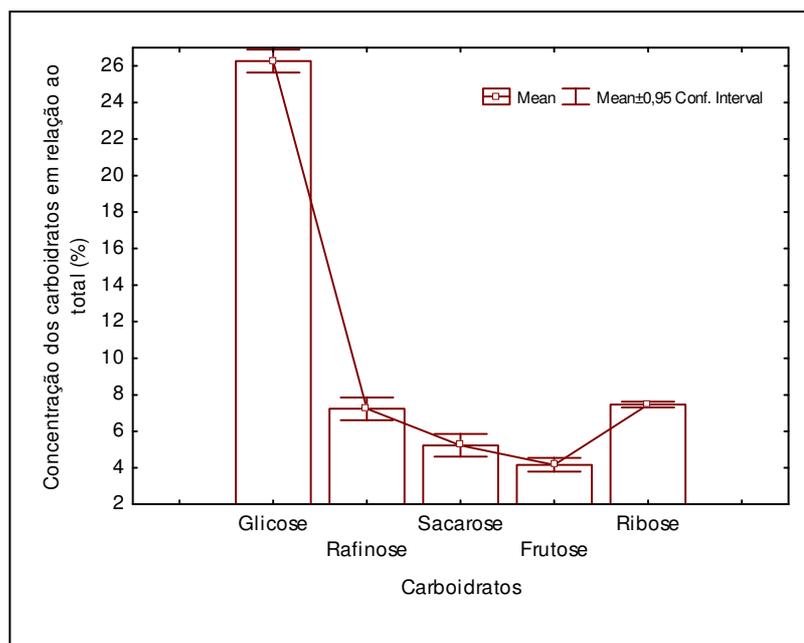


Figura 10. Concentração dos carboidratos encontrados em relação aos totais (33,5 %).

Glicose, geralmente é a principal unidade monossacarídica encontrada, enquanto ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose e manose são detectadas em variadas proporções (PAINTER, 1983; BROWN, 1991; BROWN et al., 1997). Porém, a composição do carboidrato, especialmente seu conteúdo de glicose, pode variar de acordo com fatores ambientais (RIJSSEL et al., 2000).

Na Tabela 6 esta constatação pode ser verificada, que, independente do meio de cultivo (efluente ou meio BG-11), a glicose foi o monossacarídeo de maior concentração na constituição dos carboidratos encontrados em *Aphanothece microscopica* Nägeli, perfazendo concentrações na ordem de 12 % e 5 %, respectivamente. Este fato certamente é porque as células a usam como fonte de energia e intermediário metabólico, sendo a glicose um dos principais produtos da fotossíntese, metabolismo preferencial destes micro-organismos (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000) e inicia a respiração celular em procariontes. Observa-se ainda na Tabela 6 que os carboidratos que caracterizam esta fração da biomassa são expressos principalmente por glicose (12,88 %), rafinose (3,54 %), sacarose (3,43 %), ribose (2,45 %) e frutose (2,13 %), que juntos compreenderam cerca de 70 % da concentração de carboidratos totais na biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli quando esta foi cultivada no efluente de laticínios. Quando cultivada em meio BG-11 sua composição apresentou frutose (1,26 %), sacarose (1,70 %), glicose (5,0 %) e manose (1,40 %). Segundo Hoagland et al. (1993) e De Philippis & Vicenzini (1998) a glicose é o açúcar mais comuns em na constituição dos

carboidratos em cianofíceas e diatomáceas. Neste estudo foi a classe mais representativa quantitativamente. Os estudos realizados por Giroldo et al. (2003), Gouvêa et al. (2005) e Giroldo & Vieira (2005), também mostraram que este monossacarídeo foi mais comum em monoculturas de diatomáceas e criptofíceas.

A diferença no perfil de carboidratos encontrados quando *Aphanothece* foi cultivada no efluente de laticínios e meio BG-11 (Tabela 6), pode ser atribuído as diferenças na composição do meio de cultivo. Verifica-se que o efluente de laticínios apresenta em sua composição aproximadamente 600 mg. L⁻¹ de carboidratos totais (Figura 1) favorecendo a síntese e acumulação de carboidratos pela cianobactéria estudada. Neste contexto, ressalta-se a presença de diferentes carboidratos nos meios de cultivos estudados, como no caso da rafinose e ribose, quando *Aphanothece* foi cultivada no efluente, perfazendo concentrações na ordem de 3,45 % e 2,45 %, respectivamente. Os resultados apresentados na Tabela 6, demonstram que tanto o meio de cultivo, concentração de constituintes no meio bem como o tipo de cultivo influenciam tanto na concentração como na composição de carboidratos produzidos por *Aphanothece microscopica* Nägeli, nas condições experimentais estudadas. A literatura relata que a produção, estrutura e quantidade produzida, podem variar de uma espécie para outra, ou mesmo dentro de uma mesma espécie, dependendo das condições ambientais (DE PHILIPPIS & VICENZINI, 1998; MORENO et al., 1998; KAWAI et al., 2006; PARIKH & MADAMWAR, 2006; QUEIROZ et al., 2007; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Parikh & Madamwar (2006), trabalhando, com 4 diferentes espécies de cianobactérias, observaram que todas as culturas apresentaram habilidade de produzir carboidratos, a base de ribose, xilose, glicose e manose.

Rafinose (3,54 %) e sacarose (3,43 %) foram os seguintes de maiores concentrações (Tabela 6). Atenção especial deve se dar ao carboidrato encontrado, rafinose, uma vez que, que este é quase ubíquo no reino vegetal, sendo encontrado em uma grande variedade de sementes de muitas famílias diferentes, e eles ocupam o segundo lugar apenas a sacarose, em abundância, como carboidratos solúveis. Rafinose é a fonte de uma excelente nutrição e fator de geração de *Bacillus bifidus* e outras bactérias benéficas. Pode melhorar a digestão e defecação e promover a absorção de cálcio do corpo. Assim reforçar a imunidade humana, produz efeitos a doença e as precauções anti-envelhecimento. Este fato é de suma importância, uma vez que, expressa a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli como fonte em potencial deste trissacarídeo.

A sacarose, terceira classe de açúcar de maior representação quantitativamente neste estudo, é o açúcar muito encontrada em plantas, mas em especial extraído da cana-de-açúcar e da beterraba, sendo um dos principais constituintes da dieta. Este fato pode tornar a biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli fonte em potencial de sacarose, em que nas condições experimentais foram obtidas concentrações de até 3,43 %.

Segundo Richmond (1990) e Spolaore et al. (2006), a produção microalgal, e seus biocompostos extraídos de sua biomassa podem ser justificados por apresentar diversas vantagens, dentre as quais podem ser destacadas: o cultivo de microalgas / cianobactérias é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, sendo que, muitas espécies crescem mais rapidamente do que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores rendimentos anuais de biomassa bem como de seus constituintes, tais como os carboidratos (maior produtividade); sua natureza unicelular assegura uma biomassa com mesma composição bioquímica, o que não ocorre com as plantas terrestres que apresentam compostos localizados em partes específicas: nos frutos, folhas, sementes ou raízes; por manipulação das condições ambientais de cultivo (luz, temperatura e nutrientes, por exemplo) muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de constituintes celulares. Tais compostos apresentam elevado valor comercial, principalmente por serem produtos naturais. Dentro deste contexto a frutose açúcar de menor concentração detectado, é um tipo de carboidrato que as indústrias alimentícias vêm utilizando com a função de aumentar a palatabilidade dos alimentos, assim como pode ser observado na constituição dos carboidratos de *Aphanothece* apresenta cerca de 2 % deste açúcar, o que evidencia seu potencial como fonte de carboidratos.

4 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais, foi possível concluir que as maiores concentrações de carboidratos produzidas por *Aphanothece microscopica* Nägeli, são expressos pelas concentrações 33,5 %, 24,8 % e 8,8 %, em carboidrato total, capsular e da parede celular;

A fração de carboidratos da biomassa gerada é constituída, basicamente por glicose, sacarose, rafinose, ribose e frutose, tendo como açúcar majoritário a glicose;

Tomando como base, uma produção de efluente 950.000 L.ano⁻¹, pode ser estimada uma produção anual de 460 t.ano⁻¹ de carboidratos totais, dos quais 74 % correspondem aos carboidratos extracelulares e 27 % da parede celular.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, P. S. A. **Efeito de alguns nutrientes na formação da goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LMI-3.** Tese de Mestrado, Rio de Janeiro, Instituto de Química, UFRJ, 1991.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington, 2005.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459 - 479, 2000.

BASTOS, R. G.; QUEIROZ, M. I. ALMEIDA; T. L.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. V.; PADILHA, M. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 112 - 116, 2004.

BECKER, EW; BADDILEY, J. **Oil Production in Microalgae:** Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press; 1994.

BENNING, L. G.; PHOENIX, V. R.; YEE, N.; TOBIN, M. J. Molecular characterization of cyanobacterial silicification using synchrotron infrared micro-spectroscopy. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 68, p. 729 - 741, 2004.

BERTOCCHI, C.; NARARINI, I.; CESARO, A. Polysaccharides from cyanobacteria (review paper). **Carbohydrate polymers**, v. 12, p. 127 - 153, 1990.

BOROWITZKA, M. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. **Micro-algal Biotechnology.** 2. ed. Sydney: p. 477, 1994.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313 – 321, 1999.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 145, p. 79 - 99, 1991.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151 p. 315-331, 1997.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 151 - 175, 1998.

DOUMIT, C. N.; PINOTTI; M. H. Exopolissacarídeos de Cianobactérias. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 43 - 52, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 352-356, 1956.

FIDALGO, J. P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, v. 166, p. 105 - 116, 1998.

FUENTES, M. M. R.; FERNÁNDEZ, G. G. A.; PÉREZ, J. A. S.; GUERRERO, J. L. G. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, v. 70, p. 345 - 353, 2000.

GAROZZO, D.; IMPALLOMENI, G.; SPINA, E. The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*. **Carbohydrate Research**, v. 307, p. 113 - 124, 1998.

GIROLDO, D. & VIEIRA, A. A. H. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. **Journal Plankton Research**, v. 27, p. 695 - 705, 2005.

GIROLDO, D., VIEIRA, A. A. H., PAULSEN, B. S. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp (Bacillariophyceae). **Journal Phycology**, v. 39, p. 1109 - 1115, 2003.

GOUVÊA, S. P., VIEIRA, A. A. H., LOMBARDI, A. T. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials and of water from a eutrophic reservoir. **Chemosphere**, v. 60, p. 1332 - 1339, 2005.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Anaerobic hidrólisis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. **Water Research**, v. 33, p. 3281 - 3290, 1999.

HESS, D. S.; SILVA, L. A.; FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M. **Avaliação da produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 cultivado em meio contendo lipídeos**. Departamento de Farmácia – Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, 2006.

HOAGLAND, K. D., ROSOWSKI, J. R., GRETZ, R., ROEMER, S. C. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. **Journal Phycology**, v. 29, p. 537 - 566, 1993.

HORNES, M.; QUEIROZ, M.I. **Evaluation of the growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in effluent of fishing industry**. In: CHISA – 16th International Congress of Chemical and Process Engineering. Prague, 2004.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 894 - 900, 2010.

KAWAI, L. A.; PINOTTI, M. H. P.; CELLIGOI, M. A. P. C. Exopolysaccharide production by the cyanobacteria *Nostoc sp* in different concentrations of nitrogen and glucose. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, p. 33 - 39, 2006.

LAI, J.; YU, Z.; SONG, X.; CAO, X.; HAN, X. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 405, p. 6 – 17, 2011.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher, p. 34 - 120, 2000.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043 – 1049, 2009.

LIN, E. S.; CHEN, Y. H. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2511 – 2517, 2007.

LOURENÇO, S. O.; MÁRQUEZ, U.; FILHO, J. M.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. Changes in Biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Composition of two culture media. **Aquaculture**, v. 148, p. 153 - 168, 1997.

MAGER, D. M.; THOMAS, A. D. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: A review of their role in dryland soil processes. **Journal of Arid Environments**, v. 75, p. 91 - 97, 2011.

MARSON-ASCÊNCIO, P. G.; ASCÊNCIO, S. D.; BAGGIO, F. S. Z. Isolamento e análise química parcial de exopolissacarídeos da diatomácea marinha cultivada *Coscinodiscus wailesii* (Coscinodiscales, Bacillariophyta). **Química Nova**, v. 15, p. 1 - 7, 2012.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; LÚCIA, V.; BONONI, R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Reviews Microbiology**, v. 30, p. 77 - 84, 1999.

MELO, R. S. **Avaliação da Utilização de Exopolissacarídeos de Cianobactérias como Fonte de Inibidores na Formação do Biofilme Bacteriano**. Dissertação (Mestre em Ciências – Bioquímica) - Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

MOPPER, K., SCHULTZ, C. A., CHEVOLOT, L., REVUELTA, R., DAWSON, R. Determination of sugar in unconcentrated seawater and other waters by liquid

chromatography pulse amperometric detection. **Environmental Science Technology**, v. 26, p. 133 - 138, 1992.

MORENO, J. VARGAS, M. A.; OLIVARES, H.; RIVAS, J.; GUERREIRO, M. G. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 175 - 182, 1998.

MYERS, R. H. MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, 2 nd ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.

NAMBOODIRI, A. M. A.; PEETHAMBARAN, A.; MATHEW, R.; SAMBHU, P. A.; HERSHFIELD, J.; MOFFERTT, J. R.; MADHAVARAO, C. N. Canavan disease and the role of N-acetylaspartate in myelin synthesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, p. 216 - 223, 2006.

NICOLAUS, B.; PANICO, A.; LAMA, L.; ROMANO, I.; MANCA, M.C.; GIULIO, A.; GAMBACORTA, A. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. **Phytochemistry**, v. 52, p. 639 - 647, 1999.

O`GRADY, J.; MOR GAN, J.A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 121–125, 2011.

OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* z for efficient production of α -tocopherol. **Journal Applied Phycology**, v. 10, p.67-74, 1998.

PACE, G. W.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 15, p. 41 - 70, 1980.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: Aspinall, G.O. (Ed.). **The polysaccharides**, v. 2, p. 195 - 285, 1983.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D.; Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1822 - 1827, 2006.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, E. Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11 - 36, 2011.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in food Science & Technology**, v. 19. p. 31 – 39, 2008.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in batch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 130-141, 2004.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; ROSA, L. S.; GOLDBECK, R. Nutricional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Microbiological Research**, v. 101, p. 7107 - 7111, 2006.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; GOLDBECK, R. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying condition. **Chemical Engineering and Processing**, v. 50, p. 1 - 6, 2007.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438 – 3443, 2011.

RAMOS, M. V.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T. B.; DEBRAY, H. Characterization of the Sugar-Binding Specificity of the Toxic Lectins Isolated from *Abrus pulchellus* Seeds. **lycoconjugate Journal**, v. 18, p. 391 - 400, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 728, 1992.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Florida: CRC Press: p. 528, 1990.

RIJSSEL, M. V.; JANSEB, I.; NOORDKAMPB, D. J. B.; GIESKESA, W. W. C. An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. **Journal of Sea Research**, v. 43, p. 297 – 306, 2000.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, p. 01 - 61, 1979.

SANTOS, G. M. S.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 17 - 21, 2003.

SHENG, G. P. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 882-894, 2010.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Stability of sludge flocs under shear conditions: roles of extracellular polymeric substances (EPS). **Biotechnology Bioengineering**, v. 93, p. 1095 - 1102, 2006.

SMITH, A. R. W.; MUNRO, S. M.; WAIT, R.; HIGNETT, R. C. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plasmid isolated of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. **Microbiology**, v. 140, p. 1585 - 1593, 1994.

STACEY, F. R. S.; BARKER, S. A. **Polysaccharides of micro-organisms**, p. 75 - 113, Oxford Press, 1960.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41 - 46, 1998.

TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1144-1148, 2003.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494 – 5500, 2010.

XU, H., MIAO, X. & WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499 - 507, 2006.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light- autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 87 – 102, 2000.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, p. 368 - 371, 2007.

ZEPKA, L. Q. ; JACOB-LOPES, E. ; GOLDBECK, R. ; QUEIROZ, M. I. . Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1305 - 1310, 2008.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUSA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7118-7122, 2010.

CAPÍTULO 4
CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

A análise dos resultados demonstrou o potencial *Aphanothece microscopica* Nägeli na produção de carboidratos extracelulares, ficando evidenciado que o efluente de laticínio é um importante meio de cultura a ser utilizado na produção de carboidratos e que a manipulação deste meio de cultivo, quanto as razões C/N e N/P, resulta em importante aumento na produtividade destes compostos, devendo esta atividade ser explorada biotecnologicamente. Assim, ficou demonstrado, que o sistema proposto que associa o tratamento do efluente da indústria de laticínios por *Aphanothece microscopica* Nägeli, com a coagulação da biomassa gerada mediante o uso do tanino, seguido de microfiltração, pode resultar em uma biomassa rica em carboidratos extracelulares e permitir a possibilidade do reúso da água residuária obtida pós tratamento.

CAPÍTULO 5
REFERÊNCIAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDEL-RAOUF N.; AL-HOMAIDAN A. A.; IBRAHEEM I. B. M. Agricultural importance of algae. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 11648 - 11658, 2012.

ABDESSEMED, D.; NEZZAL, G. Tertiary treatment of a secondary effluent by the coupling of coagulation-adsorption-ultrafiltration for reuse. **Desalination**, v. 175, p. 135 - 141, 2005

AGUILAR, M.I.; SÁEZ, J.; LLORÉS, M.; SOLER, A.; Ortuño, J.F. Nutrient removal and sludge production in the coagulation – flocculation process. **Water Research**, v. 36, p. 2910 - 2919, 2002.

ALLÈGRE, C.; MOULIN, P.; MAISSEU, M. Treatment and reuse of reactive dyeing effluents. **Journal of Membrane Science**, Paper in Press, 2005.

AL-MALACK, M.H.; ABUZOID, N.S.; EL-MUBARAK, A.H. Coagulation of polymeric wastewater discharged by a chemical factory. **Water Research**, v. 33, p. 521 - 529, 2007.

AL-MUTAIRI, N. Z.; HAMODA, M.F.; AL-GHUSAIN, I. Coagulant selection and sludge conditioning in a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 115 - 119, 2004.

ALVES, P. S. A. **Efeito de alguns nutrientes na formação da goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LMI-3**. Tese de Mestrado, Rio de Janeiro, Instituto de Química, UFRJ, 1991.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 2005.

AMUDA, O.S.; AMOO, I.A. Coagulation/flocculation process and sludge conditioning in beverage industrial wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, p. 778 - 783, 2007.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern Approach to the classification system of cyanophytes 3 – Oscillatoriales. **Archiv für Hydrobiologie Algological Studies**, v. 80, p. 327 - 472, 1988.

ANIRUDHAN, T. S.; SUCHITHRA, P. S. Synthesis and characterization of tannin-immobilized hydrotalcite as a potential adsorbent of heavy metal ions in effluent treatments. **Applied Clay Science**, v. 42, p. 214 – 223, 2008.

ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459 - 479, 2000.

ARAÚJO, S.C.; GARCIA, V.M.T. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, v. 246, p. 405 - 412, 2005.

ARDELEAN, I.; ZARNEA, G. **Photosynthesis respiration interplay in cianobactéria: Fundamentals and Application**. In: Subramanian, G.; Kaushik, B.D.; Venkataraman, G.S. *Cyanobacterial Biotechnology*. Science Publishers, Inc., USA. p. 103 - 107, 1998.

ARORA, A.; SETH, A.; DIEN, B.S.; BELYEA, R.L.; SINGH, V.; TUMBLESÓN, M.E.; RAUSCH, K.D. Microfiltration of thin stillage: Process simulation and economic analyses. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 113 - 120, 2011.

ARVANITOYANNIS, I.S.; KASSAVETI, A. Dairy Waste Management: Treatment Methods and Potential Uses of Treated Waste. **Waste Management for the Food Industries**, p. 801 - 860, 2008.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 64 - 70, 2006.

BABU, G. S.; HANS, R. K.; SINGH, J.; VISWANATHAN, P. N.; JOSHI, P. C. Effect of lindane on the growth and metabolic activities of cyanobacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 219 - 221, 2001.

BALLANEC, B.; GÉSAN-GUIZIOU, G.; CHAUFER, B.; RABILLER-BAUDRY, M.; DAUFIN, G. Treatment of dairy process waters by membrane operation for water reuse and milk constituents concentration. **Desalination**, v. 147, p. 89 - 94, 2002.

BANU, R.; ANANDAN, S.; KALIAPPAN, S.; YEOM, I.-T. Treatment of dairy wastewater using anaerobic and solar photocatalytic methods. **Solar Energy**, v. 82, p. 812 - 819, 2008.

BARBOSA, M. J., HOOGAKKER, J., WIJFFELS, R. H. Optimization of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 115 - 123, 2003.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: Anatomy. **Biochemistry and Bioengineering**, p. 1 - 34, 2006.

BASHAN, L. E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J.-P., BASHAN, Y. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**, v. 36, p. 2941 - 2948, 2002.

BASTOS, G. B.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista**

Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science, v. 5, p. 258 - 264, 2010.

BASTOS, R. G. **Remoção de matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli**. In: BASTOS, R. G. Aplicação da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no tratamento de efluentes e na produção de proteína unicelular. Rio Grande, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

BASTOS, R. G.; PAIVA, P. R.; RIGO, M.; VEIGA, G.; QUEIROZ, M. I. Cultivo de *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de açúcares. **Bioscience Journal**, v. 27, p. 156 - 161, 2011.

BASTOS, R. G.; QUEIROZ, M. I. ALMEIDA; T. L.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. V.; PADILHA, M. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 112 - 116, 2004.

BASTOS, R.; QUEIROZ, M. I. ; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. COD removal of parboilized rice wastewater by cyanobacteria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 3, p. 245 - 250, 2009.

BECKER, EW; BADDILEY, J. **Oil Production in Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. Cambridge University Press; 1994.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN , J.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.C. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 1019 – 1025, 2010.

BENNING, L. G.; PHOENIX, V. R.; YEE, N.; TOBIN, M. J. Molecular characterization of cyanobacterial silicification using synchrotron infrared micro-spectroscopy. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 68, p. 729 - 741, 2004.

BENSADOK, K.; BELKACEM, M.; NEZZAL, G. Treatment of cutting oil/water emulsion by coupling coagulation and dissolved air flotation. **Desalination**, v. 206, p. 440 - 448, 2007.

BERARDINO, S. Di; COSTA, S.; CONVERTI, A. Semi-continuous anaerobic digestion of a food industry wastewater in an anaerobic filter. **Bioresource Technology**. v. 71, p. 261 - 266, 2000.

BERTOCCHI, C., I. NARARINI, A. CESARO. Polysaccharides from cyanobacteria (review paper). **Carbohydrate polymers**, v. 12, p. 127 - 153, 1990.

BES-PIÁ, A.; MENDOZA-ROCA, J.A.; ALCAINA-MIRANDA, M.I.; IBORRA-CLAR, A.; IBORRA-CLAR, M.I. Combination of Physico-Chemical Treatment and Nanofiltration to Reuse Wastewater of a Printing, Dyeing and Finishing Textile Industry. **Desalination**, v. 157, p. 73 - 80, 2003.

BILANOVIC, D.; SHELEF, G. Flocculation of microalgae with cationic polymers- Effects of médium salinity. **Biomass**, v. 17, p. 65 - 76, 1988.

BLIER, R.; LALIBERTÉ, G.; NÖUE, J. de la. Production of the cyanobacterium *Phormidium bohneri* in parallel with epuration of a dairy anaerobic effluent. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 587 - 593, 1996.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313 – 321, 1999.

BOROWITZKA, M. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. **Micro-algal Biotechnology**. 2. ed. Sydney: p. 477, 1994.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de 24 março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] União**, 24 mar.

BRASIL. Câmara dos Deputados. Lei nº 9433, de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. **Diário Oficial [da] União**, 8 jan.

BRIAO, V.B.; TAVARES, C.R.G. Ultrafiltração como processo de tratamento para o reúso de efluentes de laticínios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 134 - 138, 2007.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 145, p. 79 - 99, 1991.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151 p. 315-331, 1997.

BRUM, L.F.W.; SANTOS JÚNIOR, L.C.O.; BENEDETTI, S. **Reaproveitamento de Água de Processo e Resíduos da Indústria de Laticínios**. 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production. Key Elements for a sustainable world: energy, water and climate change, São Paulo – Brasil, 2009.

BURJA, A. M.; et al. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. **Tetrahedron**. v. 57, p. 9347 - 9377, 2001.

CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; SÁNCHEZ, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. **Water Research**, v. 36, p. 2555 - 2560, 2002.

CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: Molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 282 - 291, 2000.

CASTAING, J.-B.; MASSÉ, A. PONTIÉ, M; SÉCHET, V.; HAURE, J.; JAOUEN, P. Investigating submerged ultrafiltration (UF) and microfiltration (MF) membranes for seawater pre-treatment dedicated to total removal of undesirable micro-algae. **Desalination**, v. 253, p. 71 – 77, 2010.

CHAE, S. R., HWANG, E. J., SHIN, H. S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 322 - 329, 2006

CHEN, G-Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 607 – 616, 2006.

CHEN, J.-J.; YEH, H.-H. The mechanisms of potassium permanganate on algae removal. **Water Research**, v. 39, p. 4420 – 4428, 2005.

CHEN, W.; LIU, J. The possibility and applicability of coagulation-MBR hybrid system in reclamation of dairy wastewater. **Desalination** , v. 285, p. 226 – 231, 2012.

CHI, Z.; SU, C.D.; LU, W.D. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanotheca* sp. 113. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1329 – 1332, 2007.

CHO, S.; LUONG, T. T.; LEE, D.; OH, Y.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8639–8645, 2011.

CHOJNAC KA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, p. 21 - 34, 2004.

CHOPIN, T.; GALLANT, T.; DAVISON, I. Phosphorus and nitrogen nutrition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta): Effects on total phosphorus and nitrogen content, carrageenan production and photosynthetic pigments. **Journal of Phycology**, v. 31, p. 283 - 293, 1995.

CHOPIN, T.; HANISAK, M.D.; KOEHN, F.E. Effects of seawater phosphorus concentration on floridean starch content in *Agardhiella subulata* (C: Agardh) Kraft et Wynne C(Rhodophyceae). **Botanica Marina**, v. 34, p. 369-373, 1991.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Journal Biotechnology Advances**, v. 29, p. 686 - 702, 2011.

COSTA, E. R. H. **Melhoria da qualidade da água tratada e aumento da capacidade de ETAS através da escolha adequada de coagulantes e auxiliares, em águas com alcalinidade alta.** In: Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23., 2009, Joinville. Joinville: ABES.

COSTA, J. A. V.; COZZA, KL, OLIVEIRA, L, MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 439 - 442, 2001.

CRAGGS, R. J.; McAULEY, P. J.; SMITH, V. J. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. **Water Research**, v. 31, p. 1701 -1707, 1997.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUÍ, C. O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. An investigation of the effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass Bioenergy**, v. 23, p. 261 - 269, 2002.

DAVID C.; ENRIQUE, M.; THAMAR, P.; CARIDAD, DE H.; LARS, W.; DANIEL, S.; SAMUEL C.; DELIA, M.; GEOFFREY A. C.; ANTONIO Q. Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in spanish reservoirs. **Journal of Phycology**, v. 43, p. 1120 – 1125, 2007.

DAVIDSON, I. W. Production of polysaccharide by *X. campestris* in continuous culture. **FEMS Microbiological Letters**, v. 3, p. 347 - 349, 1978.

DE GODOS, I.; GUZMAN, H. O.;SOTO, R.;GARCÍA-ENCINA, P. A., BECARES, E.;MUÑOZ, R.; VARGAS, V. A. Coagulation/flocculation-based removal of algal–bacterial biomass from piggery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 923 – 927, 2011.

DE PHILIPPIS, R., MARGHERI, M. C., PELOSI, E. VENTURA, S. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. **Journal Applied Phycology**, v. 5, p. 387 - 394, 1993.

DE PHILIPPIS, R., SILI, C., TASSINATO, G., VINCENZINI, M. AND MATERASSI, R. Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*. **Bioresource Technology**, v. 38, p. 101 - 104, 1991.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p.151 - 175, 1998.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611 - 1627, 2010.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T.T. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2583 – 2595, 2005.

DERNER, R. B.; OHSE, S. O.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959 - 1967, 2006.

DEVI, M.P.; SUBHASH, G.V.; MOHAN, S.V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and

starvation phases: Effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276 - 283, 2012.

DOLPHEN, R; THIRAVETYAN, P. Adsorption of melanoidins by chitin nanofibers. **Chemical Engineering Journal**, 166, 890 – 895, 2011.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951 – 962, 2012.

DOUMIT, C. N.; PINOTTI; M. H. Exopolissacarídeos de Cianobactérias. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 43 - 52, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 352-356, 1956.

DUEÑAS, M.; MUNDUATE, A.; PEREA, A.; IRASTORZA, A. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 113 – 120, 2003.

EBELING, J. M.; SIBRELL, P. L.; OGDEN, S. R.; SUMMERFELT, S. T. Evaluation of chemical coagulation-flocculation aids for the removal of suspended solids and phosphorus from intensive recirculating aquaculture effluent discharge. **Aquacultural Engineering**, v. 29, p. 23 - 42, 2003.

EL-BESTAWY, E.; HUSSEIN, H. Comparison between biological and chemical treatment of wastewater containing nitrogen and phosphorus. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 195 - 203, 2005.

EPA, **Guidelines for water reuse**, US Environmental Protection Agency Report, EPA/625/R-92/004, US Agency for International Development, Washington, DC, 1992.

ESQUIVEL, B.; VOLTOLINA, D.; SANDOVAL, F.C. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 369 - 373, 1993.

FARIZOGLU, B.; UZUNER, S. The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 57, p. 46 – 54, 2011.

FAY, P. **The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)**. First published in Great Britain. p. 01 - 88, 1983.

FIDALGO, J. P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes

and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, v. 166, p. 105 - 116, 1998.

FLORES, E.; HERRERO, A. **Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation**. In: BRYANT, D.A. *The molecular biology of cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 409 - 435, 1994.

FOGG, G. E. **Blue- green algae**. In: LASKIN, A. I.; LECHEVALIER, H. *A Handbook of Microbiology: Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses*, v. 2. Cleveland: CRC Press, p. 347 - 363, 1977.

FRANCISCO, E.C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 395 - 403, 2010.

FRAPPART, M.; AKOUM, DING, L. H.; O.; JAFFRIN, M. Y. Treatment of dairy process waters modelled by diluted milk using dynamic nanofiltration with a rotating disk module. **Journal of Membrane Science**, v. 282, p. 465 - 472, 2006.

FUENTES, M. M. R.; FERNÁNDEZ, G. G. A.; PÉREZ, J. A. S.; GUERRERO, J. L. G. Biomass nutrient profiles of the microalga. **Porphyridium cruentum**. **Food Chemistry**, v. 70, p. 345 - 353, 2000.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549 - 579, 2000.

GAROZZO, D.; IMPALLOMENI, G.; SPINA, E. The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*. **Carbohydrate Research**, v. 307, p. 113 - 124, 1998.

GARZA-SÁNCHEZ, F. J. A.; ZERTUCHE-GONZÁLES, CHAPMAN, D. J. Effect of temperature and irradiance on the release, attachment and survival of spores of *Gracilaria pacifica* Abbott (Rhodophyta). **Botanica Marina**, v. 40, p. 205 - 212, 2000.

GERESH, S.; MAMONTOV, A.; WEISTEIN, J. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalga: preparation, characterization and properties. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Amsterdam**, v. 50, p. 179 - 187, 2002.

GIROLDO, D. & VIEIRA, A. A. H. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. **Journal Plankton Research**, v. 27, p. 695 - 705, 2005.

GIROLDO, D., VIEIRA, A. A. H., PAULSEN, B. S. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp (Bacillariophyceae). **Journal Phycology**, v. 39, p. 1109 - 1115, 2003.

GONZÁLEZ, L. E.; CAÑIZARES, R. O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 60, p. 259 - 262, 1997.

GOUVÊA, S. P., VIEIRA, A. A. H., LOMBARDI, A. T. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials and of water from a eutrophic reservoir. **Chemosphere**, v. 60. p. 1332 - 1339, 2005.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F. G.; ROBLES, M. A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491 - 515, 2003.

GUERRA-VIEIRA, J.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, v. 00, p. 1 - 7, 2012.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; et al.. Anaerobic hidrolisis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. **Water Research**, v. 33, p. 3281 - 3290, 1999.

HAFTING, J. T. Effect of tissue nitrogen and phosphorus quota on growth of *Porphyra yezoensis* blades in suspension cultures. **Hydrobiologia**, v. 398/399, p. 305 - 314, 1999.

HALPERIN, DELLA R.; ZULPA DE CAIRE, G.; ZACCARO DE MULLE, M. C. Contenido Proteico de *Aphanothece stagnina* (Sprengel). A. Braun (Cyanophyta, Chorococcaceae). **Physis sección B**, v. 33, p. 159 - 164, 1974.

HAMDANI, A.; MOUNTADAR, M.; ASSOBHEI, O. Comparative study of the efficacy of three coagulants in treating dairy factory waste water. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 83 - 88, 2005.

HARUN, R.; SINGH, R. M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037 - 1047, 2010.

HENDERSON, R.; PARSONS, S.A.; JEFFERSON, B. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae. **Water Research**, v. 42, p. 1827 - 1845, 2008.

HEREDIA-ARROYO, T. WEI, W.; RUAN, R. HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245 - 2253, 2011.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1978 - 1995, 2010.

HESS, D. S.; SILVA, L. A.; FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M. **Avaliação da produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 cultivado em meio contendo lipídeos.** Departamento de Farmácia – Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, 2006.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 423 - 434, 2002.

HOAGLAND, K. D., ROSOWSKI, J. R., GRETZ, R., ROEMER, S. C. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. **Journal Phycology**, v. 29, p. 537 - 566, 1993.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. **Evaluation of the growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in effluent of fishing industry.** In: CHISA – 16 th International Congress of Chemical and Process Engineering. Prague, 2004.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. O Efeito da razão C/N e do inóculo na remoção de nitrogênio do efluente da indústria da pesca pela cianobactéria. **Revista Vetor**, Rio Grande, v. 15, p. 25 - 32, 2005.

HORNES, M.; QUEIROZ, M. I. **Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli.** Universidade Federal do Rio Grande (Tese Doutorado-Engenharia e Ciência de Alimentos), 2008.

HORNES, M.; QUEIROZ, M.I. **Evaluation of the growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in effluent of fishing industry.** In: CHISA – 16 th International Congress of Chemical and Process Engineering. Prague, 2004.

HORNES, M.; SILVA, A. G; MITTERER, M. L; QUEIROZ, M. I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 1 - 371, 2010.

HU, W. C.; THAYANITHY, K.; FORSTER, C. F. A kinetic study of the anaerobic digestion of ice-cream wastewater. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 965 - 971, 2002.

JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L. Q., PINTO, L. A. A., QUEIROZ, M. I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p.63 – 69, 2007b.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G; FRANCO, T.T. Rates of CO₂ removal by in tubular photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1365 - 1373, 2007c.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 894 - 900, 2010.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M.; QUEIROZ, M. I. Caracterização da fração protéica da cianobactéria cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482 - 488, 2006.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIN, M.; DE BOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4199 - 4205, 2007.

KAWSUK, J.; THORASAMPAN, W.; THANUTTAMAVONG, M.; SEO, G. T.. Kinetic development and evaluation of membrane sequencing batch reactor (MSBR) with mixed cultures photosynthetic bacteria for dairy wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p.1161 - 1168, 2010.

KAJI, T.; FUJIWARA, Y.; WATANABE, S.; SAKAMOTO, M. Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. **Life Sciences**, v. 70, p. 1841 - 1848, 2002.

KAWAI, L. A.; PINOTTI, M. H. P.; CELLIGOI, M. A. P. C. Exopolysaccharide production by the cyanobacteria *Nostoc* sp in different concentrations of nitrogen and glucose. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, p. 33 - 39, 2006.

KAWAMURA, S. Effectiveness of natural polyelectrolytes in water treatment. **Journal American Water Works Association**, v. 83, p. 88 - 91, 1991.

KIM, S.-H.; MOON, S. G.-Y.; YOON, C.-H. Role of coagulation in membrane filtration of wastewater for reuse. **Desalination**, v. 173, p. 301 - 307, 2005.

KNUCKEY, R. M.; BROWN, M. R.; ROBERT, R.; FRAMPTON, D. M. F. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, p. 300 – 313, 2006.

KREITLOW, S.; MUNDT, S.; LINDEQUIST, U. Cyanobacteria – a potential source of new biologically active substances. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 61 - 63, 1999.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V.; MALL, I. D. Treatment of dairy wastewater by commercial activated carbon and bagasse fly ash: parametric, kinetic and equilibrium modelling, disposal studies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3474 - 3483, 2010.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V.C.; MALL, I. D. Treatment of dairy wastewater by inorganic coagulants: Parametric and disposal studies. **Water Research**, v. 44, p. 5867 - 5874, 2010.

LAI, J.; YU, Z.; SONG, X.; CAO, X.; HAN, X. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 405, p. 6 – 17, 2011.

LALIBERTÉ, G.; LESSARD, P.; DE LA NOÛE, J.; SYLVESTRE, S. Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. **Bioresource Technology** v. 59, p. 227 - 233, 1997.

LEE, B. C.; BAE, J. T.; PYO, H. B.; CHOE, T. B.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 369 - 376, 2004

LEE, B. K.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 111 - 124, 2001.

LEE, J. B. HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; SANKAWA, U. Structural Analysis of Calcium Spirulan (Ca-SP)-Derived Oligosaccharides Using Elettrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 136 - 138, 2000.

LEE, J. S.; SUNG, K. D. Isolation of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalga *Chorella* s.p KR-1. **Renewable Energy**, v. 16, p. 1019 - 1022, 1998.

LEE, W. Y.; PARK, Y.; AHN, J. K.; KA, K. H.; PARK, S. Y. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 249 – 254, 2007.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher, p. 34 - 120, 2000.

LEVY, I.; BEER, S.; FRIEDLANDER, M. Growth photosynthesis and Agar in wild-type strains of *Gracilaria verrucosa* and *G. conferta* (Gracilariales, Rhodophyta), as a strains selection experiment. **Hydrobiologia**, v. 204, p. 381 - 387, 1990.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043 – 1049, 2009.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y.; BLACKBURN, JW. BATCH STAGE STUDY OF LIPID PRODUCTION FROM crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6745 – 6750, 2010.

LIN, E. S.; CHEN, Y. H. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2511 – 2517, 2007.

LINCOLN, E. P.; WILKIE, A. C.; FRENCH, B. T. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 1, p. 63 - 68, 1996

LIU, C.; LU, J.; LU, L., LIU; Y., WANG; F., XIAO, M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5528 – 5533, 2010.

LODI A, BINAGHI L, SOLISIO C, CONVERTI A, DEL BORGHI M. Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 656 – 660, 2003.

LOURENÇO, S. O.; MÁRQUEZ, U.; FILHO. J. M.; BARBARINO, E.; AIDAR. E. Changes in Biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Composition of two culture media. **Aquaculture**, v. 148, p. 153 - 168, 1997.

LUO, J.; CAO, W.; DING, L.; ZHU, Z.; WAN, Y.; JAFFRIN, M.Y. Treatment of dairy effluent by shear-enhanced membrane filtration: The role of foulants. **Separation and Purification Technology**, v. 96, p. 194 – 203, 2012.

MACHADO, R. M. G.; FREIRE, V. H.; SILVA, P. C.; FIGUERÊDO, D. V.; FERREIRA, P. E. **Controle ambiental nas pequenas e médias industriais de laticínios**. Projeto Minas Ambiente, Belo Horizonte, p. 224, 2002.

MACLER, B. A.; ZUPAN, J. R. Physiological basis for the cultivation of Gelidiales. **Hydrobiologia**, v. 221, p. 83 - 90, 1991.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brok**. 10 ed São Paulo; Prentice Hall Inc., 608 p. 2004.

MAGER, D. M.; THOMAS, A. D. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: A review of their role in dryland soil processes. **Journal of Arid Environments**, v. 75, p. 91 - 97, 2011.

MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H.F. **Reúso de Água**. São Paulo. Ed. Manole, 2003.

MARCO, A.S. Quanto custa a água. **Revista Frigorífico**. v. 132, p. 30 – 35, 2006.

MARKOU G, GEORGAKAKIS D Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. **Apple Energy**, v. 88 p. 3389 - 3401, 2011.

MARQUEZ, F. J. NISHIO, N.; NAGAI, S.; SASAKI, K. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 62, p. 159 - 164, 1995.

MARSON-ASCÊNCIO, P. G.; ASCÊNCIO, S. D.; BAGGIO, F. S. Z. Isolamento e análise química parcial de exopolissacarídeos da diatomácea marinha cultivada

Coscinodiscus wailesii (Coscinodiscales, Bacillariophyta). **Quimica Nova**, v. 15, p. 1 - 7, 2012.

MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; YOUSFI, F. El.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263 - 272, 2000.

MATHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 361 - 376, 1999.

MATOS, A. T.; CABANELLAS, C. F. G.; CECON, P. R. Efeito da concentração de coagulantes e do pH da solução na turbidez da água, em recirculação, utilizada no processamento dos frutos do cafeeiro. **Engenharia Agrícola**, v. 27, p. 544 - 551, 2007.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; LÚCIA, V.; BONONI, R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Reviews Microbiology**, v. 30, p. 77 - 84, 1999.

MEEKS, J. C.; CASTENHOZ, R. W. Growth and photosynthesis in the extreme thermophile, *Synechococcus liviolus* (Cyanophyta). **Archives of Microbiology**, v. 78, p. 25 - 71, 1971.

MELO, R. S. **Avaliação da Utilização de Exopolissacarídeos de Cianobactérias como Fonte de Inibidores na Formação do Biofilme Bacteriano**. Dissertação (Mestre em Ciências – Bioquímica) - Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

MIERZWA, J. C. **Água na indústria: uso racional e reúso**. p. 143, 2005.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3382 – 3386, 2009.

MITTAL, G. S. Treatment of wastewater from abattoirs before land application-a review. **Bioresource Technology**, v. 9, p. 1119 - 1135, 2006.

MOGHADDAM, S.S.; MOGHADDAM, M.R.; ARAMI, M. Coagulation/flocculation process for dye removal using sludge from water treatment plant optimization through response surface methodology. **Journal Hazardous Materials**, v. 175, p. 651 - 657, 2010.

MOHAN, S. V.; RAO, N. C.; PRASAD, K. K. Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1501 - 1508, 2005.

MOLINA-GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F. G.; ROBLES, M. A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491 - 515, 2002.

MOPPER, K., SCHULTZ, C. A., CHEVOLOT, L., REVUELTA, R., DAWSON, R. Determination of sugar in unconcentrated seawater and other waters by liquid chromatography pulse amperometric detection. **Environmental Science Technology**, v. 26, p. 133 - 138, 1992.

MORAES, L. C. K. **Estudo da coagulação e ultrafiltração para produção de água potável**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

MORENO, J. VARGAS, M. A.; OLIVARES, H.; RIVAS, J.; GUERREIRO, M. G. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena sp.* ATCC 33047 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 175 - 182, 1998.

MORENO, J. VARGAS, M. Á.; RODRÍGUEZ, H. Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the cyanobacterium *Anabaena sp.* ATCC 33047. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 67, p. 283 - 290, 2000.

MORENO, J.; VARGAS, M. Á.; RODRÍGUEZ, H. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena sp.* ATCC 33047. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 191 - 197, 2003.

MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3949 - 3964, 2008.

MORI, S.; CASTORENO, A.; MULLIGAN, M.E.; LAMMERS, P.J. Nitrogen status modulates the expression of RNA-binding proteins in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 203 - 210, 2003.

MORIST, A.; MONTESINOS, J. L.; CUSIDÓ J. A.; GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina Platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, p.535 - 547, 2001.

MYERS, R. H. MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, 2 nd ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.

NAMBOODIRI, A. M. A.; PEETHAMBARAN, A.; MATHEW, R.; SAMBHU, P. A.; HERSHFELD, J.; MOFFERTT, J. R.; MADHAVARAO, C. N. Canavan disease and the role of N-acetylaspartate in myelin synthesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, p. 216 - 223, 2006.

NGUYEN, H.; WANG, T.; LIN, T.; GUO, J. Optimal conditions for mycelia biomass and extracellular polysaccharides of *Grifola frondosa*: Effect of agitation speed, inoculum ratio and initial Ph. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 6317 - 6326, 2012.

NICOLAUS, B.; PANICO, A.; LAMA, L.; ROMANO, I.; MANCA, M.C.; GIULIO, A.; GAMBACORTA, A. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. **Phytochemistry**, v. 52, p. 639 - 647, 1999.

NUÑEZ, V. J.; VONTOLINA, D.; NIEVES, M.; PINA, P.; MEDINA, A.; GUERRERO, M. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 161 - 164, 2001.

O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 121 - 125, 2011.

OGBONNA JC, TOMIYAMA S, TANAKA H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* z for efficient production of α -tocopherol. **Journal Applied Phycology**, v. 10, p. 67 - 74, 1998.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLAIZOLA, M. Microalgal removal of CO₂ from flue gases: Changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 360 - 367, 2003.

OLGUÍN, E.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19 - 24, 2001.

OLVERA-RAMÍREZ, R.; CORIA-CEDILLO, M.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; PONCE-NOYOLA, T.; RIOS-LEAL, E.. Growth evaluation and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 121 - 124, 2000.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p.143 - 153, 2003.

ÖZACAR, M., SENGİL, A. Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for coagulation of colloidal particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 229, p. 85 - 96, 2003

PACE, G. W.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 15, p. 41 - 70, 1980.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: Aspinall, G.O. (Ed.). **The polysaccharides**, v. 2, p. 195 - 285, 1983.

PANDEY, A.; AZMI, W.; SINGH, J.; BANERJEE, U. C. **Biotechnology: food fermentation**. In: V. K. Joshi, A. Pandey (Eds). New Delhi: Educational Publishers & Distributors, v. 1, p. 383 - 4260, 1999.

PAPA, J. L. **Visão geral: tratamento de efluentes em laticínios**. In: Seminário “Efluentes de laticínios: Alternativas Tecnológicas e Viabilidade Econômica”. ITAL, 2000.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1822 - 1827, 2006.

PARK, S.; YOON, T. Effects of iron species and inert minerals on coagulation and direct filtration for humic acid removal. **Desalination**, v. 239, p. 146–158, 2009.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10163 – 10172, 2011.

PEARSON, M. J. **Toxic blue-green algae**: Report of the National Rivers Authority Water Quality. Series n. 2, United Kingdom: 1990.

PELCZAR, J. R.; M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia; conceitos e aplicações**. 1997. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, v. 1, 2.

PEPPIN, S. S. L.; ELLIOT, J. A. W. Non-equilibrium thermodynamics of concentration polarization. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 92, p. 1 – 72, 2001.

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 190 - 199, 2011b.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, E. Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11 - 36, 2011a.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, v. 25, p. 102 - 117, 2011.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 31 – 39, 2008.

PROSPERI, C. H. A cyanophyte capable of fixing nitrogen under high levels of oxygen. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 30, p. 222 - 224, 1994.

PRZYTOCKA-JUSIAK, M. Growth and Survival of *Chlorella vulgaris* in high concentrations of nitrogen. **Actamicrobiol**, v. 25, p. 287 - 289, 1976.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of micro algae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635 – 648, 2004.

QUEIROZ, M. I. ; LOPES, E. J. ; ZEPKA, L. Q. ; NETTO, F. M. Caracterização da Fração Protéica da Cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli Cultivada no Efluente da Parboilização do Arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482 - 488, 2006c.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, R. G.; ALMEIDA, T. L. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 9, p. 112 - 116, 2004a.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, R. G.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. G. Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece microscopica* Nägeli en las aguas residuales de la parbolización del arroz. **Revista Información Tecnológica**, v. 13, p. 61 - 66, 2002.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O. Efeito da razão C/N e do inóculo na remoção de nitrogênio do efluente da indústria da pesca pela cianobactéria. **Revista Vector**, Rio Grande, v. 15, p. 25 - 32, 2005.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438 – 3443, 2011.

QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q, BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2163 -2169, 2007c.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O. The Nägeli *microscopical Aphanothece* **potential in the production of the single-cell protein from the remaining water**. In: CHAMES, S. W.; CÁNOVASBARBOSA, G. V.; AGUILERA, J. M. (Ed.) Proceedings if the Eighth International Congress on Engineering and Food (ICEF 8). Pennsylvania, USA, 2027-2031, 2001.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 22, p. 10 - 16, 2007a.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; PINTO, L. A. A. Characteristics of Thin-Layer Drying of the Cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 63 - 69, 2007d.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; PINTO, L. A. A. Secagem da cianobactéria *Aphanotece microscopica* Nägeli em leito de jorro. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 387 - 392, 2006a.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; ROSA, L. S.; GOLDBECK, R. Nutricional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanotece microscopica* Nägeli. **Microbiological Research**, v. 101, p. 7107 - 7111, 2006b.

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O.; KOETZ, P.; YUNES, J. S.; SOUSASOARES, L. Avaliação do Teor de Proteínas da *Aphanotece* sp e caracterização em aminoácidos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 1089 - 1092, 1998.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanotece microscopica* Nägeli in batch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 130 - 141, 2004b.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; GOLDBECK, R. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanotece microscopica* Nägeli submitted to different drying condition. **Chemical Engineering and Processing**, v. 50, p. 1 - 6, 2007b.

RAMOS, M. V.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T. B.; DEBRAY, H. Characterization of the Sugar-Binding Specificity of the Toxic Lectins Isolated from *Abrus pulchellus* Seeds. **lycoconjugate Journal**, v. 18, p. 391 - 400, 2001.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G., CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133 - 141, 2004.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, p. 807 - 815, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 728, 1992.

RAYESSA, Y.E.; ALBASIA, C.; BACCHINC, C.P.; TAILLANDIER, P.; RAYNAL, J.; MIETTON-PEUCHOT, M.; DEVATINE, A. Cross-flow microfiltration applied to oenology: A review. **Journal of Membrane Science**, v. 382, p. 1 - 19, 2011.

RIAÑO, B; MOLINUEVO, B; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology. **Ecological Engineering**, v. 38, p. 110 - 113, 2012.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 566 p., 2004.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Florida: CRC Press: p. 528, 1990.

RICHMOND, A.; VONSHAK, A., Mass production of the blue green alga *Spirulina* an overview. **Biomass**. v. 15, p. 233 - 245, 1988.

RIERA-TORRES, M.; GUTIERREZ-BOUZAN, C.; CRESP, M.; Combination of coagulation-flocculation and nanofiltration techniques for dye removal and water reuse in textile effluents. **Desalination**, v. 252, p. 53 - 59, 2010.

RIJSSEL, M. V.; JANSEB, I.; NOORDKAMPB, D. J. B.; GIESKESA, W. W. C. An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. **Journal of Sea Research**, v. 43, p. 297 – 306, 2000.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**. v. 111. p. 01 - 61, 1979.

ROMANO, I.; BELLITTI, R.; NICOLAUS, B.; LAMA, L.; MANCA, M.C.; PAGNOTTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v. 50, p. 560 - 568, 2000.

SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; BELTRÁN-HEREDIA, J. Nature Is the Answer: Water and Wastewater Treatment by New Natural-Based Agents. **Advances in Water Treatment and Pollution Prevention**, p. 337 - 375, 2012.

SANCHO, M. E. M.; CASTILLO, J. M. J.; YOUSFI, F. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 811 - 818, 1999.

SANTOS, G. M. S.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 17 - 21, 2003.

SANTOS, H. R. **Aplicação de coagulantes no afluente de reator anaeróbio de efluente expandido alimentado com esgoto doméstico**. 2001. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

SANTOS, R. C. O.; BARBOSA, O. F.; GIORDANO, G. Proposta de um método racional para o dimensionamento de reatores de tratamento de esgotos por lodos ativados em bateladas para remoção de carga orgânica. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 11, p. 153 - 161, 2006.

SARADA, R., MANOJ, G., PILLAI, G., RAVINSHANKAR, A., Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of

efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795 - 801, 1998.

SARKAR, B; CHAKRABARTI, P. P; VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. Wastewater treatment in dairy industries—possibility of reuse. **Desalination**, v. 195, p. 1 – 3, 2006.

SATPUTE, S. K., BANAT, I. M., DHAKEPHALKAR, P. K., BANPURKAR, A. G., CHOPADEV, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 436 – 450, 2010.

SCHENK, P., THOMAS-HALL, S., STEPHENS, E., MARX, U., MUSSGNUG, J., POSTEN, C., KRUSE, O., AND HANKAMER, B. “Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 20 - 43, 2008.

SCHMETTERER, G. **Cyanobacterial Respiration**. In: BRYANT, D. A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 409 - 435, 1994.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reúso**. São Paulo: ABES, 2001.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science. Technology**, v. 91, p. 21 – 40, 2001.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium gluanicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Letters in applied microbiology**, v. 34, p. 51 -55, 2002.

SHENG, G. P. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 882-894, 2010.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Stability of sludge flocs under shear conditions: roles of extracellular polymeric substances (EPS). **Biotechnology Bioengineering**, v. 93, p. 1095 - 1102, 2006.

SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1 – 7, 2003.

SHU, C. H.; YANG, S. T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 454 - 468, 1990.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Englewood Cliffs: Prentice Hall International Inc., 1992.

SIEGLER, H.H.; BEN-ZVI, A.; BURRELL, R.E.; MCCAFFREY, W.C. The dynamics of heterotrophic algal cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5764 - 5774, 2011.

SILVA, A. G. M.; HORNES, M. O.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Application of coagulants in pretreatment of fish wastewater using factorial Design. **Desalination and Water Treatment**, v. 1, p. 208 - 214, 2009.

SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Valéria Christina Amstalden - São Paulo : Livraria Varela, 1997, p. 31.

SILVA-MANETTI, A. G.; HORNES, M. O.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Fish processing wastewater treatment by combined biological and chemical processes aiming at water reuse. **Desalination and Water Treatment**, v. 29, p. 196 - 212, 2011.

SMITH, A. R. W.; MUNRO, S. M.; WAIT, R.; HIGNETT, R. C. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plum isolated of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. **Microbiology**, v. 140, p. 1585 - 1593, 1994.

SPOLAORE, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87 - 96, 2006.

STACEY, F. R. S.; BARKER, S. A. **Polysaccharides of micro-organisms**, p. 75 - 113, Oxford Press, 1960.

STANIER, R.Y., W.R. SISTROM, T.A. HANSEN, B.A. COHITTON, R.W. CASTENHOLZ, N. PFENNIG, V.N. GORLENKO, E.N. KONDRATIEVA, K.E. EIMJELLEN, R. WHITTENBURY, R.L. Gherna, and H. G. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. **International Journal System Bacteriology**, v. 28, p. 335 - 336, 1978.

SUNG, S.; LIU, T. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. **Chemosphere**, v. 53, p. 43 - 52, 2003.

SUTHANTHARARAJAN, R.; RAVINDRANATH, E.; CHITRA, K. Membrane application for recovery and reuse of water from treated tannery wastewater. **Desalination**, v. 164, p. 151 - 156, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41 - 46, 1998.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 145 - 151, 2000

TANAC. **Boletim Informativo**. Montenegro – RS. Brasil, 2008.

TANG, D.; SHI, S.; LI, D.; HU, C.; LIU, Y. Physiological and biochemical responses of *Scytonema javanicum* (cyanobacterium) to salt stress. **Journal of Arid Environments**, v. 71, p. 312 - 320, 2007.

THAJUDDIN , N. & G. SUBRAMANIAN. Cyanobacterial Biodiversity and potential application in Biotechnology. **Current Science**, v. 89, p. 47 - 57, 2005.

TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1144-1148, 2003.

TOMASELLI, L. **The Microalgal Cell**. In: RICHMOND, A. (Ed.) Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p. 3 - 19, 2004.

TONDI, G.; OO, C. W.; PIZZI, A.; THEVENON, M. F. Metal absorption of tannin-based rigid foams, **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 336 – 340, 2009.

TORRE, P.; SASSANO, C.E.N.; SATO, S.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; CARVALHO, J.C.M.. Fed-batch addition of urea for *Spirulina platensis* cultivation Thermodynamics and material and energy balances. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 698 - 707, 2003.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M.F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggyery waste. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 158 -165, 2006.

UDUMAN, N., QI Y.; DANQUAH, M. K.; HOADLEY, A. F. A. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 935 – 940, 2010.

UNESCO, World Water Assessment Programme. **The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World**, Earthscan, London, UK, 2009.

VASHITZ, O; SHEINTUCH, M. Analysis of polymer synthesis rates during steady-state growth of *X. campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 383 - 385, 1991.

VIANNA, M. R. **Hidráulica aplicada às estações de tratamento de água**. Belo Horizonte:Imprimatur, 2002. 576 p.

VIDAL, C.M.S.; CAMPOS, J.R. Coagulation associated with microfiltration for the advanced treatment of sewage. **Ambiência Guarapuava**, v. 5, p. 101- 114, 2009.

VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVES, M.; SOTO, L. P. Growth of *Snedesmus* sp. in artificial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 265 - 268, 1998.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**, v. 219, p. 190 – 202, 2008.

WANG, Y.; HUANG, X.; YUAN, Q. Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic/aerobic membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1733 - 1739, 2005.

WEISSMAN, J. C.; RADWAY, J. C.; WILDE, E. W.; BENEMANN, J. R. Growth and production of thermophilic cyanobacteria in a simulated thermal mitigation process. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 87 - 95, 1998.

WHO, UNICEF. **Joint Programme on Water Supply and Sanitation**, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland, 2009.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494 – 5500, 2010.

XING, X. H.; JUN, B. M.; YANAGIDA, M.; TANJI, Y.; UNNO, H. Effect of C/N values on microbial simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous substances in wastewater by single continuous-flow fluidized-bed bioreactor containing porous carrier particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 29 - 37, 2000.

XU, H., MIAO, X. & WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126: 499 - 507, 2006.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light- autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 87 – 102, 2000.

YUE, L., CHEN, W. Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 46, p. 1896 - 1846, 2005.

YUNES, JS. Florações de microcystis na Lagoa dos Patos e o seu estuário: 20 anos de estudos. **O ecologia Brasiliensis**, v. 13, p. 313 - 318, 2009.

ZEPKA, L. Q. ; JACOB-LOPES, E. ; GOLDBECK, R. ; QUEIROZ, M. I. . Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1305 - 1310, 2008.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, p. 368 - 371, 2007.

ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDECK, R.; SOUSA-SOARES, L.A.; QUEIROZ, M.I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresourse Technology**, v. 101, p. 7118 - 7122, 2010.

ZUO, W.; ZHANG, G.; MENG, Q.; ZHANG, H. Characteristics and application of multiple membrane process in plating wastewater reutilization. **Desalination**, v. 222, p. 187 – 196, 2008.