



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

VALORAÇÃO DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA PROCESSADORA DE PESCADO
POR INCORPORAÇÃO DE NUTRIENTES EM *Aphanothece microscopica* Nägeli

Marcio Oliveira Hornes

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

RIO GRANDE, RS

2008

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

VALORAÇÃO DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA PROCESSADORA DE PESCADO
POR INCORPORAÇÃO DE NUTRIENTES EM *Aphanothece microscopica* Nägeli

Marcio Oliveira Hornes
Msc em Engenharia e Ciência 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

2008

Aos meus pais

Zilmar Carvalhal Hornes e Zaida H. Oliveira Hornes

Que estiveram sempre presentes e me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria Isabel Queiroz, pela orientação, ajuda e paciência dispensadas;

À querida e amada namorada Alexandra, mãe da minha futura Nicole;

À FAPERGS, pela bolsa concedida;

Ao CNPq/CAPES, pelo apoio financeiro;

À Empresa Albano de Oliveira e Cia Ltda;

Aos professores da banca, Luis A. A. Pinto, Carlos Prentice-Hernández, Paulo R. Koetz, Loraine A. Isoldi e Janaína F. M. Burkert;

Aos técnicos laboratoristas Mariluce Martins, Maria da Graça Amaral, Rogério Oliveira, Roque Zílio, Jaques Rizzi e em especial à Maria da Graça Oliveira, a pessoa mais querida e prestativa da FURG;

Ao Sr. Iradilso, funcionário da Biblioteca Campus Cidade, sempre cordial e disposto a ajudar;

A todos os professores que em certos momentos gentilmente emprestaram seus equipamentos e dependências;

Aos amigos e colegas Ricardo, Leonardo, Marlice, Liziane, Lúcia, Vilásia, Júnior, Felipe, Aninha, Grá, Michele's, Martinha, Gabriele e todos aqueles que contribuíram de alguma maneira;

Um agradecimento especial às colegas Marina Mitterer e Adriana Silva, as quais foram imprescindíveis na execução deste trabalho e que ajudaram das mais diferentes formas;

Ao Conan, o melhor e mais amigo Bull Terrier do mundo.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	iv
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
NOMENCLATURA	xiv
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1 Efluente do processamento de pescado	7
2 Tratamento de efluentes	9
2.1 Tratamento biológico	11
2.2 Cianobactérias	19
2.2.1 Tratamento de efluentes por cianobactérias	23
2.3 Produção e separação de biomassa	27
2.4 Composição química	29
2.4.1 Proteínas	29
2.4.2 Carboidratos	32
2.4.3 Lipídios	34
2.4.4 Pigmentos	37
2.4.4.1 Ficobiliproteínas	41
2.4.4.1.1 Ficocianina	41
2.4.4.1.2 Ficoeritrina	42
2.4.4.2 Clorofila	43
2.5 Compostos nitrogenados	44
2.6 Cinética de crescimento	47
2.7 Modelagem matemática de crescimento microbológico	51
2.8 Fatores que interferem no cultivo de cianobactérias	55

2.9 Tratamento físico-químico por coagulação/floculação	58
3 Referências	60
CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	77
Artigo 1 – Influência da temperatura na remoção de nutrientes do efluente da indústria de pescado por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	78
RESUMO	79
ABSTRACT	80
1 INTRODUÇÃO	81
2 MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1 Microrganismo	82
2.1.1 Preparo do inóculo	82
2.2 Efluente	83
2.3 Desenvolvimento dos experimentos	84
2.4 Eficiência de remoção	84
2.5 Cinética	85
2.6 Estimativa do processo contínuo	85
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1 Caracterização do efluente	86
3.2 Crescimento e remoção de nutrientes	89
3.3 Análise cinética	96
4 CONCLUSÃO	98
5 REFERÊNCIAS	99
Artigo 2 – Efeito de coagulantes no efluente do processamento do pescado visando a separação de biomassa quando tratado por cianobactéria	104
RESUMO	105
ABSTRACT	106
1 INTRODUÇÃO	107
2 MATERIAL E MÉTODOS	109
2.1 Efluente	109
2.2 Tratamento químico	109
2.2.1 Planejamento experimental	109
2.2.2 Avaliação dos resultados dos planejamentos fatoriais	110
2.3 Separação da biomassa	111

2.3.1 Cultivo da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli no efluente da indústria da pesca	111
2.3.1.1 Preparo do inóculo	111
2.3.1.2 Efluente	112
2.3.1.3 Desenvolvimento dos experimentos	112
2.3.1.4 Separação da biomassa gerada	112
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
4 CONCLUSÃO	121
5 REFERÊNCIAS	121
Artigo 3 – Efeito da temperatura na composição química, clorofila <i>a</i> e ficocianina da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado	126
RESUMO	127
ABSTRACT	128
1 INTRODUÇÃO	129
2 MATERIAL E MÉTODOS	131
2.1 Microrganismo	131
2.1.1 Preparo do inóculo	131
2.2 Meios de cultivo	131
2.3 Desenvolvimento dos experimentos	132
2.4 Cinética	132
2.5 Separação da biomassa	133
2.6 Secagem da biomassa	134
2.7 Composição química	134
2.7.1 Proteína total	134
2.7.2 Carboidratos totais	134
2.7.3 Lipídios totais	134
2.7.4 Cinzas	134
2.7.5 Pigmentos	134
2.8 Avaliação dos resultados	135
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	135
3.1 Composição química	135
3.1.1 Proteína	135

3.1.2 Carboidratos	137
3.1.3 Lipídios	138
3.1.4 Cinzas	141
3.2 Clorofila <i>a</i> e ficocianina	141
4 CONCLUSÃO	147
5 REFERÊNCIAS	147
Artigo 4 – Influência da temperatura e do meio de cultivo em compostos nitrogenados na cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	154
RESUMO	155
ABSTRACT	156
1 INTRODUÇÃO	157
2 MATERIAL E MÉTODOS	159
2.1 Microrganismo	159
2.1.1 Preparo do inóculo	159
2.2 Meios de cultivo	159
2.3 Desenvolvimento dos experimentos	160
2.4 Determinação de nitrogenados	160
2.5 Avaliação da influência do nitrogênio não protéico (NNP) na quantificação de proteína	161
2.6 Cinética	161
2.7 Avaliação dos resultados	162
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	163
4 CONCLUSÃO	172
5 REFERÊNCIAS	173
Artigo 5 - Produção de proteína unicelular a partir do efluente do processamento do pescado: modelagem preditiva e simulação	178
RESUMO	179
ABSTRACT	180
1 INTRODUÇÃO	181
2 MATERIAL E MÉTODOS	182
2.1 Microrganismo	182
2.1.1 Preparo do inóculo	182
2.2 Meio de cultivo	183

2.3 Desenvolvimento dos experimentos	183
2.3.1 Obtenção dos dados de crescimento celular	184
2.4 Modelagem matemática e validação estatística	184
2.5 Otimização da produção de biomassa	186
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	187
4 CONCLUSÃO	196
5 REFERÊNCIAS	196
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÃO GERAL	201
CONCLUSÃO GERAL	202

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Propriedades físicas e espectrais de algumas ficobiliproteínas.....	39
Tabela 2. Composição do nitrogênio presente em cianobactérias e legumes.....	45

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

1º Artigo: Influência da temperatura na remoção de nutrientes do efluente do processamento de pescado por *Aphanothece microscopica* Nägeli

Tabela 1. Caracterização do efluente proveniente do tratamento primário de uma indústria de processamento de pescado.....	86
Tabela 2. Matriz de correlação entre os parâmetros avaliados.....	87
Tabela 3. Eficiências de remoção máximas para as variáveis DQO, NTK, $N-NH_4^+$ e $P-PO_4^{-3}$ no cultivo da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas.....	94
Tabela 4. Variáveis cinéticas nas condições experimentais.....	96
Tabela 5. Estimativa do reator seqüencial de batelada para a redução de DQO.....	98

2º Artigo: Efeito de coagulantes no efluente do processamento do pescado visando a separação de biomassa quando tratado por cianobactéria

Tabela 1. Codificação dos níveis das variáveis testadas nos planejamentos fatoriais completos 3^2	110
Tabela 2. Matriz de planejamento experimental utilizando o coagulante cloreto férrico para o tratamento físico-químico e eficiência de remoção dos parâmetros avaliados.....	113
Tabela 3. Matriz de planejamento experimental utilizando o coagulante sulfato de alumínio para o tratamento físico-químico e eficiência de remoção dos parâmetros avaliados.....	113
Tabela 4. Análises dos efeitos principais e interação para a ação do coagulante cloreto férrico na remoção de DQO, NTK, $N-NH_4^+$, $P-PO_4^{-3}$ e SS.....	114

Tabela 5. Análises dos efeitos principais e interação para a ação do coagulante sulfato de alumínio na remoção de DQO, NTK, $N-NH_4^+$, $P-PO_4^{-3}$ e SS.....	115
Tabela 6. Modelos de regressão para as variáveis respostas.....	116
Tabela 7. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados para o coagulante cloreto férrico.....	117
Tabela 8. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados para o coagulante sulfato de alumínio.....	117
Tabela 9. Diferença de médias segundo teste de Tukey para as eficiências de remoção de DQO e SS para os experimentos 3, 6, 8 e 9 utilizando como coagulante cloreto férrico.....	119
Tabela 10. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos suspensos (SS) por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli e cloreto férrico.....	119
Tabela 11. Remoção de cloreto férrico da biomassa em função de sucessivas lavagens...	120

3º Artigo: Efeito da temperatura na composição química, clorofila *a* e ficocianina da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado

Tabela 1. Composição química da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli desenvolvida no efluente do pescado em diferentes temperaturas e em meio BG11 a 30°C.....	135
Tabela 2. Concentrações de clorofila <i>a</i> e ficocianina para a cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado a diferentes temperaturas e em meio BG11 a 30°C.....	142
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado a diferentes temperaturas.....	145

4º Artigo: Influência do meio de cultivo e temperatura em compostos nitrogenados na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli

Tabela 1. Valores médios de produção de biomassa em função do tempo e da temperatura para os cultivo no efluente do processamento de pescado.....	164
Tabela 2. Variáveis cinéticas obtidas para os experimentos	165

Tabela 3. Valores médios de produção de biomassa em função do tempo para os cultivos no efluente e meio BG11 a 30°C	165
Tabela 4. Concentração de nitrogênio total Kjeldahl e nitrogênio não protéico na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado e em meio padrão	166
Tabela 5. Concentração de íon amônio, nitrito e nitrato intracelular na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado e em meio padrão.....	168
Tabela 6. Concentração de proteína e ácidos nucléicos na biomassa da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado e em meio padrão.....	169

5º Artigo: Produção de proteína unicelular a partir do efluente do processamento do pescado: modelagem preditiva e simulação

Tabela 1. Validação estatística dos modelos matemáticos para as três condições avaliadas	190
Tabela 2 Parâmetros de crescimento obtidos para as diferentes condições de cultivo a partir do modelo Logístico.....	193
Tabela 3. Resultados da predição em 1000 h de operação contínua (10°C).....	193
Tabela 4. Resultados da predição em 1000 h de operação contínua (20°C).....	194
Tabela 5. Resultados da predição em 1000 h de operação contínua (30°C).....	194
Tabela 6. Estimativa de produção de compostos celulares em função da temperatura tomando com base a biomassa obtida por simulação.....	196

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Ficobilinas comuns: grupos tetrapirrólicos cromóferos lineares, covalentemente unidos às cadeias de polipeptídeos de ficobiliproteínas através de ligações tioéteres aos resíduos de cisteína	38
Figura 2. Modelo de um ficobilissoma tricilíndrico hemidiscoidal	41

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

1º Artigo: Influência da temperatura na remoção de nutrientes do efluente da indústria de pescado por *Aphanothece microscopica* Nägeli

Figura 1. Curvas de crescimento da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli desenvolvida no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas.....	89
Figura 2. Variação do pH com o tempo no cultivo da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas.....	90
Figura 3. Variação da concentração de DQO com o tempo no cultivo da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas.....	91
Figura 4. Variação da concentração de NTK com o tempo no cultivo da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas.....	92
Figura 5. Variação da concentração de $N-NH_4^+$ com o tempo no cultivo da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas.....	93
Figura 6. Variação da concentração de $P-PO_4^{-3}$ com o tempo no cultivo da cianobactéria <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas.....	95

2º Artigo: Efeito de coagulantes no efluente do processamento de pescado visando a separação de biomassa quando tratado por cianobactéria

Figura 1. Superfícies de resposta para eficiência de remoção de DQO e SS utilizando FeCl_3 como coagulante..... 118

Figura 2. Superfícies de resposta para eficiência de remoção de DQO e SS utilizando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ como coagulante..... 118

4º Artigo: Influência do meio de cultivo e temperatura em compostos nitrogenados na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli

Figura 1. Curvas de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado em diferentes temperaturas..... 163

Figura 2. Curva de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no meio padrão BG11..... 163

5º Artigo: Produção de proteína unicelular a partir do efluente do processamento do pescado: modelagem preditiva e simulação

Figura 1. Ajuste dos modelos aos dados experimentais (10°C) 188

Figura 2. Ajuste dos modelos aos dados experimentais (20°C) 188

Figura 3. Ajuste dos modelos aos dados experimentais (30°C) 189

Figura 4. Diagrama representativo da influência teórica do período de operação em batelada na produção de biomassa para a temperatura de 30°C 195

NOMENCLATURA

β : Coeficiente de regressão linear múltipla

$\mu_{\max}$: Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1})

λ : Comprimento de onda (nm)

ψ : Duração da fase lag (h^{-1})

θ_c : Tempo de retenção celular (h)

α : nível de significância estatística

γ : Parâmetro de curvatura

a_w : atividade de água

A: Logaritmo neperiano assintótico da concentração celular quando t decresce indefinidamente

A_f : Fator de acuracidade

A/N: Relação alimento/microrganismo

$A(t)$: Integral do fator de ajuste (h)

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

B: Taxa de crescimento relativa no tempo M (h^{-1})

B_f : Fator de Bias

BT: Processo totalmente em batelada

C: Logaritmo neperiano assintótico da concentração celular quando t aumenta indefinidamente

CB: Cultivo em batelada

CO_2 : Dióxido de carbono

CH_4 : Metano

CV: Coeficiente de variação

C/N: Razão entre carbono e nitrogênio

DQO: Demanda Química de Oxigênio (mg.L^{-1})

F: Estatística de Snedecor

FAO: Food and Agriculture Organization

FeCl_3 : Cloreto férrico

H_2S : Ácido sulfídrico

K: Tempo quando a máxima taxa de crescimento é obtida (h^{-1})

K_C : Constante de saturação (h^{-1})
 K_D : Constante de decaimento celular (h^{-1})
 K_S : Constante de saturação de Contois (h^{-1})
 M : Tempo em que a taxa de crescimento é máxima (h)
 NH_3 : Amônia
 NH_4^+ : Íon amônio
 $N-NH_4^+$: Nitrogênio amoniacal ($mg.L^{-1}$)
 NNP : Nitrogênio não protéico ($mg.L^{-1}$)
 NO_2^- : Íon nitrito
 NO_3^- : Íon nitrato
 NTK : Nitrogênio Total Kjeldahl ($mg.L^{-1}$)
 NTK/NNP : Percentual de NTK em relação ao NNP ($g\ NNP\ g\ NTK^{-1}$)
 NTU : Unidade Nefelométrica
 N/P : Razão entre nitrogênio e fósforo
 O_2 : Oxigênio dissolvido
 Obs : Valor observado
 p : Probabilidade
 pH : potencial hidrogeniônico;
 POB : Período de operação em batelada
 $Pred$: Valor predito
 PTO : Período total de operação
 $P-PO_4^{-3}$: Fosfatos ($mg.L^{-1}$)
 q_S : Taxa específica de remoção de substrato ($mg\ S/mg\ biomassa.h$)
 $q_{máx}$: Taxa máxima específica de remoção de substrato ($mg\ S/mg\ biomassa.h$)
 r : Coeficiente de correlação
 RBS : Reator de batelada seqüencial
 $RMSE$: Raiz quadrada do erro médio
 S : Concentração de substrato ($mg.L^{-1}$)
 $\%SEP$: Erro padrão de predição
 SO_4^{-2} : Íon sulfato
 $SSed$: Sólidos sedimentáveis ($mg.L^{-1}$)
 SS : Sólidos suspensos ($mg.L^{-1}$)
 t : Tempo (h)

t_r : Tempo de residência (h)

T : Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

t_g : Tempo de Geração (h)

ton: Tonelada

VVM: Volume de ar por volume de meio por minuto ($\text{m}^3 \text{m}^{-3} \text{min}^{-1}$)

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

X_0 : Concentração celular inicial (mg.L^{-1})

$X_{\text{máx}}$: Concentração celular máxima (mg.L^{-1})

X_{obs} : Média dos valores observados

X_t : Concentração celular no tempo t (mg.L^{-1})

y : $\ln (X_t/X_0)$

$Y_{X/S}$: Fator de conversão de substrato em célula (mg biomassa/mg S)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO

Nesta tese procurou-se demonstrar a valoração do efluente do processamento de pescado por incorporação dos nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli a diferentes temperaturas. Para tanto o trabalho é composto de cinco artigos que objetivaram avaliar sob o ponto de vista do tratamento do efluente pela cianobactéria *Aphanothece* e a separação e avaliação da biomassa gerada. O primeiro artigo intitula-se “Influência da temperatura na remoção de nutrientes do efluente da indústria de pescado por *Aphanothece microscopica* Nägeli”, e teve por objetivo avaliar a influência da temperatura (10, 20 e 30°C) em um sistema de tratamento pela cianobactéria *Aphanothece* na remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo do efluente oriundo do processamento de pescado. A análise dos resultados mostrou que a temperatura influenciou significativamente na remoção de DQO, NTK, N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} . Para os experimentos a 20 e 30°C todos os limites estabelecidos para os parâmetros avaliados foram atingidos. O segundo artigo intitulado “Efeito de coagulantes no efluente da indústria da pesca visando à separação de biomassa quando tratado por cianobactéria” avaliou o efeito da concentração e pH de dois tipos de coagulantes, cloreto férrico (FeCl_3) e sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), na separação da biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada em efluente da indústria da pesca, assim como a remoção de matéria orgânica e nutrientes do efluente. Os resultados indicaram que o coagulante FeCl_3 foi mais eficaz na remoção de todos os parâmetros testados. No que concerne à separação da biomassa, com um número de seis lavagens foi removido cerca de 97,6% da concentração de FeCl_3 adicionado inicialmente. O terceiro artigo com o título “Caracterização da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli gerada no efluente da indústria da pesca em diferentes temperaturas de cultivo” avaliou a composição química da biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli quando desenvolvida em meio de cultivo padrão BG11 e no efluente do processamento de pescado. O quarto artigo teve como título “Influência do meio de cultivo e temperatura em compostos nitrogenados na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli” objetivou avaliar o teor de compostos nitrogenados presentes na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli quando cultivada em meio padrão e no efluente da indústria da pesca nas diferentes fases de crescimento. Para o estudo da composição química e nitrogenados no efluente foram realizados experimentos nas temperaturas de 10, 20 e 30°C. As concentrações de proteína, cinzas e pigmentos aumentaram com o aumento da temperatura. Por outro lado, foi observada uma redução do teor de lipídios e carboidratos com o aumento da temperatura. O íon amônio juntamente com os ácidos nucléicos representa uma importante fração do nitrogênio não protéico presente na biomassa da cianobactéria *Aphanothece*. Ficou demonstrada a influência do meio de cultivo na concentração de nitrogênio, bem como a determinação de proteína pelo método de Kjeldahl superestima a concentração protéica em cianobactérias. O quinto artigo intitulado “Produção de proteína unicelular a partir do efluente do processamento do pescado: modelagem preditiva e simulação” avaliou a produção de proteína unicelular através do cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da indústria da pesca. Os dados cinéticos de crescimento celular foram ajustados a quatro modelos matemáticos (Logístico, Gompertz, Gompertz Modificado e Baranyi). Os resultados demonstraram que o modelo Logístico foi considerado o mais adequado para descrever a formação de biomassa. A análise preditiva mostrou a possibilidade da obtenção de 1,66, 18,96 e 57,36 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ de biomassa por volume do reator em 1000 h de processo contínuo, para as temperaturas de 10, 20 e 30°C, respectivamente.

ABSTRACT

In this thesis we tried to demonstrate the valorization of the fish processing effluent by nutrient incorporation in *Aphanothece microscopica* Nägeli in different temperatures. Thus, the following work is composed of five articles, which aimed to evaluate under the effluent treatment by cyanobacterium *Aphanothece* and the biomass harvest. The first article entitled “Influence of temperature in nutrient removal of the fish processing effluent by *Aphanothece microscopica* Nägeli”, aimed to determine the influence of temperature (10, 20 e 30°C) on the organic matter, nitrogen and phosphorus removal when the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli is applied in fish industry effluent. It was showed the temperature has significantly influence in COD, TKN, N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} removal. The limits established by Brazilian legislation were reached for the treatments at 20 e 30°C. The second article, with the title “Effect of coagulants in fish processing effluent for biomass harvesting when treated by cyanobacteria” evaluated the concentration and pH effect by two coagulants – ferric chloride (FeCl_3) and aluminum sulfate ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) – to recover the biomass of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli grown in fish industry effluent, and to remove organic matter and nutrients from the effluent. The results showed the coagulant FeCl_3 remove the most the organic matter and nutrients. It was achieved 97,6% of FeCl_3 residual removal with six biomass washings. The third article with the title “Biomass characterization of *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated in fish industry effluent in different temperatures” focused on chemical composition of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli biomass when it was grown in BG11 media and fish processing effluent. The fourth article has the title “Influence of medium and temperature on nitrogen compounds concentration in the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli” and aimed to evaluate the nitrogen compounds of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli biomass when it was cultivated in fish effluent and BG11 medium in the different growth phases. The experiments were conducted at 10, 20 and 30°C to study the chemical composition and nitrogen compounds. The protein, ash and pigment concentration increased when temperature increased. Nevertheless, it was observed a lipid and carbohydrate reduction when the temperature increased. The ammonium ion and nucleic acids are an important fraction of the non protein nitrogen. The influence of the medium on nitrogen concentration as well as the protein determination by method of Kjeldahl overestimates the protein concentration in cyanobacteria. The fifth article intituled “Single cell protein production from fish processing effluent: predictive modeling and simulation” evaluated the production of single cell protein through the cultivation of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in the fish processing effluent. The growth data were fitted into four mathematic models (Logistic, Gompertz, modified Gompertz and Baranyi). The results showed that the Logistic model was considered the most appropriate to describe the microorganism growth. The predictive analysis showed the possibility to obtain 1,66, 18,96 e 57,36 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ of biomass in 1000 h continuous process for 10, 20 and 30°C, respectively.

INTRODUÇÃO

O porto pesqueiro de Rio Grande, situado no extremo sul do Brasil, concentra as suas atividades na pesca artesanal e industrial, realizadas na região e provenientes dos ambientes estuarino, lacunar, costeiro e alto-mar. O processamento de pescado resulta em considerável volume de efluente lançado ao meio ambiente e representa um grande desafio para o tratamento devido a sua complexidade química, uma vez que carrega consigo componentes estruturais da matéria-prima. Esses efluentes podem conter altas concentrações de compostos nitrogenados e fosforados, contribuindo para o processo de eutrofização dos corpos receptores, além dos riscos associados com a toxicidade (CARRERA, VICENT & LAFUENTE, 2004).

A qualidade e quantidade de emissão de nutrientes têm alterado significativamente os sistemas marinhos nas últimas décadas. Atividades tais como produção de fertilizantes, alimentos e energia fixam nitrogênio e fósforo a uma taxa similar ao da fixação biológica (YONG et al., 2006). Em função disso diversos países especificam padrões máximos de emissão destes componentes presentes nos efluentes para serem descarregados nos corpos receptores. No estado do Rio Grande do Sul, Brasil, os limites máximos permitidos são de 405 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹ e 1 mg.L⁻¹ para os parâmetros DQO (Demanda Química de Oxigênio), NTK (Nitrogênio Total Kjeldahl) e P-PO₄⁻³ (fósforo), respectivamente (BRASIL, 1990).

A utilização de cianobactérias no tratamento de efluentes tem demonstrado alta eficiência na redução de matéria orgânica e nutrientes, como nitrogênio e fósforo dissolvidos em despejos urbanos e industriais (MARTINEZ et al., 2000; NUÑEZ et al., 2001). Nesse processo a água residuária gerada pode ser reciclada após incorporação de seus nutrientes em uma biomassa com o propósito de redução da carga poluidora através da remoção de nutrientes e o uso da biomassa como fonte de proteína.

As cianobactérias são definidas como microrganismos procariontes que apresentam como metabolismo preferencial a fotossíntese, com produção de oxigênio livre de forma similar às algas eucarióticas e plantas superiores. Algumas linhagens apresentam metabolismo respiratório, o qual fornece a quantidade de energia necessária para a manutenção destes organismos no escuro a partir do consumo de substratos orgânicos (FAY, 1983; ANAND, 1998; XU et al., 2001). A biomassa destes microrganismos é considerada uma fonte rica de substâncias celulares, como proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos, com composições e

concentrações diversas, sendo que várias espécies contêm consideráveis concentrações de ácidos graxos insaturados e aminoácidos essenciais (SAHA et al., 2003; SANTOS et al., 2003; THAJUDDIN & SUBRAMANIAN, 2005; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008). Contudo, a composição química das cianobactérias e microalgas em geral pode variar de acordo com as condições de cultivo, tipo e estado fisiológico do microrganismo entre outros fatores (FIDALGO et al., 1998; FUENTES et al., 2000; SAHA et al., 2003; TOKUSOGLU & ÜNAL, 2003). Os resultados encontrados a partir da variação de parâmetros como temperatura, meio de cultura e fase de crescimento permitem a identificação de tendências gerais no crescimento e composição das culturas de microalgas e cianobactérias embora muitos efeitos sejam específicos da espécie em questão (LOURENÇO et al., 1997; FIDALGO et al., 1998).

Um dos problemas enfrentados no tratamento de efluentes por cianobactérias é a necessidade de separação da biomassa do meio de cultivo, uma vez que a permanência das células de cianobactérias no efluente poderá acarretar em rápido processo de deterioração. Esse processo é decorrente de sua própria natureza devido à sua alta concentração de nutrientes. Além disso possuem tamanho de partícula muito pequeno e uma carga negativa que previne a agregação das células em suspensão. A aplicação da técnica de coagulação/floculação seguido da secagem da biomassa é uma alternativa viável para a separação e conservação da biomassa de cianobactérias por ser eficiente e de baixo custo (GRIMA et al., 2003; KIM et al., 2005).

A *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma cianobactéria de representativa ocorrência ao redor da cidade de Rio Grande, RS. Apresenta um baixo tempo de geração quando cultivada no efluente de agroindústrias como da parboilização do arroz e do processamento de pescado e tem sido utilizada como elemento removedor de nutrientes dos efluentes das indústrias de alimentos com grande sucesso em pesquisas gerenciadas a nível laboratorial e piloto, assim como no aproveitamento das diversas substâncias presentes no efluente para a conversão em biomassa (QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; HORNES & QUEIROZ, 2004; QUEIROZ et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2007; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008). No entanto, seu comportamento no efluente do processamento do pescado, bem como seu potencial em produção de compostos celulares quando desenvolvida neste efluente não foi estudado. Em face disto, o trabalho teve por objetivo avaliar a aplicação da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no tratamento do efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas e a geração de compostos celulares.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Efluente do processamento de pescado

O pescado tem sido uma fonte de proteína animal na dieta humana. O consumo *per capita* de pescado tem aumentado nos últimos anos, passando de 4,7 kg em 1961 para 8,2 kg por pessoa em 2006. O aumento no consumo é devido principalmente ao entendimento que o pescado é uma alternativa saudável em comparação a outros produtos consumidos como fonte de proteína, como bovinos, ovinos e suínos. Para atender essa demanda a produção e processamento desse produto foi aumentado. De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (BRASIL, 2007) o desembarque de pescado no estado do Rio Grande do Sul em 2006 foi de 40797 toneladas. O aumento da produção se reflete no aumento do volume de efluente gerado. Neste tipo de processamento o efluente resulta principalmente da limpeza da fábrica e lavagem da matéria-prima nas etapas de corte e evisceração (ASPÉ et al., 1997; PARK et al., 2001; LIM et al., 2003).

Afonso & Bórquez (2002) reportam que uma planta de processamento de pescado gera, em média, $1100 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ de efluente, o qual contém alta concentração de matéria orgânica, a qual se distribui entre as épocas de maior captura, pois, enquanto em alguns meses a fábrica processa grande quantidade de matéria-prima, em outros trabalha somente com o que está estocado. Uma característica comum deste tipo de efluente é o conteúdo protéico diluído e, diferente de outros tipos de efluentes industriais, não contém materiais tóxicos ou carcinogênicos. De acordo com Aspé et al. (1997) o efluente produzido durante o descarregamento dos navios de pescado carrega consigo água do mar e gera alta carga orgânica. Segundo Contreras et al. (2000) e Lim et al. (2003) as fábricas de processamento de pescado geram efluentes com alto grau de poluição, os quais são comumente descarregados diretamente nas áreas costeiras, e representam um dos principais problemas ambientais detectados em regiões com tradição pesqueira.

Os efluentes são gerados em diversas etapas do processamento, tais como: recepção, evisceração, condensação nas câmaras frigoríficas, salmoura, acondicionamento em latas, cozimento, adição do óleo, recravamento das latas, lavagens das latas e lavagens para resfriamento. Além das águas de lavagens do pescado contribuem também as lavagens de pisos, tanques de salmoura, equipamentos e monoblocos onde são descarregados o pescado e utensílios manuais (WHEATON & LAWSON, 1985).

Os resíduos da industrialização do pescado geram efluentes que se caracterizam por apresentarem altos níveis de óleos e graxas e proteína, bem como concentrações de DQO e sólidos suspensos totais consideradas de médias a elevadas. A composição irá depender do tipo de processamento, das espécies processadas e do procedimento operacional. Em qualquer caso, eles deverão ser removidos, uma vez que flutuam e afetam a transferência de oxigênio para a água, podendo ainda se aglomerar nos dutos e reduzir a capacidade de escoamento ao longo do tempo. As gorduras, por exemplo, aderem às paredes, produzindo odores desagradáveis, formam uma camada de material flutuante, podendo interferir e inibir o desenvolvimento biológico (GONZALEZ, 1995; LUCAS, 1999; ACHOUR et al., 2000; JONES et al., 2001).

A produção de camarão utiliza grandes volumes de água em todas as etapas do processamento. A água é usada principalmente no descongelamento, lavagem, cozimento, transporte, descascamento, resfriamento e para limpeza e sanitização dos equipamentos e utensílios. No descascamento é gerado aproximadamente 80% do influente, sendo lançados em torno de $4 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ a $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ de água potável nos rolos que promovem o descascamento, mantendo-os resfriados e limpos. Nesta operação unitária ocorre a geração de uma água com grandes concentrações de matéria orgânica e sólidos suspensos, $1867 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $410 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente, uma vez que contém grandes quantidades de matéria orgânica, incluindo cabeças, cascas, sangue, tripas (conteúdo intestinal) pedaços de camarão e proteínas solúveis (CASANI et al., 2006).

Park et al. (2001) relatam que o processamento de siri resulta em níveis de DQO de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $5000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ proveniente da água utilizada na pré-lavagem, cozimento, separação e lavagem. Os resíduos contidos na casca, por exemplo, durante a lavagem com vapor liberam pigmentos que contém altas concentrações de materiais orgânicos, com predominância de proteínas solúveis.

Hornes & Queiroz (2004) caracterizaram o efluente oriundo de uma indústria de processamento de pescado local quanto aos parâmetros pH, DQO, NTK, N-NH_4^+ , P-PO_4^{3-} , Óleos e Graxas, Sólidos Sedimentáveis e Sólidos Suspensos, constatando-se grande variabilidade nos parâmetros analisados. Os valores médios de DQO, NTK e P-PO_4^{3-} encontrados foram $1900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Os autores verificaram ainda que grande parte da matéria orgânica é composta por óleos e graxas. Observou-se uma correlação de 0,93 entre os parâmetros DQO e óleos e graxas, o que demonstra que uma importante fração da matéria orgânica presente no efluente do

processamento de pescado é composta por óleos e graxas. No que se refere ao parâmetro sólidos voláteis, verificou-se que a concentração média desta variável compreende mais de dois terços dos sólidos totais presentes na água residuária, indicando que grande parte dos sólidos é material orgânico que se dissolve durante o processamento do pescado, fato este também constatado por LUCAS (1999) e LIM et al. (2003). Lucas (1999) obteve concentrações de 2627 mg.L⁻¹ a 4333 mg.L⁻¹ de sólidos voláteis na caracterização do efluente de pescado.

2 Tratamento de efluentes

Os efluentes são gerados a partir do uso da água nos processos industriais. O processamento de alimentos requer grandes volumes de água de qualidade variável, uma vez que esta é um componente significativo de muitos alimentos e pode tanto ser adicionada como um ingrediente, como fazer parte da matéria-prima. Pode ser utilizada como meio de transferência térmica, transporte e limpeza. De qualquer forma, durante o processamento a água carrega consigo diversos componentes, alterando suas características físico-químicas, como temperatura, cor odor, turbidez, pH, compostos químicos entre outros (BERARDINO et al., 2000; BURGESS et al., 2001; KIRBY et al., 2003).

Os efluentes das indústrias de alimentos apresentam grande variabilidade no que se refere à composição química, devido às diferentes matérias-primas e tipos de processamento empregados. Estes são caracterizados por alto conteúdo de sólidos suspensos totais e compostos facilmente biodegradáveis, como carboidratos, proteínas e óleos e graxas (ASPÉ et al., 1997; ACHOUR et al., 2000; BERARDINO et al., 2000; WANG et al., 2005).

O lançamento de efluentes sem o tratamento adequado pode causar um desequilíbrio ecológico de águas superficiais devido ao crescimento anormal de algas e por consequência a diminuição dos níveis de oxigênio resultando assim na morte de peixes e outros organismos aquáticos. Esse conjunto de fenômenos é conhecido por eutrofização (OBAJA et al., 2003; REYES-AVILA et al., 2004).

Os sistemas de tratamento de efluentes domésticos e industriais foram originalmente concebidos para remover matéria orgânica e sólidos. Após surgiu a preocupação em reduzir outros constituintes, como nutrientes e organismos patogênicos. Nesse sentido os processos modernos de tratamento de efluentes são empregados para remover os poluentes ou transformá-los quimicamente em compostos inofensivos de maneira a adequar o lançamento

da água residuária a uma qualidade desejada ou a um padrão de qualidade vigente (BAILEY & OLLIS, 1986; METCALF & EDDY, 1991).

Quando se planeja o tratamento de efluentes industriais é importante antecipar as características do efluente por diversos motivos, como prever se o mesmo atenderá aos limites legais, dimensionar unidades de pós-tratamento, prever impactos ambientais, entre outros. O tratamento que gera um efluente de alta qualidade acarreta um alto custo às empresas, o que as força a investigarem processos alternativos, os quais irão satisfazer os requerimentos da legislação e ao mesmo tempo requerer um menor investimento e custo operacional (RAMALHO, 1983; METCALF & EDDY, 1991).

Os níveis de tratamento podem ser classificados em preliminar, primário, secundário ou biológico e terciário (METCALF & EDDY, 1991). O tratamento preliminar visa à remoção de sólidos em suspensão grosseiros, como materiais de maiores dimensões e areia. O sistema de gradeamento, sedimentação e equalização são considerados etapas do tratamento preliminar e primário. O gradeamento é realizado através de uma unidade constituída de uma série de barras paralelas igualmente espaçadas. O material flutuante e a matéria em suspensão que for maior em tamanho que as aberturas das grades são retidos e removidos. O espaçamento entre as barras da grade varia de 2 cm a 10 cm, e a limpeza dos sólidos retidos na grade pode ser feita manualmente ou mecanicamente, através da instalação de equipamentos de remoção de sólidos. Na etapa de sedimentação a capacidade de carreamento da água é diminuída até que as partículas em suspensão decantem pela ação da gravidade e não possam mais ser levantadas pela ação de correntes (METCALF & EDDY, 1991). A neutralização dos despejos industriais pode ser realizada no tanque de equalização. Este procedimento é utilizado não só para evitar os lançamentos de águas ácidas ou alcalinas no corpo receptor, mas como medida de prevenção dos tratamentos complementares, como os tratamentos biológicos. Este processo tem ainda por finalidade amortecer as variações de escoamento de modo que uma taxa constante de escoamento seja alcançada (METCALF & EDDY, 1991; BERTOLA et al., 1999).

O tratamento secundário ou biológico tem como princípio utilizar a matéria orgânica dissolvida ou em suspensão, utilizando esse substrato como fonte de energia e para síntese celular. Microrganismos tais como bactérias, cianobactérias, fungos e protozoários transformam a matéria orgânica e nutrientes presentes no meio em metabólitos, água e novos microrganismos. Para o desenvolvimento e crescimento das bactérias, ocorrem simultaneamente dois processos: o catabolismo e o anabolismo. No catabolismo, o material

orgânico é utilizado como fonte de energia, sendo transformado em produtos estáveis, enquanto que, no anabolismo, o material orgânico é transformado e incorporado na massa celular (METCALF & EDDY, 1991; VON SPERLING, 1997).

Como complementação ao tratamento biológico pode ser utilizado um sistema de filtro, que se encarrega de reter a biomassa que possa ainda restar na saída do tanque de sedimentação. Hornes et al. (2004) avaliaram a eficiência de um filtro de brita disposto após o reator anaeróbio de uma indústria processadora de pescado, constatando 53,2% de remoção de sólidos sedimentáveis.

O tratamento terciário é aplicado para eliminar contaminantes que não foram afetados pelo tratamento primário e secundário, como nutrientes, patogênicos, compostos não biodegradáveis, metais pesados, sólidos inorgânicos dissolvidos e sólidos em suspensão remanescentes. A tecnologia de membranas, como osmose reversa, nanofiltração, ultrafiltração, embora esteja apresentando uma maior aceitação nos últimos anos, ainda é considerada de alto custo em comparação aos processos convencionais de tratamento de efluentes. Uma opção para a redução dos custos seria o uso de processos como coagulação/floculação e sedimentação em uma etapa anterior à filtração das membranas (METCALF & EDDY; 1991; VON SPERLING, 1996; ABDESSEMED & NEZZAL, 2002; GABELICH et al., 2002; ABDESSEMED & NEZZAL, 2005; KIM et al., 2005).

2.1 Tratamento biológico

O tratamento biológico de efluentes tem por objetivo remover os sólidos dissolvidos e estabilizar a matéria orgânica através da utilização dos compostos presentes no meio como substrato para o crescimento e a manutenção de microrganismos. Este processo permite o tratamento de grandes volumes transformando compostos orgânicos complexos tóxicos ou não em compostos simples, como CO_2 e H_2O ou CH_4 e CO_2 (LOW & CHASE, 1999; SUNG & SANTHA, 2003; UZAL et al., 2003; KOMOROWSKA-KAUFMAN et al., 2006).

Os processos biológicos podem ser divididos em aeróbios ou anaeróbios, dependendo da natureza do aceptor de elétrons. Nos aeróbios, que levam à formação de CO_2 e H_2O , o aceptor de elétrons é o oxigênio molecular. Nos anaeróbios, que degradam a CO_2 e CH_4 , o oxigênio molecular está ausente, sendo que algumas formas de carbono, enxofre e nitrogênio participam como aceptores de elétrons, como o íon nitrato (NO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}) e dióxido de

carbono (CO_2) (METCALF & EDDY, 1991; FREIRE et al. 2000; UZAL et al., 2003; KOMOROWSKA-KAUFMAN et al., 2006).

Os principais processos biológicos de tratamento são: oxidação biológica (aeróbia, como lodos ativados, filtros biológicos, valos de oxidação e lagoas de estabilização; e anaeróbia, como reatores anaeróbios de fluxo ascendente) e digestão do lodo (aeróbia e anaeróbia, fossas sépticas) (METCALF & EDDY, 1991; VON SPERLING, 1997).

As lagoas de estabilização apresentam-se como uma alternativa de tratamento de águas residuárias, pois se trata de um processo simples, com baixo custo operacional. Podem ser construídas em diferentes combinações e distribuições, dependendo dos padrões de qualidade esperados para o efluente final (SALTER et al., 1999; VON SPERLING, 2001; CAMPOS, GUERRERO & CÁRDENAS, 2002). Esse tipo de processo tem demonstrado excelente desempenho na remoção de poluição carbonácea e de coliformes fecais, mas com baixa eficiência quanto à remoção de nutrientes (CAMPOS, GUERRERO & CÁRDENAS, 2002).

Chernicharo et al. (1997) e Coolins et al. (1998) apresentam aspectos positivos e negativos do processo anaeróbio quando comparado ao processo aeróbio. Dentre os aspectos positivos, os autores destacam a estabilidade do processo biológico, redução de custos com tratamento e disposição do lodo - devido à baixa produção de biomassa - menores áreas de instalação requeridas, menor consumo de energia e potencialidade de utilização do gás metano como combustível. Dentre os aspectos negativos são destacados a partida lenta do processo, quando da ausência de inóculo, geração de maus odores e principalmente a qualidade do efluente inadequada para lançamento em corpos d'água.

O processo aeróbio de tratamento de águas residuárias consiste na degradação biológica de substâncias orgânicas complexas na presença de oxigênio livre. Nos processos de degradação de águas residuárias a matéria orgânica é oxidada a produtos finais para produzir energia para os processos vitais, tais como, locomoção e síntese de novas células. Na ausência de matéria orgânica passam a metabolizar suas reservas celulares (respiração endógena) para obter energia, transformando-se nos produtos finais (RAMALHO, 1983; METCALF & EDDY, 1991; UZAL et al., 2003).

Os microrganismos que têm importância nos processos de tratamento aeróbios necessitam, além de energia e fonte de carbono para a síntese celular, de alguns elementos inorgânicos tais como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e outros micronutrientes. Sua nutrição pode ser autotrófica ou heterotrófica, dependendo da sua fonte de alimento e de seus processos vitais (RAMALHO, 1983; METCALF & EDDY, 1991; OBAJA et al., 2003; RUIZ,

JEISON & CHAMY, 2003; MULKERRINS, DOBSON & COLLERAN, 2004; FONTENOT et al., 2007a).

Os processos biológicos unitários de tratamento procuram reproduzir, em dispositivos racionalmente projetados, os fenômenos biológicos observados na natureza, condicionando-os em área e tempo economicamente justificáveis. Os microrganismos são “confinados” para efetuar a degradação da matéria orgânica em unidades concebidas especificamente para esse fim. Essas unidades são denominadas de reatores biológicos ou biorreatores, que são projetados de maneira a tentar otimizar os processos e minimizar custos, para que se consiga a maior eficiência possível, respeitando-se as restrições impostas para proteção do corpo receptor e as limitações de recursos disponíveis. Dessa forma, a degradação ocorre de forma mais controlada e mais rápida que a observada em ambiente natural. Nos tanques os aeradores garantem o suprimento de oxigênio e agitação do meio de cultivo, responsável pela manutenção da biomassa e conseqüente melhoria no contato matéria orgânica e biomassa (VON SPERLING, 1997).

Os fatores ambientais e parâmetros de projeto devem ser observados de modo a propiciar condições adequadas a microbiota envolvida no tratamento. Fatores ambientais como pH, temperatura, requerimentos nutricionais e concentração de substrato têm grande influência no desenvolvimento dos microrganismos, mas parâmetros de projeto como tempo de retenção celular (θ_c), tempo de detenção hidráulica (TDH), concentração de oxigênio dissolvido (O_2), relação A/M (alimento/microrganismo), assim como a configuração do sistema, têm grande importância na concepção da estação de tratamento de efluentes. A disponibilidade de oxigênio irá influenciar os caminhos metabólicos utilizados pelas células (RAMALHO, 1983; METCALF & EDDY, 1991; BERTOLA et al., 1999; GALLUZO et al., 2001; CARRERA, VICENT & LAFUENTE, 2004; FONTENOT et al., 2007a).

De acordo com Von Sperling (1997), os processos de tratamento aeróbio são divididos em: a) Processos com crescimento suspenso: são os processos de tratamento biológico nos quais os microrganismos, responsáveis pela conversão da matéria orgânica ou outros constituintes das águas residuárias a gases e tecido celular, são mantidos em suspensão dentro do líquido sem nenhuma estrutura de sustentação; b) Processos com crescimento aderido: são os processos de tratamento biológico nos quais os microrganismos, responsáveis pela conversão da matéria orgânica ou outros constituintes das águas residuárias a gases e tecido celular, estão aderidos a um meio suporte que pode ser de material sólido natural (pedras,

areia, solo), ou material artificial (plástico, cerâmico). Esse tipo de processo também é conhecido como Processo de Leito Fixo.

O bioreator de membrana é uma tecnologia promissora para o tratamento e reciclagem de efluente devido à sua alta performance tais como a excelente e estável qualidade do efluente, possibilidade de atuar em alta taxa de carga orgânica, estrutura compacta assim como a diminuição do excesso de produção de lodo. O bioreator de membrana é uma modificação do sistema de lodo ativado convencional. Pela substituição do tanque de sedimentação de um processo convencional de lodo ativado por uma membrana de filtração, todos os microrganismos são retidos no bioreator e o tempo de detenção hidráulica se torna completamente independente do tempo de retenção do lodo, atingindo assim alta concentração de lodo com um curto tempo de detenção hidráulica (HUANG et al., 2000; LIU et al., 2005; WANG et al., 2005).

O sistema de lodos ativados foi desenvolvido em 1914 na Inglaterra por Ardem & Lockett (MECALF & EDDY, 1991). É o método mais aplicado no tratamento biológico de efluentes. Neste processo, uma suspensão de biomassa bacteriana (lodo ativado) é responsável pela remoção dos poluentes, devendo-se evitar a perda da biomassa ativa (lodo) produzidas no sistema e que, portanto, deve-se recirculá-las de modo a ser mantida a maior concentração possível de microrganismos ativos no reator aerado em relação ao volume de influente, a fim de acelerar a remoção do material orgânico das águas residuárias (METCALF & EDDY, 1991; RAMALHO, 1993; BERTOLA et al., 1999; CAMPOS et al., 2002; GERNAEY et al., 2004; FIKAR, CHACHUAT & LATIFI, 2005). Dependendo do projeto e da aplicação específica, uma planta de tratamento de efluentes por lodo ativado pode promover a remoção biológica de nitrogênio e fósforo, além da remoção de substâncias orgânicas carbonáceas (CARRERA, VICENT & LAFUENTE, 2004; GERNAEY et al., 2004; FIKAR, CHACHUAT & LATIFI, 2005; FONTENOT et al., 2007a).

As bactérias heterotróficas presentes no lodo oxidam o material orgânico transformando em gás carbônico e água, utilizando oxigênio dissolvido para tal. Isso ocorre se for mantido um fator de carga alimento/microrganismos (A/M) adequado para as condições do bioreator. Quando a concentração de substrato (alimento) for elevada, tem-se um fator de carga elevado, ocasionando uma pobre eficiência em sua remoção. Se houver uma redução adequada do fator de carga, haverá uma eficiência na remoção de matéria carbonácea. Porém, se esse fator de carga for muito reduzido devido à baixa concentração de substrato,

prevalecerá o mecanismo de respiração endógena característico de sistema de aeração prolongada (CARRERA, VICENT & LAFUENTE, 2004).

O lodo contém uma população microbiológica diversa e interativa consistindo de células, que podem se apresentar de forma isolada ou em aglomerados de células formando um floco ou biofilme. Estas células microbiológicas heterogêneas apresentam ciclos de vida e reprodução definidas pelo meio, com relações entre tipos diferentes de células sendo caracterizadas pelo comportamento simbiótico, cooperativo, agressivo e competitivo. Como resultado destas diferentes formas de comportamento, a população microbiológica é dinâmica e evolucionária. Microambientes formados na própria célula podem causar zonificação, promovendo ou inibindo o crescimento de classes diferentes de microrganismos. A habilidade das células de assimilar substrato será afetada pelo estágio em que este ciclo de vida se encontra (LOW & CHASE, 1999; GALLUZZO et al., 2001; CAMPOS et al., 2002; CARRERA, VICENT & LAFUENTE, 2004; FONTENOT et al., 2007a).

Nas plantas de lodo ativado tradicionais, o tempo de retenção de sólidos inertes é exatamente o mesmo que o da biomassa ativa, a qual corresponde ao tempo de retenção do lodo ou idade do lodo. Os sólidos inertes são provenientes em parte do influente e parcialmente produzidos pelo decaimento da biomassa. O aumento da idade do lodo não somente aumenta a quantidade de biomassa ativa, mas também a quantidade de sólidos inertes no reator. Na realidade, os sólidos inertes aumentam em uma taxa muito superior do que a biomassa autotrófica presente, especialmente quando a idade do lodo é particularmente longa, que é típico de uma planta de remoção de nitrogênio (BERTOLA et al., 1999; YUAN et al., 2000; KOMOROWSKA-KAUFMAN et al., 2006).

O principal componente do custo operacional total de uma planta de tratamento biológico de efluente por lodo ativado é constituído pela energia dissipada pelo sistema de aeração. O controle de oxigênio no sentido de evitar aeração excessiva e maximizar a taxa de conversão dos processos biológicos é, portanto, de grande importância uma vez que o decréscimo do período total de aeração reduz significativamente o custo operacional (FIKAR, CHACHUAT & LATIFI, 2005). A concentração de oxigênio dissolvido no reator influencia a nitrificação biológica, desnitrificação e remoção de fósforo. Enquanto que na nitrificação e na remoção de fósforo são necessárias altas concentrações, para a desnitrificação é verificada uma relação oposta (GALLUZZO et al., 2001; FIKAR, CHACHUAT & LATIFI, 2005; KOMOROWSKA-KAUFMAN et al., 2006).

Um dos parâmetros considerados mais críticos no processo de remoção de nitrogênio é a razão entre carbono e nitrogênio (C/N), uma vez que influencia diretamente a competição entre os microrganismos autotróficos e heterotróficos durante o crescimento (FDZ-POLANCO et al., 2000; CARRERA, VICENTE & LAFUENTE, 2004). Se há pouco nitrogênio presente, as bactérias não estarão aptas a produzir as enzimas necessárias para utilizar o carbono, e se há muito nitrogênio, particularmente na forma de amônia, poderá inibir o crescimento das bactérias (FONTENOT et al., 2007b). A competição entre microrganismos tem sido observada em vários processos de remoção biológica de nitrogênio, tais como os sistemas de imobilização da biomassa (FDZ-POLANCO et al., 2000). Da mesma forma que em sistemas convencionais, estes autores citam que em sistema de imobilização da biomassa a razão C/N causa competição entre a população microbiana e, portanto, define a composição do biofilme. De acordo com Komorowska-Kaufman et al. (2006) a razão C/N no efluente deve ser suficiente para denitrificar todo o nitrato que surge a partir do processo de nitrificação, e verificaram que a maior eficiência de nitrificação (acima de 95%) foi atingida quando a razão C/N foi menor que 4, e que valores maiores desestabilizaram o processo. Fontenot et al. (2007b) por outro lado, verificaram que a razão C/N 10 produziu os melhores resultados em termos de remoção máxima de nitrogênio e carbono, quando aplicado o reator de batelada sequencial no efluente oriundo do cultivo de camarão.

As substâncias contaminantes de águas, tais como compostos orgânicos e nitrogenados são assimilados pelos microrganismos para prover energia ou para ser utilizado na biossíntese, promovendo assim a remoção destes do meio em que se encontram. Os microrganismos empregados podem ser classificados de acordo como eles utilizam seus requerimentos nutricionais e esta classificação é baseada nas suas fontes de energia, carbono e acceptor terminal de elétron (LOW & CHASE, 1999). Os microrganismos são classificados nutricionalmente como heterotróficos se utilizarem como fonte de energia o carbono orgânico e o acceptor terminal de elétrons for oxigênio. No entanto, se utilizarem como fonte de energia compostos inorgânicos como NH_3 , H_2S e Fe^{2+} e acceptor de elétrons compostos orgânicos, nitrato ou sulfato são considerados microrganismos autotróficos (METCALF & EDDY, 1991; LOW & CHASE, 1999).

A performance do processo de lodo ativado depende das características de sedimentação do lodo gerado no reator. Os flocos no lodo deverão ser facilmente separados do efluente tratado no sedimentador e recirculados ao reator. Nos casos em que há o crescimento excessivo de microrganismos filamentosos é verificada a formação de flocos com

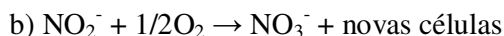
estruturas que tem uma influência negativa nas propriedades de sedimentação do lodo. Por outro lado, quando há a formação de flocos de lodo ativado com boas características de sedimentação, isto se reflete em um requerimento de menor área para sedimentação em sistemas contínuos ou então permite um tempo maior para a purificação biológica em sistemas descontínuos (ARROJO et al., 2004).

O processo de tratamento aeróbio por lodo ativado foi alvo de várias pesquisas ao longo dos anos, obtendo grandes avanços no que se refere à melhora do desempenho e estabilidade operacional, sendo apresentadas diferentes variações para o tratamento de efluentes domésticos e industriais. A adição do carvão ativado confere várias vantagens ao processo, tais como: estabilidade ao sistema durante choques de carga, remoção de cor e amônia, melhora a sedimentabilidade do lodo, além de reduzir a inibição biológica causada por compostos orgânicos tóxicos (COSTA et al., 2003; SARKAR et al., 2006). Costa et al. (2003) combinaram o uso de carvão ativado em pó ao processo de lodo ativado, adicionando-o diretamente ao tanque de aeração, com o objetivo de promover simultaneamente a oxidação biológica e adsorção física. Observaram-se remoções superiores a 90 e 10% de N-NH_4^+ e fósforo totais, respectivamente, e remoções significativas de Zn, Cu e Ni. Além disso, foi constatada a melhora na qualidade do lodo, o qual foi muito menos sensível aos compostos tóxicos presente no efluente que o processo de lodo ativado convencional.

A mais importante fonte de distúrbios operacionais é causada pelo influente. As suas características são grandes variações tanto no que se refere à composição como a taxa de escoamento. Outras importantes fontes de distúrbios são as chuvas, que podem causar sérios incidentes pela sobrecarga do sistema, ou em função do inverno, quando a taxa de crescimento da biomassa é inibida seriamente pelas baixas temperaturas (FIKAR, CHACHUAT & LATIFI, 2005). Segundo Mulkerrins, Dobson & Colleran (2004), para que uma remoção biológica de fósforo ocorra com sucesso o fluxo de influente deve ser mantido tão estável quanto possível e apresentando mínimas flutuações, devendo ser evitadas as modificações drásticas repentinas.

O processo de remoção biológica de nitrogênio é freqüentemente utilizado no tratamento de efluentes urbanos e industriais. Este processo envolve dois estágios: (1) A nitrificação, em que inicialmente a amônia é convertida a nitrito e em um segundo passo o nitrito é convertido a nitrato e (2) No processo de desnitrificação ocorre a transformação subsequente do nitrato a nitrito e então a óxido nitroso e óxido nítrico e finalmente convertido a gás nitrogênio, cada etapa consumindo DQO. Conforme é mostrado na 3ª etapa da reação,

pode ser utilizado como fonte de carbono externo o metanol (CAMPOS et al., 2002; RUIZ, JEISON & CHAMY, 2003).



Komorowska-Kaufman et al. (2006) estudaram o efeito da temperatura e idade do lodo na remoção biológica de nitrogênio quando utilizado o sistema de lodo ativado. Os autores verificaram que na faixa de 7,8 a 21°C a condição mais favorável para a nitrificação ocorreu na temperatura de 15°C, e que o aumento da idade do lodo melhorou o processo, principalmente nas menores temperaturas.

A remoção biológica de fósforo em efluentes é baseada no enriquecimento do lodo ativado com microrganismos acumuladores de fósforo. A remoção explora o potencial de algumas espécies de microrganismos de acumularem fosfato (como polifosfato intracelular) em excesso do seu metabolismo normal. O processo de remoção biológica de fósforo é caracterizado pela circulação do lodo ativado através de fases anaeróbicas e aeróbicas. Na fase anaeróbica, devem estar disponíveis fontes carbonadas facilmente biodegradáveis, tais como ácidos graxos voláteis, os quais induzem as bactérias removedoras de fósforo a assimilarem os ácidos e liberarem fosfato ao meio. Na fase aeróbica ocorre a penetração do fósforo na célula, a qual resulta em taxas globais de remoção entre 80-90% (MULKERRINS, DOBSON & COLLERAN, 2004). De acordo com Metcalf & Eddy (1991), a incorporação de uma fase anóxica no processo de tratamento biológico de efluentes permite a remoção combinada de nitrogênio e fosfato.

Uma alternativa ao processo de lodo ativado convencional seria o sistema por batelada (RBS – Reator de Batelada Seqüencial), o qual apresenta a vantagem de incorporar períodos aeróbicos e anaeróbicos alternados para realizar as etapas de nitrificação e desnitrificação em um único tanque (OBAJA et al., 2003; KARGI et al., 2005; MOHAN, RAO & PRASAD, 2005; FONTENOT et al., 2007a). Esse processo difere de outras tecnologias utilizadas no tratamento biológico de efluentes principalmente no que se refere à variação do volume do reator com o tempo, enquanto que nos demais sistemas de fluxo contínuo o volume

permanece constante (MOHAN, RAO & PRASAD, 2005). As operações passam a ser simplesmente seqüências no tempo, e não unidades separadas como ocorre nos reatores convencionais de fluxo contínuo. O processo consiste de um reator de mistura completa onde ocorrem todas as etapas do tratamento. Isso é conseguido através do estabelecimento de ciclos de operação com durações definidas. A massa biológica permanece no reator durante todos os ciclos, eliminando dessa forma a necessidade de decantadores separados e das elevatórias de recirculação de lodo. O ciclo de operação de um RBS consiste das etapas de enchimento, reação, sedimentação, descarga e repouso (VON SPERLING, 2001; KARGI et al., 2005; MOHAN, RAO & PRASAD, 2005).

2.2 Cianobactérias

As cianobactérias estão enquadradas como algas verde-azuladas. Estes microrganismos são fotossintetizantes e, associada a esta capacidade, algumas linhagens possuem a faculdade de fixar nitrogênio atmosférico, conferindo a estes organismos as necessidades nutricionais mais simples de todos os seres conhecidos (FAY, 1983; OGBONNA & TANAKA, 2000; OLGUÍN et al., 2001; RANGEL-YAGUI et al., 2004; THAJUDDIN & SUBRAMANIAN, 2005). As cianobactérias possuem mecanismos bioquímicos especializados para acessar nutrientes essenciais (nitrogênio, fósforo e ferro) que freqüentemente limitam o crescimento de outros microrganismos presentes no meio (SAHA, UMA & SUBRAMANIAN, 2003).

As cianobactérias são microrganismos procariontes, de forma indefinida e são a fonte primária de alimentação para a vida aquática. Os principais fatores que parecem determinar o crescimento das populações de cianobactérias, tanto no solo como em culturas de laboratório são: a luz, temperatura, pH, concentração do inóculo, concentração de nutrientes e a presença de solutos orgânicos (BRIAND et al. 2002). Segundo Jefferson et al. (2001), os nutrientes necessários são carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e elementos traços como cobalto, molibdênio, manganês e vitaminas.

O rápido crescimento destes microrganismos é constatado algumas vezes em lagos e reservatórios, causando problemas de forte odores exalados quando estes se apresentam em altas densidades, além de prejudicar a estética do ambiente e matar a biota aquática devido a condições associadas com a senescência destes microrganismos, como por exemplo, a

associação de oxigênio dissolvido e altas concentrações de amônia, e a produção de toxinas (HAVENS et al., 2003).

As cianobactérias e microalgas marinhas são largamente utilizadas como alimento de alevinos, larvas de crustáceos e peixes marinhos, assim como para rotíferos e camarão do mar. O requerimento de proteína varia de espécie para espécie, sendo que em algumas fica em torno de 12%, mas na maioria das espécies a faixa ótima é de 30-60% (RENAUD et al., 2002).

O carbono e nitrogênio são considerados os elementos nutricionais mais importantes no cultivo de microrganismos. De acordo com Shi et al. (1999) em cultivos heterotróficos as fontes carbonadas presentes no meio são rapidamente exauridas, sendo necessário então determinar a concentração máxima que possa ser utilizada de forma a não causar inibição e que estenda o período de crescimento nos cultivos em batelada. No que se refere ao nitrogênio, este é um elemento essencial para a síntese de aminoácidos primários e secundários, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas, clorofila e outros pigmentos fotossintéticos acessórios. A sua disponibilidade é o fator chave na regulamentação da produtividade, desta forma influenciando a composição das espécies de uma determinada área e a sua sobrevivência e manutenção em habitats marinhos (ZEHR & WARD, 2002; SAHA, UMA & SUBRAMANIAN, 2003). Dependendo do gênero o íon amônio é indicado como melhor fonte de nitrogênio do que o nitrato (HERRERO et al., 2001; LUQUE et al., 2004; VON RÜCKERT & GIANI, 2004). No entanto, SHI et al. (2000) estudaram o efeito de nitrato, amônio e uréia no crescimento e produção de luteína da microalga *Chlorella protothecoides*, e obtiveram concentrações máximas de biomassa e produtividade de luteína quando foi utilizada uréia como fonte de nitrogênio. De qualquer forma, o consumo tanto de nitrato como amônio causa uma grande modificação no pH médio durante o crescimento das culturas, sendo desejável manter o pH relativamente constante durante o cultivo (SHI et al., 2000; VOLTOLINA et al., 2005).

Nas cianobactérias, os pigmentos absorvedores de luz são a clorofila, carotenóides e ficobiliproteínas, e a concentração destes pigmentos varia com as condições ambientais (TING et al., 2002). Este último é um grupo de proteínas intensamente coloridas que ocorrem na *Cyanophyceae*, *Rhodophyceae* e *Cryptophyceae* somente, os quais podem ser subdivididas em três grupos principais de acordo com a sua estrutura: ficocianinas (azul), aloficocianinas (azul) e ficoeritrina (vermelho). Uma vez que a ficocianina e aloficocianina estão sempre presentes na *Cyanophyceae* e *Rhodophyceae*, a ficoeritrina pode estar ausente no primeiro

(*Cyanophyceae*). As cianobactérias contêm somente clorofila *a* e quase 50% da luz requerida é capturada pelas ficobiliproteínas (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

A maior parte da energia luminosa utilizada por qualquer organismo fotossintético é absorvida por uma coleção de pigmentos acessórios, uma vez que a clorofila *a* absorve a energia luminosa somente em uma limitada região do espectro solar. A energia de excitação é então transferida para os centros de reação localizados na membrana fotossintética, iniciando o processo fotossintético. Os pigmentos fotossintetizantes estão localizados nos tilacóides, onde ficam livres no citoplasma, ao invés de estarem inclusos nos cloroplastos, como nos organismos eucarióticos fotossintetizantes. Os tilacóides não estão empilhados, permanecendo isolados e equidistantes no interior da célula (HOEK, MANN & JAHNS, 1995).

A síntese da ficocianina é influenciada pelas condições de cultivo, especialmente pela luz (qualidade e quantidade) e o conteúdo de nitrogênio no meio. Olvera-Ramírez et al. (2000) constataram que o maior conteúdo de ficocianina encontrada na cianobactéria *Calohrix sp.*, quando comparados meios contendo diferentes concentrações de nitrato, ocorreu no tratamento sem nitrato.

As cianobactérias são particularmente atrativas como fonte de substâncias químicas de alto valor comercial, tais como ácidos graxos poliinsaturados, moléculas bioativas, ficobiliproteínas e polissacarídeos (OLVERA-RAMÍREZ et al., 2000; MORENO et al., 2003; TORRE et al., 2003; RANGEL-YAGUI et al., 2004; TANG et al., 2007). Muitas espécies podem até mesmo ser induzidas a acumular diferentes tipos de reservas que podem ser usadas como fontes de pigmentos, lipídios, vitaminas ou proteínas (OLVERA-RAMÍREZ et al., 2000; PIVOKONSKY, KLOUCEK & PIVOKONSKA, 2006). As cianobactérias assim como outros microrganismos respondem a modificações do ambiente em que vivem com adaptações fisiológicas geneticamente programadas. Vários são os efeitos do meio ambiente que produzem tais consequências bioquímicas nas cianobactérias, podendo ser citados a baixa temperatura, aumento da salinidade e dessecação (MORI et al., 2003). Ultimamente interesse tem surgido em relação às propriedades farmacológicas de substâncias presentes na biomassa de *Spirulina*, como o ácido γ -linolênico e polissacarídeos. São citados efeitos na estimulação do sistema imunológico e da microbiota intestinal, contra hiperlipidemia, hipercolesterolemia, tumor bucal, hipertensão, efeitos tóxicos de radiações, obesidade e diabetes, atribuindo um conjunto de propriedades que dificilmente podem ser encontradas em um único produto natural (ARAÚJO, FACCHINETTI & SANTOS, 2003). A extração de pigmentos tem despertado o interesse na utilização como corantes naturais especialmente em cosméticos,

pigmentação de tecidos e alimentos, como na fabricação de produtos lácteos, geléias, gomas de mascar entre outros (SHI et al., 2000).

O valor da biomassa está usualmente relacionado com o conteúdo de proteína, ainda que outros constituintes estejam ganhando um significativo aumento para determinar o valor nutricional dos alimentos ou suplementos, como a fração lipídica e o conteúdo total e qualidade dos ácidos graxos (BOROWITZKA, 1994; KIM & LEE, 2000; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; TORRE et al., 2003; VOLTOLINA et al., 2005; PIVOKONSKY, KLOUCEK & PIVOKONSKA, 2006).

Belarbi, Molina & Chisti (2000) estudaram um processo de alta produtividade e recuperação do ácido graxo poliinsaturado eicosapentaenóico a partir de microalgas. Foi recuperado um conteúdo de extrato cru acima de 70% do ácido eicosapentaenóico para as microalgas *Monodus subterraneus* e *Phaeodactylum tricornutum* com purezas acima de 90%. O processo consistiu das seguintes etapas: (1) extração e transesterificação simultânea da biomassa; (2) cromatografia por coluna de sílica-gel do extrato cru e (3) remoção de pigmentos através de uma segunda coluna cromatográfica.

O aumento na concentração da biomassa é relacionado com a velocidade específica de crescimento e a concentração do inóculo, os quais normalmente estão associados a três parâmetros: concentração inicial do substrato limitante, velocidade de crescimento específica máxima e taxa de remoção específica do substrato (CONTRERAS et al., 2000). A biomassa produzida possui elevado valor nutritivo devido ao alto teor de proteínas, perfil de aminoácidos essenciais, onde lisina, leucina e valina possuem concentrações superiores às recomendadas pela FAO/WHO (1985), além da composição de vitaminas, carboidratos e lipídeos (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, um microrganismo de ocorrência natural nos corpos hídricos adjacentes à cidade do Rio Grande, tem se destacado entre as inúmeras espécies existentes como uma alternativa viável para a remoção de matéria orgânica e nitrogênio de efluentes e na produção de proteínas unicelulares (QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2007; JACOB-LOPES et al., 2006; JACOB-LOPES et al., 2007; ZEPKA et al., 2008).

Queiroz, Koetz & Treptow (2001) avaliaram o potencial de produção de proteína unicelular a partir da água de maceração do arroz parboilizado por *Aphanothece microscopica* Nägeli, quando esta é inoculada a 28°C, por um período de 96 h. Foram registrados máximos de remoção de DQO (89,47%) e nitrogênio (70,41%) em 24 h de cultivo e o valor médio em

teor de proteína de 38,80% neste período. Demonstrou-se a partir desses resultados a viabilidade da utilização de *Aphanothece microscopica* Nägeli no tratamento de efluentes e na produção de proteína unicelular.

Queiroz et al. (2002) utilizaram a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli na remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da indústria de parboilização do arroz, com inóculos de 300 mg.L⁻¹ e temperatura de 35°C, obtendo máximos de remoção em 24 horas de cultivo. Quanto à cinética de crescimento, foi registrado um baixo tempo de geração (2,89 h) da *Aphanothece* desenvolvida no efluente em comparação ao meio padrão BG11 (23,36 h), o qual utiliza nitrato como fonte de nitrogênio.

Queiroz et al. (2004) caracterizaram o concentrado protéico obtido a partir da biomassa desidratada da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. O concentrado protéico apresentou uma concentração de 60% de proteína, com máximas solubilidade e capacidade emulsificante de 80% e 302 mL g⁻¹ de proteína, respectivamente.

Queiroz et al. (2004a) 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 hidráulico de 72 h. O perfil bioquímico da biomassa apresentou 43,73% de proteína, 17,81% de carboidratos, 8,0% de lipídeos.

Queiroz et al. (2005) determinaram a composição bioquímica da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em função do perfil de aminoácidos e ácidos graxos presentes na biomassa gerada a partir do efluente do processo de parboilização do arroz. Os resultados demonstraram que a *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente da parboilização do arroz apresenta predominância em ácidos graxos insaturados e a presença de todos os aminoácidos essenciais, o que caracteriza esta biomassa como um alimento alternativo para a utilização na dieta alimentar.

Queiroz et al. (2007) obtiveram 37,71% de proteína unicelular na biomassa utilizando inóculos da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli de 300 mg.L⁻¹ a 35°C no efluente da parboilização do arroz.

2.2.1 Tratamento de efluentes por cianobactérias

O uso de microalgas e cianobactérias em geral no tratamento de efluentes foi sugerido há vários anos devido à sua habilidade para remover com baixo custo o excesso de nutrientes

e outros contaminantes, como nitrogênio dissolvido e fósforo de despejos urbanos e industriais, os quais são responsáveis por causar a eutrofização e poluição dos corpos receptores (De La NOÛE et al., 1992; BLIER et al., 1996; TAM & WONG, 2000; LEE & KIM, 2001; QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; JACOB-LOPES et al., 2007; TRAVIESO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007).

As cianobactérias possuem uma carga superficial negativa e, portanto, alta afinidade com íons de metais pesados, o que as torna especialmente efetivas na remoção desses componentes tóxicos tanto no que se refere à adsorção química passiva como a assimilação por processos metabólicos (WANG et al., 1998; BASHAN et al., 2002; EL-SHEEKH et al., 2005; MOHAN, RAO & PRASAD, 2005). Wang et al. (1998) estudaram a capacidade de adsorção de cinco metais por *Phormidium* em diferentes concentrações de pH. Os autores observaram que a cianobactéria poderia reduzir a concentrações dos metais a níveis muito baixos ($<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) em 60 min de cultivo. Nesse contexto, El-Sheekh et al. (2005) estudaram a aplicação das cianobactérias *Nostoc muscorum* e *Anabaena subcylindrica* na remoção de metais do efluente de indústrias processadoras de papel, soda e de drenagem de sal. Verificou-se que os microrganismos são capazes de removerem 12,5-81,8% de cobre, 11,8-33,7% de cobalto, 26,4-100% de chumbo e 32,7-100% de manganês, observando ainda que a eficiência de absorção irá depender do estado fisiológico das células, disponibilidade e concentração do metal pesado e composição química do efluente.

Os efluentes 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 são suficientes para promover o crescimento destes microrganismos (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). Blier et al. (1996) estudaram o crescimento e remoção de nitrogênio amoniacal pela cianobactéria *Phormidium bohneri* cultivada no efluente gerada pela indústria de laticínios. Os autores registraram uma velocidade específica de crescimento máxima e concentração de biomassa de $0,58 \text{ d}^{-1}$ e 565 mg.L^{-1} , respectivamente, após 16 d de cultivo.

Gonzáles et al. (1997) avaliaram a eficiência de remoção de amônia e fósforo no tratamento secundário do efluente da agroindústria por *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus dimorphus*. Os autores concluíram que a microalga em estudo poderia ser uma boa opção

como tratamento terciário na remoção desses componentes, verificando uma maior eficiência na remoção de amônia e moderada eficiência para o fósforo quando comparado com as cianobactérias *Phormidium* e *Spirulina*.

A remoção de diferentes formas de nitrogênio pode ser evidenciada por outros autores, como no trabalho desenvolvido por TAM & WONG (2000), que verificaram absorção celular de nitrato e amônia por *Chlorella vulgaris* ao utilizar o efluente sintético similar ao proveniente do tratamento secundário de uma estação de tratamento municipal.

Travieso et al. (2006) estudaram o efeito da concentração inicial de matéria orgânica contida no efluente de dejetos de porcos em culturas de *Chlorella vulgaris* para sistemas de batelada, verificando o aumento da remoção de DQO e crescimento microbiológico até a concentração máxima de 800 mg.L⁻¹. Neste processo foram atingidas remoções de 50-60% para as concentrações iniciais de 400 mg.L⁻¹ a 800 mg.L⁻¹ de matéria orgânica.

Martínez et al. (2000) estudaram a remoção de fósforo e nitrogênio pela microalga *Scenedesmus obliquus* no efluente doméstico em cultivos com e sem sistema de agitação e diferentes condições de temperatura (20 a 35°C), e verificaram que os melhores resultados ocorreram nos cultivos com agitação a 25°C, apresentando remoções de 98% em 94,3 h e 100% em 188,3 h para os parâmetros fósforo e amônia, respectivamente.

A remoção de nitrogênio em efluente artificial pela microalga *Scenedesmus obliquus* foi avaliada por VOLTOLINA et al. (2005). As condições experimentais foram diluições diárias de 30 e 40% e temperaturas de 25,5 e 17°C durante os horários diurnos e noturnos, respectivamente. Nestas condições os autores observam uma produção de biomassa de 39,3 mg.L⁻¹.d⁻¹, sendo que 43,7% de nitrogênio removido foi reciclado pela microalga em proteínas e outros compostos orgânicos nitrogenados. Contudo, esta eficiência diminuiu para 26,4% quando a diluição foi aumentada para 40%, com uma produtividade de 25,2 mg.L⁻¹.d⁻¹.

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 podem ser evitados com a mistura completa do meio de cultivo. A homogeneização impede a sedimentação das células e aumenta a eficiência da utilização de luz na cultura (CRAGGS et al., 1997; MARTÍNEZ et al., 2000).

Um campo em fase inicial de pesquisa são as interações entre microalgas e cianobactérias com outros microrganismos no tratamento de efluentes. Gonzalez & Bashan (2000) estudaram a associação da microalga *Chlorella vulgaris* com a bactéria *Azospirillum brasilense*, verificando-se um aumento significativo do crescimento e de produção de

pigmentos. Da mesma forma, Bashan et al. (2002) avaliaram o crescimento da microalga *C. vulgaris* associada com a bactéria *A. brasilense* em efluente sintético a 30°C e observaram o aumento significativo da remoção de N-NH_4^+ (93%) e P-PO_4^{-3} (73%) quando comparado com a atuação da microalga sem a bactéria (53% de remoção de N-NH_4^+ e acúmulo de P-PO_4^{-3}) em 48 h de cultivo, com concentrações iniciais de P-PO_4^{-3} e N-NH_4^+ de 12 mg.L^{-1} e 3 mg.L^{-1} . Por outro lado, a coimobilização da microalga *C. vulgaris* com a bactéria *Phyllobacterium myrsinacearum* modificou o metabolismo da microalga, mas não realçou o seu crescimento (LEBSKY et al., 2001).

Bastos et al. (2004) caracterizaram o efluente da parboilização do arroz quanto ao teor de ácidos voláteis totais e DQO, sendo registradas concentrações médias de 645 mg.L^{-1} e 3787 mg.L^{-1} , respectivamente. A razão C/N média registrada para esse efluente foi de 73,8, maior do que a requerida para o desenvolvimento destes microrganismos, em que a literatura indica um valor de $\text{C/N} = 20$ (FAY et al., 1983; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007). Nesse sentido foram realizados estudos visando a utilização da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no tratamento de efluente da parboilização do arroz com o duplo propósito de remover os componentes presentes no meio e produção de proteína unicelular (BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008).

Bastos et al. (2004a) estudaram o cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da parboilização do arroz na ausência de luz, 30°C e inóculos de 100 mg.L^{-1} . As variáveis cinéticas de crescimento demonstraram a viabilidade da aplicação da *Aphanothece* no efluente da parboilização arroz, sendo obtidas altas concentrações celulares (650 mg.L^{-1}) em 72 h de cultivo. Nas mesmas condições, Queiroz et al. (2007) verificaram que as máximas eficiências de remoção para as variáveis DQO e NTK ocorreram em 15 h de cultivo, com valores de 83,4 e 72,7%, respectivamente.

A bioconversão dos resíduos contidos no efluente da parboilização do arroz pode ser constatada nos trabalhos de JACOB-LOPES et al. (2006) e ZEPKA et al. (2008). O perfil aminoacídico mostrou teores superiores aos recomendados pelo padrão 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 solubilidade protéica e capacidade emulsificante, respectivamente (JACOB-LOPES et al., 2006). O perfil bioquímico indicou predominância de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente o ácido gama linolênico (ZEPKA et al., 2008).

2.3 Produção e separação de biomassa

A maioria dos processos industriais utilizados na produção de microalgas estão baseados em tecnologias que utilizam tanques abertos, porém a incapacidade em controlar os fatores ambientais é o maior problema a ser resolvido e que limita seu desenvolvimento (CHEN, 1996; SHI et al. 2000). Uma alternativa viável seria o desenvolvimento de tecnologias de culturas heterotróficas empregando fermentadores industriais, visto que muitas espécies de microalgas e cianobactérias têm mostrado a habilidade de utilizar açúcares e outros compostos orgânicos como fonte de energia e carbono celular no escuro, tendo como vantagens a possibilidade de cultivo em regime contínuo e a rápida multiplicação dos microrganismos (OGBONNA & TANAKA, 2000; BASHAN et al., 2002; QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004; RANGEL-YAGUI et al., 2004; ASLAN & KAPDAN, 2006; JACOB-LOPES et al., 2006; JACOB-LOPES et al., 2007; QUEIROZ et al., 2007).

Shi et al. (1999) investigaram o efeito da concentração inicial de glicose na produção de biomassa de *Chlorella protothecoides*. A concentração máxima de biomassa aumentou de 4,9 g.L⁻¹ a 31,2 g.L⁻¹ de células secas como o aumento da concentração inicial de glicose de 10 g.L⁻¹ para 80 g.L⁻¹. Os autores constataram ainda que a maior concentração inicial de glicose utilizada (100 g.L⁻¹) resultou em baixa concentração de biomassa, uma baixa velocidade específica de crescimento e uma fase lag consideravelmente longa, devido provavelmente a inibição pelo substrato.

A biomassa das cianobactérias e microalgas em geral, assim como as leveduras, têm sido estudadas na utilização como alimento de larvas de peixes e crustáceos nos seus diversos estágios de crescimento, uma vez que a produção industrial de proteínas provenientes de organismos unicelulares não tem atingido grandes proporções. Porém, as cianobactérias apresentam algumas vantagens na dieta para aquicultura, pois apresentam maior digestibilidade da parede celular e são ricas em proteínas, carotenóides e vitaminas (KIM & LEE, 2000).

Aproximadamente vinte e duas companhias no mundo produzem biomassa de *Spirulina*, e o principal destino de seus produtos são lojas de produtos naturais e farmácias, onde a biomassa seca é vendida como suplemento alimentar, além da alimentação animal e extração de pigmentos para uso em alimentos no Japão (ARAÚJO, FACCHINETTI & SANTOS, 2003).

A produção de biomassa a partir de microrganismos fotossintéticos e/ou heterotróficos, do ponto de vista de bioprocesso, devem possuir algumas características em comum. O processo deve ser contínuo para manter a produtividade durante todo o tempo, devem ser utilizados bioreatores homogêneos para prover as mesmas condições de crescimento a todas as células. Além disso, os reatores devem estar conectados a uma unidade de recuperação na qual a biomassa pode ser concentrada e separada do resto do meio, principalmente em relação aos sais e compostos carbonados e nitrogenados presentes em solução. O tratamento físico da biomassa deve ser realizado de acordo com o produto final desejado (alimento sólido ou líquido) e promover a eliminação de qualquer patógeno com potencial de introdução durante o cultivo ou na estocagem (MORIST et al., 2001).

Ao final do período de cultivo a biomassa deve ser separada do meio de cultura e processada rapidamente ou pode deteriorar em poucas horas (GRIMA et al., 2003). O método escolhido para promover a separação da biomassa deve ser capaz de processar os grandes volumes utilizados na produção desse componente. Esta pode ser separada por centrifugação, filtração ou em alguns casos sedimentação simplesmente pela ação da gravidade. A recuperação por filtração é considerada insatisfatória devido a ser um procedimento relativamente lento. A sedimentação, geralmente auxiliada pela floculação, é considerada uma boa escolha e tem sido aplicada na recuperação de biomassa quando aplicada na depuração de efluentes. Vários métodos de floculação podem ser utilizados para agregar as células e aumentar o tamanho de partícula e, portanto, facilitar o processo de sedimentação, centrifugação ou filtração (GRIMA et al., 2003; KIM et al., 2005).

A recuperação da biomassa pode ser um problema devido ao pequeno tamanho de partícula das células das cianobactérias. Além disso, as culturas geralmente se apresentam de forma relativamente diluídas ($< 0,5 \text{ kg.m}^{-3}$ biomassa seca) e, portanto, é necessário manipular grandes volumes para recuperar a biomassa (GRIMA et al., 2003).

A carga superficial negativa presente nas células de cianobactérias pode ser neutralizada ou reduzida pela adição de agentes floculantes tais como cátions multivalentes no meio. Esses agentes devem apresentar baixo custo, atóxicos e efetivos mesmo em baixas concentrações. Os sais comumente usados incluem cloreto férrico (FeCl_3), sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). A eficiência da coagulação por íons metálicos aumenta com o aumento da carga iônica (KIM et al., 2005).

A eficiência da separação depende de muitos fatores, incluindo a carga elétrica da molécula, a dose utilizada, a concentração da biomassa, o pH e a extensão da mistura do meio de cultivo (GRIMA et al., 2003).

2.4 Composição química

A composição química de cianobactéria fornece uma informação básica sobre o seu potencial nutricional. A determinação das concentrações dos compostos principais torna-se importante para determinar se o microrganismo em questão pode ser utilizado como alimento para a nutrição humana (MORIST et al., 2001).

2.4.1 Proteínas

Proteínas unicelulares são aquelas extraídas de organismos unicelulares que compreendem fungos, leveduras, bactérias e algas unicelulares e particularmente cianobactérias. O termo proteína unicelular foi definido no Instituto Tecnológico de Massachusetts em 1966, referindo-se a biomassa microbiana como alimento ou aditivo (CRUEGER & CRUEGER, 1993; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; QUEIROZ et al., 2001).

As cianobactérias são consideradas como uma fonte potencial de proteínas devido aos altos teores apresentados, geralmente entre 40 e 60% em peso seco. A proteína nestes microrganismos tem recebido atenção mundial tanto no que se refere à utilização como suplemento alimentar como uma fonte alternativa de proteína. Algumas espécies do gênero *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Anabaena* e *Nostoc* são consumidas em várias partes do mundo, como Chile, México, Espanha, Peru, Índia e Filipinas (JIMÉNEZ et al., 1999; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; JIMÉNEZ et al., 2003; THAJUDDIN & SUBRAMANIAN, 2005; SPOLAORE et al., 2006).

A rápida reprodução dos microrganismos e a utilização de fontes baratas de energia e de nutrientes para a sua multiplicação estão entre as vantagens de produção de proteínas unicelulares. Evidentemente que isto se faz às custas do meio em que os microrganismos se desenvolvem, podendo ser constituído de substratos dos mais variados, alguns de baixo custo, incluindo resíduos agrícolas ou industriais, os quais resolveriam problemas de ordem ambiental, servindo ainda para a produção de insumos. Os microrganismos devem apresentar

excelente capacidade de conversão dos substratos presentes no meio em biomassa (LEE & KIM, 2001; NIELL, JIMENÉZ & COSSÍO, 2003). A reciclagem dos componentes presentes nos efluentes industriais não somente reduziriam o problema de poluição ambiental como também serviriam como uma fonte potencial de carbono e energia para a produção de proteína unicelular a um custo reduzido (LEE & KIM, 2001; RAJOKA et al., 2006).

A avaliação da qualidade protéica dos alimentos é fundamental para a determinação do potencial nutritivo desta matéria-prima, e pode ser realizada a partir do levantamento dos aminoácidos resultantes da hidrólise da matriz alimentícia, além da identificação das porções protéicas que a contém. Estas avaliações denominam-se métodos químicos, e fornecem em geral as primeiras informações sobre o valor nutritivo dos alimentos em vários níveis de detalhamento (SGARBIERI, 1996).

A primeira função da proteína na dieta é suprir o organismo com um balanço de aminoácidos em quantidades adequadas para a síntese e manutenção dos tecidos corporais, e para que isto ocorra a fonte protéica deve ser constituída por aminoácidos essenciais que conferem qualidade nutricional a proteína. As cianobactérias geralmente apresentam concentrações dos aminoácidos essenciais fenilalanina, leucina e valina superiores aos recomendados pelo padrão FAO/WHO, mas deficientes em aminoácidos sulfurados, como a cistina e a metionina (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli apresenta altas concentrações de proteínas e contém todos os aminoácidos essenciais em concentrações superiores aos recomendados pela FAO/WHO (1985), com exceção dos aminoácidos sulfurados (metionina + cistina) e lisina (QUEIROZ et al. 2001; BASTOS et al., 2002; JACOB-LOPES et al., 2006; ZEPKA et al., 2008). Queiroz et al. (2001) estudaram a concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli coletada diretamente do meio ambiente, bem como o perfil em aminoácidos deste microrganismo. Os resultados indicaram concentrações de leucina, valina, fenilalanina e treonina superiores aos recomendados pelo padrão FAO/WHO (1985). De acordo com o trabalho desenvolvido por Bastos et al. (2002), registram-se teores de 32,3% de proteína na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz, qualificando o microrganismo como fonte de proteína. Por outro lado Zepka et al. (2008) otimizaram o processo, registrando concentração máxima de 49,3% de proteínas, quando cultivada no efluente da parboilização na ausência de luz, temperatura de 30°C e seca a 60°C em secador de bandejas. A fração protéica da cianobactéria *Aphanothece* quando cultivada no efluente da

parboilização do arroz e desidratada em secador de bandejas nas condições de 40, 50 e 60°C e espessuras de bandeja de 5 mm e 7 mm, foi avaliada no trabalho desenvolvido por JACOB-LOPES et al. (2006). O comportamento eletroforético apresentou bandas com peso molecular de 15 Kda a 62,5 Kda. A caracterização funcional, expressa em termos de solubilidade e capacidade emulsificante, demonstrou a influência da condição de secagem na funcionalidade protéica da biomassa, obtendo-se maiores valores da capacidade emulsificante para a biomassa desidratada na condição de secagem de 60°C e 5 mm de espessura da bandeja, correspondente à condição de menor tempo de exposição da biomassa ao ar aquecido. Por outro lado, as maiores solubilidades foram obtidas nas amostras secas sob as menores temperaturas utilizadas (40°C).

O alto teor protéico associado principalmente à presença de significativas concentrações de aminoácidos essenciais tem tornado as cianobactérias uma fonte viável de proteínas. O conteúdo em proteínas de cianobactérias pode fornecer importantes informações sobre a biomassa, visando estudos sobre o seu valor nutricional (LOURENÇO, 1997).

Queiroz (2001) determinou 91,10% de digestibilidade para a cianobactéria *Aphanothece sp*, trabalhando com ratos Wistar submetidos a dietas aprotéica, padrão (caseína) e dieta teste. Este valor é superior ao encontrado para *Spirulina* (76%), conforme citado por RICHMOND (1988), e revela-se ainda superior a alimentos tradicionalmente consumidos pela população brasileira, tais como o arroz (75%), feijão (60%) e batata (74%) (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Tacon & Jackson (1985) citam como vantagens da utilização de cianobactérias como fonte de proteína a capacidade destes microrganismos de utilizarem fontes de carbono inorgânica e orgânica, possuem em torno de 40-70% de proteína bruta, tempo de geração curto em condições ótimas de cultivo, facilmente cultiváveis em pequenas áreas e passíveis de manipulação genética para alterações da composição química.

O tipo e concentração dos compostos nitrogenados presentes no meio de cultivo poderão influenciar na concentração de proteínas e composição de aminoácidos na célula. As cianobactérias possuem a habilidade de utilizar uma grande variedade de fontes de nitrogênio, tais como amônia, nitrato, nitrito, uréia, aminoácidos e nitrogênio atmosférico (SAHA, UMA & SUBRAMANIAN, 2003; RANGEL-YAGUI et al., 2004, THAJUDDIN & SUBRAMANIAN, 2005). De acordo com Dortch & Postel (1989), uma vez que o nitrato é absorvido, se acumula na célula ou é reduzido a compostos intermediários, como amônio e aminoácidos, dando origem a compostos como proteína e clorofila e iniciando a divisão

celular. Saha, Uma & Subramanian (2003) verificaram que o cultivo da cianobactéria *Oscillatoria willei* BDU 130511 em meio com carência de nitrogênio acarretou em decréscimo do conteúdo protéico de 38,8% em relação ao experimento controle. Além disso, o perfil protéico das células cultivadas em meio com carência de nitrogênio diferiu marcadamente das células cultivadas em meio padrão, onde três polipeptídios, de 11,2 KDa, 16,7 KDa e 55 KDa, não foram encontrados e dois novos polipeptídios da massa molecular 52,6 KDa e 90,5 KDa surgiram. Von Rückert & Giani (2004) estudaram o efeito do nitrato e da amônia sobre o crescimento e a concentração de proteína da cianobactéria *Microcystis viridis* Lemmermann, ficando demonstrado maior crescimento quando foi utilizado amônio, atribuindo que metabolicamente esta forma nitrogenada apresenta taxas de absorção e de assimilação maiores que as registradas para o íon nitrato. No entanto, a produção de proteína foi maior quando utilizada como fonte de nitrogênio o nitrato.

Além da composição do meio, fatores ambientais tais como a temperatura parecem afetar a composição de proteína no cultivo de cianobactérias e microalgas em geral (RENAUD et al., 2002; SANTOS et al., 2003; ARAÚJO & GARCIA, 2005). Santos et al. (2003) realizaram estudos com a cianobactéria *Spirulina maxima* nas temperaturas de 25 e 35°C em meios contendo 0,2 g.L⁻¹ de KNO₃ como fonte de nitrogênio e outro sem a presença desse sal. Os autores verificaram que o aumento da temperatura acarretou no aumento da concentração de proteína de 14,9 e 7,9% para o meio contendo 0,2 g.L⁻¹ de KNO₃ e para o meio sem o sal, respectivamente. Contudo, o efeito da temperatura não é verificado para todos os microrganismos, uma vez que Renaud et al. (2002) não constatarem mudanças significativas na concentração de clorofila *a* (1,22-1,68%) assim como de proteína, das microalgas *Rhodomonas* sp., *Chaetoceros* sp., *Cryptomonas* sp. e *Isochrysis* sp. em cultivos em batelada na faixa de 25 a 35°C. Da mesma forma, Araújo & Garcia (2005) para a microalga *Chaetoceros* cf. *wighamii* não verificaram diferenças significativas utilizando temperaturas de 20 a 30°C.

2.4.2 Carboidratos

As cianobactérias de uma maneira geral apresentam em sua composição bioquímica: 40-60% em proteínas, 7% de sais minerais, 10-40% de carboidratos e 1-40% de lipídios, além de vitaminas, pigmentos, e ácidos nucleicos (GRIMA et al., 2003). O valor nutricional das proteínas unicelulares baseia-se na sua composição em vitaminas, nitrogênio, carboidratos,

gorduras, componentes da membrana celular, ácidos nucleicos, concentração em proteínas e perfil de aminoácidos (BOROWITZKA, 1994).

As principais funções dos carboidratos são proteger as células da dessecação e permitir o crescimento desses microrganismos no ambiente marinho (RAMUS, 1981 apud FUENTES et al., 2000). Esses compostos servem como um limite entre a célula e o meio ambiente. Mais especificamente, eles podem executar um papel protetor contra dessecação, agentes antibacterianos ou predação por protozoários. Além disso, os polissacarídeos podem prover uma maior proteção aos microrganismos pela capacidade de formar biofilmes em superfícies sólidas. Vários estudos têm focado a capacidade de algumas bactérias em superar o *stress* devido à dessecação ou a baixa atividade de água em ambientes severos (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998).

Fuentes et al. (2000) encontraram concentrações de carboidratos na biomassa da microalga *Porphyridium cruentum* de 22,8 a 39,3%, verificando que as maiores concentrações ocorreram com tempos de residência maiores. 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).

O conteúdo químico desses microrganismos varia com mudanças nas condições ambientais. O efeito da composição de nutrientes no crescimento microbiológico foi avaliado nos trabalhos de LOURENÇO et al. (1997) e FIDALGO et al. (1998). A composição obtida da biomassa de *Tetraselmis gracilis* apresentou diferenças quando cultivada em meios contendo amônio e nitrato como fontes de nitrogênio. Os cultivos em meio com nitrato como fonte de nitrogênio apresentou composição rica em carboidratos, assim como lipídios e pigmentos, enquanto que o meio rico em amônio apresentou maior concentração de proteínas. Outro fator que mereceu destaque é que em cultivos onde o nitrogênio foi consumido mais rapidamente, houve uma tendência de formação de compostos não nitrogenados, observando-se assim o aumento da composição de carboidratos (LOURENÇO et al., 1997).

Fidalgo et al. (1998) estudaram a composição química da microalga *Isochrysis galbana* em cultivos contendo nitrato, nitrito e uréia e em diferentes fases de crescimento. Os autores observaram que a concentração de carboidratos nas células de *I. galbana* foi mais afetada pela fase de crescimento do que pela fonte de nitrogênio. Observou-se que entre os diferentes componentes químicos das células de *I. galbana* os carboidratos mostraram as

menores variações entre as fases, apresentando durante a fase exponencial de crescimento valores entre 7,65 e 9,84% e entre 10,85 e 13,58% para a fase estacionária.

Olguín et al. (2001) avaliaram o efeito de diferentes luminosidades e concentrações de nitrogênio no crescimento e composição química em culturas de *Spirulina* sp. Foi constatada uma concentração de carboidratos significativamente maior ($p < 0,05$) na condição de maior luminosidade atingindo uma concentração de 28,41%, assim como uma relação direta com a quantidade de nitrogênio presente no meio, onde foi verificado maior teor de carboidratos no meio com deficiência de nitrogênio.

A camada celular de celulose, a qual representa em torno de 10% da matéria seca, propõe um problema sério de digestibilidade da biomassa, uma vez que não é digestível para humanos e animais não ruminantes. Conseqüentemente, são necessários tratamentos efetivos para romper a parede celular para fazer com que os constituintes se tornem acessíveis para as enzimas digestíveis (BECKER, 2007).

Zepka et al. (2008) avaliaram o perfil bioquímico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz e desidratada em secador de bandejas nas temperaturas de 40, 50 e 60°C e espessuras da bandeja de 5 mm e 7 mm. A análise dos resultados mostrou que as condições de secagem influenciaram na concentração de carboidratos, e que a maior concentração encontrada (17,6%) foi obtida na temperatura de 60°C e 7 mm de espessura de bandeja.

2.4.3 Lipídios

Nas células de cianobactérias os lipídios são tipicamente encontrados somente nas membranas. Portanto, o aumento da insaturação dos lipídios a baixa temperatura representa uma adaptação às novas condições, melhorando a funcionabilidade da membrana a temperaturas inferiores. Estudos da composição de cianobactéria têm demonstrado que alterações da temperatura de cultivo levam a vários tipos de mudanças nos lipídios. Além de afetar a concentração de lipídios na biomassa as modificações provocadas pela diminuição da temperatura ocorrem geralmente na forma de adaptação na fluidez da membrana no sentido de manter a proteína em um ambiente compatível com as atividades enzimáticas. A diminuição da temperatura leva ao decréscimo do comprimento da cadeia de ácidos graxos monoinsaturados no carbono 1 de todas as classes de lipídios e, ao mesmo tempo, ao aumento da insaturação do C16:0 a C16:1 no carbono 2. Esse processo de insaturação é altamente

dependente da espécie e do estado fisiológico da cultura (QUOC & DUBACQ, 1997; SAKAMOTO et al., 1998).

Alguns trabalhos sugerem danos irreversíveis às células de cianobactérias em baixas temperaturas pela separação de fase da membrana plasmática. Sakamoto et al. (1998) evidenciaram que a separação de fase dos lipídios da membrana tilacóide ocorreu em uma temperatura maior (15°C) do que a separação de fase dos lipídios da membrana plasmática (5°C) na cianobactéria *Anacystis nidulans*. Neste microrganismo a separação de fase dos lipídios da membrana tilacóide causou perda reversível da atividade fotossintética, a qual foi recuperada quando as células retornaram a temperatura de crescimento ótima (28°C). Entretanto, parece não haver uma regra absoluta para essas mudanças, pois podem depender da espécie, da classe de lipídio e do número de carbono do glicerol considerado. Na cianobactéria *Anacystis nidulans* a diminuição da temperatura acarretou em aumento da insaturação e encurtamento do comprimento da cadeia carbonada (QUOC & DUBACQ, 1997).

Os ácidos graxos poliinsaturados são ácidos graxos com mais de uma dupla ligação. Muitos deles são reconhecidos como ácidos graxos essenciais na dieta normal para prevenção de doenças relacionadas à nutrição. Os ácidos graxos essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo humano, devendo estar presentes na dieta. Os principais são o ácido linoléico (C18:2), α -linolênico, γ -linolênico (C18:3) e araquidônico. O ácido γ -linolênico é sintetizado pela introdução de três duplas ligações nos lipídios das membranas através da ação de enzimas específicas no ácido esteárico (C18:0), e é necessário para a síntese do ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas, sendo estas importantes reguladores celulares (ALONSO & MAROTO, 2000). Os ácidos linoléico e α -linolênico quando ingeridos na dieta são metabolizados pela ação de dois tipos de enzimas, as elongases (introdução de 2 átomos de carbono) e as dessaturases (introdução de uma dupla ligação), originando diversos metabólitos (CARVALHO et al., 1995).

Os ácidos araquidônico e DHA (docosahexaenóico) são essenciais para o desenvolvimento do cérebro de crianças, sendo que o araquidônico é considerado essencial quando a concentração do linolênico é baixa (CARVALHO et al., 1995).

Uma potencial fonte de ácidos graxos polinsaturados são as cianobactérias, onde a *Spirulina* apresenta importância, sendo considerada como uma fonte de ácido γ -linolênico, representando cerca de 20% do total de ácidos graxos (ALONSO & MAROTO, 2000).

Pesquisas prévias a respeito da natureza das cianobactérias têm determinado que a composição em ácidos graxos pode variar tanto com a espécie como com as condições ambientais. Por exemplo, em algumas espécies, tal como *Anacystis nidulans*, tem sido relatado a falta de ácidos graxos polinsaturados, enquanto outras, tais como *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Spirulina* e *Microcystis* são reportadas por ter alto conteúdo destes componentes. Conseqüentemente, a diversidade de ácidos graxos observados em diferentes espécies de cianobactéria tem sido utilizada para estudos taxonômicos (WALSH, JONES & DUNSTAN, 1997).

O total da fração lipídica em cianobactérias pode variar de 1% a mais de 40% em peso seco dependendo da espécie do microrganismo e das condições de cultivo. A maioria dos lipídios encontrados nas cianobactérias são ésteres de glicerol e ácidos graxos. Em amostras in-natura de cianobactérias ocorre a predominância de ácidos graxos insaturados (BOROWITZKA, 1994).

As cianobactérias e microalgas em geral são fontes ricas de ácidos graxos polinsaturados das famílias $\omega 3$ e $\omega 6$, ácidos graxos de grande importância quando se pretende utilizar esses microrganismos como fonte alimentar, tendo nas últimas décadas aumentado consideravelmente o interesse em estudar estes ácidos graxos, especialmente devido ao efeito de sua ingestão sobre os problemas cardiovasculares e sua função como precursores de prostaglandinas, estando ainda relacionados com a ocorrência de baixas concentrações de colesterol (PERNET et al., 2003; ROMANO et al., 2000).

O ácido γ -linolênico tem sido apontado como um dos principais agentes terapêuticos por ser redutor do nível plasmático do colesterol e da pressão arterial, atuante no tratamento de disfunções fisiológicas, como o eczema tópico na doença de Parkinson, na esclerose múltipla e artrite, além do tratamento do alcoolismo, síndrome pré menstrual, entre outros. Esse composto é produzido pelas cianobactérias e tem sido bastante estudado na *Spirulina*, considerado um dos principais agentes terapêuticos nestes microrganismos. Ruiz & Mós (1990) em uma revisão a respeito da produção de biomassa de *Spirulina máxima* para alimentação humana e animal, enfatizaram que ratos alimentados com dieta contendo esta cianobactéria apresentaram baixos níveis de colesterol, sendo este efeito hipocolesterolêmico devido ao ácido eicosapentaenóico, ácido graxo polinsaturado existente neste microrganismo. Além desta, muitas cianobactérias apresentam altos teores de ácido eicosapentaenóico, que possui importante aplicação em alimentos funcionais, como suplemento alimentar e na indústria farmacêutica.

Queiroz et al. (2001) avaliaram o efeito hipocolesterolêmico em ratas submetidas a uma dieta teste contendo a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. Ratas alimentadas com esta dieta por um período de 8 meses apresentaram um baixo índice de colesterol, o que estaria atribuído aos ácidos graxos poliinsaturados característicos desses microrganismos e ainda podendo ser associada com a composição em fibras da *Aphanothece*. A esta fonte de fibras pode ser atribuído o aumento da excreção fecal de ácidos biliares, o que provoca uma redução no colesterol total.

Zepka et al. (2008) avaliaram o perfil de ácidos graxos desta cianobactéria, constatando a presença de ácidos graxos essenciais das famílias $\omega 3$ e $\omega 6$, nas concentrações de 28,9% de ácido linoléico e 17,7% de ácido linolênico para o microrganismo desenvolvido em reator de bancada no efluente da parboilização do arroz, nas condições de temperatura 25°C, ausência de luminosidade, razão C/N de 50 e tempo de detenção hidráulica de 12 h. Os resultados acima ressaltam a influência das condições de cultivo na composição de ácidos graxos das cianobactérias, uma vez que em biomassa oriunda do meio ambiente apresenta concentrações de 6,4 e 3,9% de ácido linoléico e ácido linolênico, respectivamente.

2.4.4 Pigmentos

As cianobactérias são microrganismos fotossintéticos e que realizam a fotossíntese de forma similar às plantas. Os pigmentos absorvedores de luz são a clorofila, carotenóides e ficobiliproteínas. Este último é um grupo de proteínas intensamente coloridas que ocorrem na *Cyanophyceae*, *Rhodophyceae* e *Cryptophyceae* somente, os quais podem ser subdivididos em três grupos principais de acordo com a sua estrutura: ficocianinas (azul), aloficocianinas (azul) e ficoeritrina (vermelho). Uma vez que a ficocianina e aloficocianina estão sempre presentes na *Cyanophyceae* e *Rhodophyceae*, a ficoeritrina pode estar ausente no primeiro (*Cyanophyceae*). As cianobactérias contêm somente clorofila *a* e quase 50% da luz requerida é capturada pelas ficobiliproteínas (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

A maior parte da energia luminosa utilizada por qualquer organismo fotossintético é absorvida por uma coleção de pigmentos acessórios, uma vez que a clorofila *a* absorve a energia luminosa somente em uma limitada região do espectro solar. A energia de excitação é então transferida para os centros de reação localizados na membrana fotossintética, iniciando o processo fotossintético. Ao invés de cloroplastos como nas plantas superiores os pigmentos fotossintetizantes estão localizados nos tilacóides, onde ficam livres no citoplasma, ao invés

de estarem inclusos nos cloroplastos, como nos organismos eucarióticos fotossintetizantes. Os tilacóides não estão empilhados, permanecendo isolados e equidistantes no interior da célula (HOEK, MANN & JAHNS, 1995).

As ficobiliproteínas podem também ser divididas em três tipos de categorias em relação às propriedades de absorção de energia: aqueles com energia alta e $\lambda_{\text{máx}} = 540\text{-}570\text{ nm}$ (ficoeritrinas), energia intermediária e $\lambda_{\text{máx}} = 610\text{-}620\text{ nm}$ (ficocianinas) e energia baixa e $\lambda_{\text{máx}} = 650\text{-}655\text{ nm}$ (aloficocianinas). A energia irá fluir dos pigmentos com mais alta energia para aqueles com energia mais baixa (VISKARI & COLYER, 2003).

As ficobiliproteínas são compostas por proteínas com grupos cromóforos tetrapirrólicos lineares (bilinas) que, no seu estado funcional, estão covalentemente unidos através de ligações tioéteres aos resíduos específicos de cisteína das proteínas (Figura 1). Estes grupos cromóforos são chamados de bilinas ou ficobilinas devido a sua relação estrutural com os já conhecidos pigmentos da bile de seres humanos, biliverdina e bilirrubina. Os grupos cromóforos definem as características espectrais únicas das ficobiliproteínas, dependendo do número e tipo de bilinas presentes, do meio e da relação estérica uma com a outra (Tabela 1) (VISKARI & COLYER, 2002; VISKARI & COLYER, 2003; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

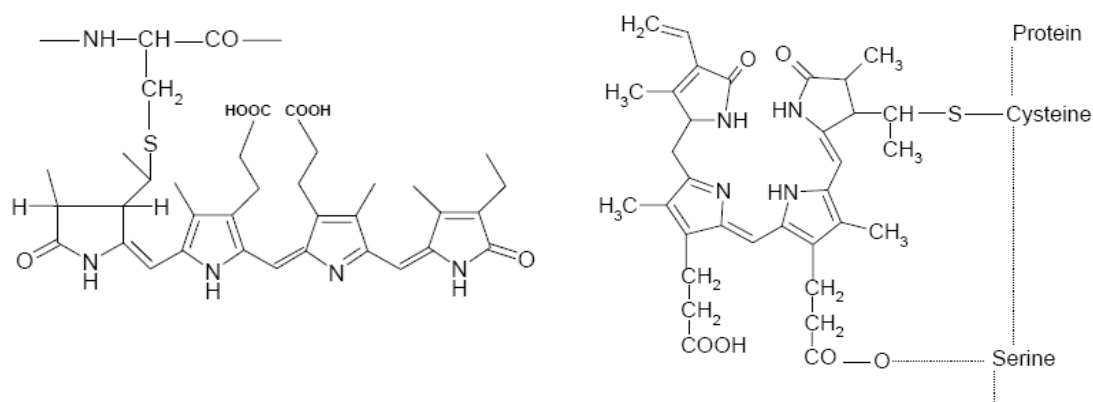


Figura 1. Ficobilinas comuns: grupos tetrapirrólicos cromóforos lineares, covalentemente unidos às cadeias de polipeptídeos de ficobiliproteínas através de ligações tioéteres aos resíduos de cisteína

Ficobiliproteínas são proteínas hidrossolúveis e altamente fluorescentes derivadas das cianobactérias e das algas vermelhas, e podem constituir acima de 60% do conteúdo de proteína solúvel. Os diferentes grupos refletem variações entre as proteínas em um específico

perfil dos seus espectros de absorbância e a localização exata das suas absorbâncias máximas. Pela absorção de energia na região de 470 nm a 670 nm, estas proteínas permitem aos organismos os quais estão associadas estender os limites de seus espectros de absorção, ao coletar luz que não é de outro modo absorvido eficiente pela clorofila *a*. Estes compostos participam de uma corrente de transferência de energia extremamente eficiente através dos quais transferem a energia de excitação por processos com menor radiação para centros de reação nas membranas fotossintéticas para a conversão em energia química (VISKARI & COLYER, 2003).

Tabela 1. Propriedades físicas e espectrais de algumas ficobiliproteínas

Ficobiliproteína*	Massa molecular	λ_{max}	Absortividade molar ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Aloficocianina	104000	660	730000
C-ficocianina	232000	647	1540000
R-ficoeritrina	240000	578	1960000
B-ficoeritrina	240000	575	2410000

* Os prefixos associados com o nome da ficobiliproteína (C-, R- e B-) se referem à nomenclatura histórica indicando a fonte de extração

As ficobiliproteínas são chamadas de pigmentos antenas e ficam organizadas em agregados supramoleculares – as ficobilisomas, associadas aos resíduos de cisteínas da apoproteína – de maneira a maximizar a transferência de energia para os complexos proteína-clorofila localizados na membrana tilacóide, que possui a mesma função dos cloroplastos das plantas superiores. Devido a sua limitada distribuição e as dificuldades de purificação estes pigmentos possuem um custo muito alto, e a obtenção deles como compostos puros é um negócio atrativo. São usadas como uma proteína natural seca na indústria de alimentos (C-ficocianina) e na indústria de cosmético (C-ficocianina e R-ficoeritrina), assim como para pesquisa na área da biomedicina, apresentando um grande potencial como agente terapêutico nas doenças induzidas pelo *stress* oxidativo (REIS et al., 1998; MINKOVA et al., 2003). O seu uso como pigmentos naturais em alimentos, tais como gomas de mascar, produtos lácteos, geléias e sorvetes, e cosméticos como batom e delineadores de olhos, principalmente no Japão, Tailândia e China, vem substituindo os pigmentos sintéticos, o que é uma vantagem, uma que estes em geral são tóxicos, carcinogênicos ou de um modo geral perigosos. Esses compostos também têm mostrado valor terapêutico pela atividade imunomodulante e anticancerígena. (ROMÁN et al., 2002; MINKOVA et al., 2003).

No Japão, onde o cultivo de microalgas é uma indústria bem desenvolvida, alguns pigmentos naturais das ficobiliproteínas já foram patenteados. Outros corantes preparados a partir de algas são também convenientes para uso em cosméticos, e novamente, a β -ficoeritrina é a mais valiosa das ficobiliproteínas devido a sua intensa e incomparável coloração rósea (ROMÁN et al., 2002).

As biliproteínas nas cianobactérias são obtidas como produtos de dissociação dos ficobilissomas. Quando as células são quebradas e o conteúdo celular escapa para um meio aquoso com baixa força iônica, os ficobilissomas dissociam em vários componentes e as biliproteínas são obtidas para análise. A estabilidade dos complexos das associações de biliproteínas varia entre as biliproteínas e as suas diferentes fontes. A aloficocianina, com um comprimento de onda máximo de 650 nm, é encontrada próxima ao pH da neutralidade em boas condições tendo três α e três β polipeptídeos; apresentando cada um destes um cromóforo (bilina). As biliproteínas podem ser completamente dissociadas em polipeptídeos α e β por vários agentes desnaturantes. A determinação da sequência dos aminoácidos de várias biliproteínas tem sido um passo importante no entendimento das suas propriedades (MACCOLL, 1998; VISKARI & COLYER, 2003).

Ficobilissomas

Ficobilissomas são complexos protéicos compostos de ficobiliproteínas e proteínas de ligação de menor coloração. Estes compostos solúveis em água e produtores de luz estão localizados na superfície das membranas tilacóides das cianobactérias (Figura 2). A forma morfológica mais comum das ficobilissomas é descrita como “hemidiscoidal”, composta de dois elementos sub-estruturais: o núcleo e os bastões periféricos. O núcleo contém várias proteínas cilíndricas agrupadas que são compostas principalmente de aloficocianina e proteínas agrupadas. Os bastões periféricos se difundem das superfícies do núcleo agrupado e são compostas de hexâmeros de ficobiliproteínas (ZHAO et al., 2001). Atuam na produção de luz e migração de energia, principalmente no Fotossistema II. Quando a energia absorvida pelas cromoproteínas (biliproteínas) das ficobilissomas alcança os centros de reação do Fotossistema II, ocorre a transformação da energia de excitação para energia química. As biliproteínas absorvem a radiação na região do espectro visível onde clorofila *a* tem baixa absorvidade. A composição de ficobilissomas varia de organismo para organismo, e organismos individuais apresentam ficobilissomas que são modificados pelo ambiente em diversas maneiras. As ficobiliproteínas absorvem luz em uma ampla faixa de comprimentos

de onda no espectro visível e transfere a energia de excitação por processos com menor radiação para centros de reação nas membranas fotossintéticas para a conversão em energia química (MACCOLL, 1998).

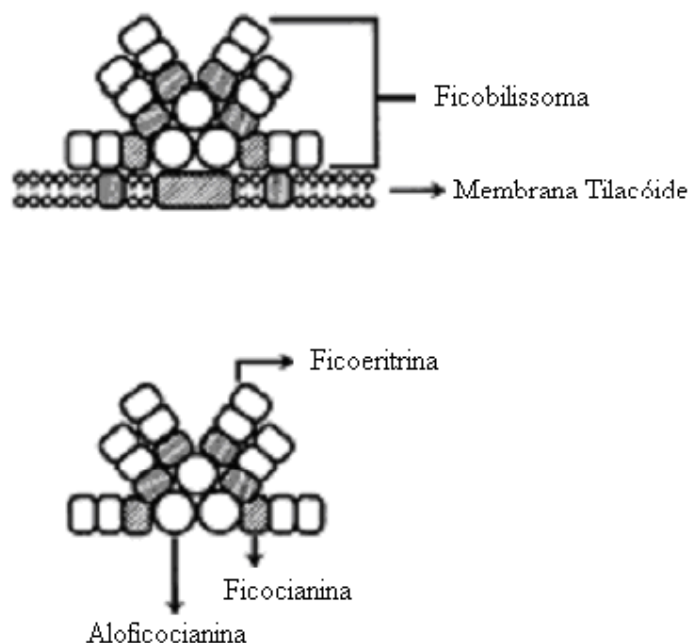


Figura 2. Modelo de um ficobilissoma triclíntrico hemidiscoidal

2.4.4.1 Ficobiliproteínas

2.4.4.1.1 Ficocianina

Entre as ficobiliproteínas, a ficocianina é o mais importante pigmento natural azul para a indústria de alimentos, correspondendo cerca de 20% do peso seco de uma cianobactéria. Recente foi observado que este pigmento também possui certas propriedades terapêuticas, como ação anti-oxidante, e provêm cerca de vinte vezes mais atividade anti-oxidante que o ácido ascórbico, além de ter sido pesquisada também como anti-inflamatório em função de sua atividade hepatoprotetora (PADYANA et al., 2001; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

Tem sido sugerido que o efeito anti-inflamatório poderia ser devido a sua habilidade de eliminar os radicais livres e inibir as enzimas envolvidas na formação das prostaglandinas inflamatórias, entre elas a 2-cicloxigenase. A ficocianina contém uma cadeia aberta tetrapirrólica cromófora conhecida como ficocianobilina, a qual é covalentemente unida a

apoproteína. Evidências sugerem que a ficocianobilina desempenha um papel importante nas propriedades biológicas exibidas pela ficocianina. A ficocianobilina tem uma estrutura química similar a bilirubina, um pigmento da bile, o qual é conhecido por eliminar várias espécies oxigenadas reativas *in vivo*. A bilirubina é também conhecida por inibir ONOO^- intervindo na oxidação. O ânion peróxido nitrito (ONOO^-) é uma toxina inorgânica de importância biológica e seu poder oxidante pode ser gerado *in vivo* a partir do óxido nítrico e superóxido. Pode oxidar várias biomoléculas tais como lipídios, proteínas e tióis, causando extensiva modificação da base estrutural. Recentes estudos têm implicado ONOO^- a várias desordens inflamatórias e dano oxidativo do DNA, sendo considerado um dos eventos que ocorrem durante a inflamação crônica (BHAT & MADYASTHA, 2001).

2.4.4.1.2 Ficoeritrina

Algumas cianobactérias têm quatro tipos de biliproteínas em vez de ficoeritrinas, as ficoeritrocianinas. Visualmente as ficoeritrinas aparecem com a coloração vermelha. Podem ser divididas em três classes principais, dependendo do seu espectro de absorção, β -ficoeritrina (picos a 545 nm e 565 nm), R-ficoeritrina (picos a 499 nm e 565 nm) e C-ficoeritrina (pico a 565 nm). A β -ficoeritrina tem mostrado ser particularmente útil devido ao seu amplo coeficiente de absorção e boas propriedades fluorescentes. Este composto apresenta fluorescência na região espectral que é distinta da região de emissão de simples pigmentos orgânicos comumente utilizados como indicadores fluorescentes. Portanto, a β -ficoeritrina é um candidato de grande valor no *design* e caracterização de elementos fotosensíveis em biosensores (ROMÁN et al., 2002).

As ficobiliproteínas puras provenientes de extratos crus são usualmente obtidas a partir da combinação de métodos diferentes e não proporcionais. Particularmente, a ficoeritrina é classicamente purificada pela combinação de diversas técnicas, tais como precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca-iônica e filtração em gel. Os procedimentos de purificação são freqüentemente longos e complexos. Por essa razão o uso desta biliproteína tem sido um pouco limitado por sua difícil preparação de quantidades adequadas da proteína purificada (ROMÁN et al, 2002).

2.4.4.2 Clorofila

A clorofila é um pigmento natural presente nas plantas fotossintéticas, assim como em algas e cianobactérias. A maior parte dos produtos industriais produzidos a partir de derivados da clorofila é destinado para a demanda crescente de corantes naturais para o a indústria de alimentos e bebidas. Parte da produção industrial é também destinada para o mercado de cosmético e produtos para higiene pessoal, além de produtos farmacêuticos. Atualmente grande parte dos produtos comerciais a partir da clorofila é obtida de fontes vegetais. Porém, há um grande interesse no campo da biotecnologia para obtenção de compostos coloridos a partir de fontes não vegetais, uma vez que o uso de processos de fermentação possui um número de vantagens quando comparado a fontes vegetais, incluindo a possibilidade de cultivo contínuo e a rápida multiplicação dos microrganismos (RANGEL-YAGUI et al., 2004).

A clorofila *a*, presente nos cloroplastos de todas as células das plantas verdes, é formada por complexos de moléculas e Mg^{+2} , contendo quatro anéis pirrólicos substituintes, um dos quais (anel IV) está reduzido. A clorofila *a* possui também um quinto anel, que não é pirrol. Este derivado porfirínico de cinco anéis característicos é chamado de feoporfirina. A clorofila *a* também possui uma longa cadeia lateral isoprenóide, consistindo do álcool fitol, esterificado a um grupo carboxila substituinte no anel IV. Os quatro átomos de nitrogênio centrais da clorofila *a* estão coordenados com o Mg^{+2} . O sistema fortemente colorido de cinco anéis, que forma um longo anel ao redor de Mg, dota a molécula com poderes de absorver luz; o magnésio promove a formação de agregados de clorofila, que facilitam a captação de luz; e a longa cadeia hidrofóbica lateral não apenas ancora, mas também orienta a molécula de clorofila na bicamada lipídica da membrana (LEHNINGER, 1991).

De acordo com Rangel-Yagui et al. (2004) há uma relação inversa entre a intensidade de luz e a concentração de clorofila *a* na biomassa. Em um trabalho realizado por estes autores foi observado que a maior concentração de clorofila *a* ocorreu em cultivos submetidos à luminosidade de 1400 lux e a menor utilizando 5600 lux, quando as demais condições de cultivo para ambos os experimentos foram as mesmas. Foi deduzido então que o cultivo sob condições de fraca iluminação gera células com conteúdos de clorofila maiores, no sentido de otimizar a captura de luz.

2.5 Compostos nitrogenados

O alto conteúdo protéico tem tornado as cianobactérias uma fonte viável de proteínas, devido principalmente à presença de significativas concentrações de aminoácidos essenciais. O conteúdo em proteínas de cianobactérias pode fornecer informações importantes sobre a biomassa, visando estudos sobre o seu valor nutricional (LOURENÇO et al., 1997).

O método oficial para a determinação de proteína é o Kjeldahl, que consiste na medida de todo o nitrogênio contido na amostra por meio de digestão ou por análise elementar, o resultado obtido é multiplicado por um fator dependendo do índice de nitrogênio da proteína (AOAC, 2000). O fator 6,25 para conversão de valores de nitrogênio à proteína está em uso até hoje, apesar de sua variabilidade. As diferenças entre as fontes de proteína e a uniformidade de sua composição, como nos produtos de leite ou de trigo, por exemplo, iniciaram a aplicação de outros fatores de conversão de nitrogênio em proteína (RAFECAS et al., 1994).

As grandes variações constatadas nos teores de proteínas para as cianobactérias e/ou microalgas podem estar associadas ao fato desses microrganismos poderem acumular significativas concentrações de nitrogênio inorgânico antes da assimilação. Esses componentes nitrogenados são assimilados em aminoácidos e proteínas, acumulados no meio intracelular, podendo ocorrer em decorrência de alta disponibilidade de nitrogênio no meio e suas variações ambientais. Isto poderia contribuir para as oscilações registradas para os teores protéicos, uma vez que a utilização do fator 6,25 para obter o total de proteína estaria convertendo também componentes nitrogenados não protéicos (DORTCH & CONWAY, 1984; FLYNN et al., 1994; LOURENÇO et al., 1997).

O nitrogênio não protéico representa uma fração importante e envolve um largo grupo de componentes, inclusive uréia, amônia, aminoácidos, peptídeos, aminas, pigmentos, amidas e nucleotídeos. Essas informações podem ser verificadas na tabela 2, que compara o nitrogênio procedente de cianobactérias e legumes.

As cianobactérias utilizam como fonte inorgânica de nitrogênio, nitrato, nitrito, nitrogênio atmosférico e amônia. Quando o íon amônio está disponível, estes microrganismos não assimilam outra forma de nitrogênio até este ser totalmente consumido. Isto ocorre por a amônia não necessita de um sistema enzimático de redução, resultando em economia de energia para a célula, pois em geral todas as outras formas de nitrogênio requerem a redução para amônio. Desta forma o nitrogênio amoniacal é a fonte preferencial de nitrogênio destes

microrganismos, e sua disponibilidade é crucial para seu metabolismo (MURO-PASTOR & FLORÊNCIO, 2003; GARCÍA-FERNÁNDEZ & DIEZ, 2004). Segundo Danesi et al. (2002) a uréia é facilmente assimilada por cianobactérias por ser facilmente convertida a amônia durante o cultivo.

Tabela 2. Composição do nitrogênio presente em cianobactérias e legumes

Material	Nitrogênio total*	Nitrogênio protéico*	Nitrogênio não protéico*
Cianobactérias			
<i>Spirulina platensis</i>	8,56	6,98	1,58
<i>Scenedesmus acutus</i>	7,3	6,30	1,0
Legumes			
ervilha	3,8	3,4	0,4
vagem	4,4	4,1	0,4

*g.100 g⁻¹ de peso seco
Fonte: Devi et al., 1981

Shi et al. (2000) estudaram o efeito de nitrato, amônio e uréia como fontes de nitrogênio no crescimento heterotrófico de *Chlorella protothecoides* em meio sintético. As máximas concentrações de biomassa na três culturas com nitrato, amônio e uréia foram 18,4 g.L⁻¹, 18,9 g.L⁻¹ e 19,6 g.L⁻¹ de células secas, respectivamente. Da mesma forma, Hornes et al. (2004) estudaram o crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio BG11 (Braun-Grunow medium) com substituição parcial de NaNO₃ por NH₄Cl, nas concentrações de 35 mg.L⁻¹, 70 mg.L⁻¹ e 140 mg.L⁻¹ em N-NH₄⁺, em uma câmara climatizada com temperaturas de 20°C e 35°C, constatando-se a tolerância deste microorganismo em todas as condições avaliadas.

O nitrogênio amoniacal existe em solução aquosa tanto como íon amônio (NH₄⁺) como amônia gasosa (NH₃), e a predominância de uma destas formas irá depender do pH e temperatura do meio. Estima-se que mais de 90% do nitrogênio amoniacal permanece na forma de gás a pH 10,5 e 20°C, mas somente 20% é volátil a pH 9,0 e 10°C (OLGUÍN et al., 2001).

A influência das concentrações de nitrato no conteúdo de pigmentos e proteínas foi estudada por Loreto et al. (2003), os quais reportam que a concentração de nitrato incrementa a produção de ficocianina, clorofila *a*, carotenóides e proteínas, sendo necessário utilizar concentrações equiivalentes a 8mM de NaNO₃.

De acordo com Von Rückert & Giani (2004) altas densidades celulares e protéica foram encontradas em meio contendo nitrato, ou mistura de nitrato e amônio, bem como

acúmulo intracelular de nitrogênio em formas variadas como nitrato, amônio, aminoácidos, proteínas, RNA (Ácido Ribonucléico) e pigmentos.

Olguín et al. (2001) verificaram que a influência da concentração de nitrogênio presente no meio de cultivo na composição química da cianobactéria *Spirulina* sp. A biomassa desenvolvida no meio contendo menor concentração de nitrogenados apresentou um conteúdo de proteína da biomassa significativamente menor ($p < 0,05$) comparado ao meio padrão.

O íon amônio é o composto chave na assimilação de nitrogênio em numerosos sistemas biológicos porque é a forma inorgânica de nitrogênio que é incorporado no esqueleto carbonado, usualmente pelo ciclo da glutamina/glutamato sintetase. Este componente é a forma nitrogenada mais reduzida disponível para assimilação, estando as outras formas de nitrogênio encontradas na natureza na forma oxidada, principalmente como nitrato, nitrito, uréia ou gás nitrogênio (N_2). Em geral, todas essas formas de nitrogênio requerem a redução a amônio, em um processo que necessita de energia. Por essa razão a maioria dos organismos prefere amônio como fonte de nitrogênio e, na ausência deste, são utilizadas diferentes estratégias para efetuar a assimilação do nitrogênio por sistemas regulatórios distintos que garantem a fonte deste componente a partir de fontes alternativas (MURO-PASTOR & FLORÊNCIO, 2003). Von Rückert & Giani (2004) constataram uma maior assimilação de nitrogênio e posterior conversão em proteína quando a cianobactéria *Microcystis viridis* Lemmermann foi desenvolvida em meio contendo amônio em comparação com o íon nitrato.

A maioria das cianobactérias pode usar nitrato, nitrito ou íons amônio como fontes de nitrogênio, e algumas espécies têm a capacidade também de fixar nitrogênio gasoso ou utilizar uréia. Com exceção do gás nitrogênio, as cianobactérias possuem sistemas de transporte específicos para as diferentes formas de nitrogênio, mas a maioria deles pode também entrar na célula por difusão, dependendo de sua concentração ou do pH do meio de cultura. Nitrito e nitrato são reduzidos por nitrito e nitrato redutases, respectivamente, sendo que ambas enzimas usam ferredoxina como doador de elétrons (MURO-PASTOR & FLORÊNCIO, 2003). A uréia é convertida a amônio pela urease; e o gás nitrogênio é reduzido a amônio pelo complexo nitrogenase. Outras formas de nitrogênio como alguns aminoácidos requerem sistemas de transporte específicos e uma metabolização adicional para produzir amônio (HERRERO et al., 2001).

As biomassas microbianas possuem em geral elevados teores de ácidos nucléicos. O nível destes compostos nas cianobactérias é baixo em relação a outras fontes alimentares de

organismos unicelulares, o qual tem sido relatado como cerca de 4-6% para microalgas e cianobactérias, 2,5-6% para fungos, 8-12% para leveduras e 20% para bactérias. Esses elevados teores de ácidos nucleicos é uma característica de células em rápido crescimento. Comparando com fontes protéicas não convencionais, as cianobactérias contêm elevadas concentrações deste componente. Quando expressos em base protéica, possuem entre 8 e 25 g por 100 g de proteína (CRUEGER & CRUEGER, 1993; SGARBIERI, 1996; SGARBIERI & PACHECO, 2002).

Devido à inabilidade do organismo humano para metabolizar o ácido úrico proveniente do metabolismo das purinas, o aumento no consumo de ácidos nucleicos pode levar a altos níveis de ácido úrico no soro. Desta forma poderia culminar com o desenvolvimento de moléstias como a gota, e por isso recomenda-se que a ingestão diária máxima de ácidos nucleicos de fontes não convencionais seja de 2,0 g.d⁻¹, com ácidos nucleicos totais não ultrapassando 4,0 g.d⁻¹, pois o consumo por período prolongado aumentará significativamente o risco de formação de cálculos renais. Como consequência um limite tolerável para o consumo diário de microalgas e cianobactérias seria de 30 g, o que representaria menos de 10% do consumo diário de alimento de um adulto normal (BOROWITZKA, 1994). Contudo isso não tem sido demonstrado definitivamente, uma vez que muitos animais de laboratório, como ratos, não resultam a formação de cálculos renais (SGARBIERI, 1996; SGARBIERI & PACHECO, 2002; ARAÚJO et al., 2003). Além disso, é possível reduzir o conteúdo de ácido nucleico a 1-2% através de um processo de choque térmico para a ativação das ribonucleases que degradam o ácido ribonucleico (SGARBIERI, 1996; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

Queiroz et al. (2001) determinaram o conteúdo total de ácidos nucleicos na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli aplicada ao tratamento do efluente da parboilização do arroz, obtendo um valor de 4,37% de ácidos nucleicos totais, correspondendo uma relação proteína-ácido nucleico de 12,5, similar ao citado na literatura para a cianobactéria *Spirulina*.

2.6 Cinética de crescimento

A obtenção de parâmetros cinéticos é realizada pela observação da depleção do substrato e o aumento da concentração de biomassa com o tempo através de experimentos em batelada (NAKHLA et al., 2006; BELTRAN-HEREDIA et al., 2000).

Os sistemas de batelada são freqüentemente utilizados para estudar a cinética do crescimento microbiológico, remoção de substrato e a biodegradabilidade de substâncias, visando assim otimizar as reações biológicas. Nos processos biológicos as variáveis que são de grande relevância para a avaliação econômica de tais processos biotecnológicos são fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$), taxa de remoção de substrato específica (q_s), velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}$) e constante de decaimento endógeno (K_D). Todos estes parâmetros têm uma importância tecnológica no aumento de escala dos processos biotecnológicos (LIU et al., 1999; LIU et al., 2005; RAJOKA et al., 2006; WANG et al., 2007).

O aumento da biomassa está relacionado com a velocidade específica de crescimento e com a concentração de inóculo, geralmente função de três parâmetros: concentração inicial do substrato limitante, velocidade máxima de crescimento e de uma constante específica de cada substrato (CRUEGER & CRUEGER, 1993). As velocidades máximas de crescimento são de considerável importância industrial, sendo que o valor depende do microrganismo e das condições do processo. De acordo com Jianlong et al. (2000), a performance dos tratamentos biológicos de efluentes está relacionada com as condições de desenvolvimento dos microrganismos, já que a eficiência do processo é proporcional à concentração de biomassa no reator.

A velocidade da reação pode ser expressa em termos da taxa de variação da concentração de qualquer das substâncias envolvidas ou da concentração do microrganismo utilizada com o tempo.

O ciclo de operação de um processo descontínuo compreende os seguintes períodos:

a) período no qual o microrganismo se encontra em sua fase de adaptação ao meio ou fase lag, na qual as células sintetizam as enzimas que lhes são necessárias para metabolizar os substratos presentes;

b) período no qual se verifica crescimento exponencial, sendo o tempo de duração desta fase em função do tamanho do inóculo, idade das células e do seu estado bioquímico, denominada fase logarítmica ou exponencial;

c) período em que o número de células permanece constante e que corresponde ao esgotamento do meio de cultura devido ao desaparecimento de um ou de vários compostos necessários ao crescimento;

d) período no qual a taxa de morte excede a produção de novas células, havendo o decréscimo da concentração celular.

Nos processos comerciais é conveniente reduzir a fase de latência tanto quanto possível, evitando a perda de tempo assim como o consumo de nutrientes necessários para manter o cultivo viável neste período de tempo. Uma forma de reduzir o tempo de latência é utilizando um inóculo relativamente grande (3-10%) de um cultivo na fase exponencial que tenha sido preparado no mesmo meio que o utilizado no processo (TREVAN et al., 1990).

A partir das curvas de consumo dos diferentes substratos e concentração do microorganismo em função do tempo é possível determinar, em cada instante, as velocidades de consumo do substrato (dS/dt) e de crescimento do microorganismo (dX/dt). Considerando que, no intervalo de tempo $t_1 - t_2$ correspondente à fase exponencial, a concentração do microorganismo tenha sofrido uma variação, pode-se determinar a produção de biomassa a partir da equação 2, considerando-se uma equação cinética de primeira ordem (METCALF & EDDY, 1991):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \quad (2)$$

Onde: $\mu_{\max}$ = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1})

X = concentração celular no intervalo de tempo dt ($mg.L^{-1}$)

Integrando-se a equação 2, obtém-se:

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

Onde: X_f = concentração celular após o crescimento exponencial ($mg.L^{-1}$)

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

Δt = intervalo de tempo do crescimento exponencial (h)

Ou então, aplicando o logaritmo e isolando:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln \frac{x}{x_0}}{\Delta t} \quad (4)$$

A velocidade específica de consumo do substrato é descrita conforme a equação 5:

$$-\frac{dS}{dt} = q_s X \quad (5)$$

Onde: q_s = taxa de remoção de substrato específica (mg S.mg biomassa⁻¹.h⁻¹)

Este parâmetro é extremamente variável e irá depender das características do reator, substrato e biomassa.

As bactérias se multiplicam por fissão binária, na qual a célula original forma dois novos organismos, duplicando a população. O tempo requerido para cada fissão é denominado tempo de geração (tg), é específico para cada microrganismo e pode variar de vários dias para menos de 20 minutos. Na fase exponencial de crescimento, o tempo de geração é determinado pela equação 6 (METCALF & EDDY, 1991; VON SPERLING, 1997).

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (6)$$

Onde: tg = tempo de geração (h)

O fator de conversão substrato-microrganismo é definido como a relação entre a massa de microrganismos produzida e a massa de substrato consumida para tal produção e é obtido através da equação 7.

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (7)$$

Onde: $Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato em microrganismo (mg biomassa.mg S⁻¹)

2.7 Modelagem matemática de crescimento microbiológico

O conhecimento da biocinética é essencial para o projeto e otimização das condições operacionais de sistemas biológicos de tratamento de efluentes (VAVILIN & LOKSHINA, 1996; CONTRERAS et al., 2000).

A modelagem matemática de um crescimento microbiológico tem sido utilizada para estimar os parâmetros requeridos no estudo de crescimento em diferentes condições físicas e químicas, para formular meios microbiológicos apropriados, investigar o efeito de antimicrobianos ou para construir modelos de predição para uso em alimentos e fermentação microbiológica (BARANYI et al., 1993; BUCHANAN, WHITING & DAMERT, 1997; WHITING & BUCHANAN, 1997).

Dentro da modelagem preditiva, o uso de uma função matemática em particular é um meio de classificar modelos. A escolha de um método e sua aplicação específica é largamente determinada pelo número de variáveis (BUCHANAN, 1993).

Existem várias funções sigmoidais que têm sido utilizadas na modelagem de crescimento somático e dinâmicas de população e que poderiam ser aplicadas ao crescimento microbiológico. Apesar do número de equações não lineares diferentes utilizadas como funções do crescimento, não há nenhuma função que seja essencialmente superior às outras (LÓPEZ et al., 2004).

Os modelos cinéticos predizem a concentração e a taxa de crescimento do microrganismo (BUCHANAN, 1993). Pode-se então modelar a taxa de crescimento de um organismo e utilizá-la para efetuar predições baseadas no crescimento exponencial da população microbiológica. Outra aplicação desse método é traçar uma curva de crescimento microbiológico, e então modelar os efeitos de vários fatores ambientais, como a temperatura, nesta função. Ambos os modelos são construídos pela avaliação cuidadosa dos dados coletados em relação ao aumento na biomassa, onde os números são obtidos a partir de um estudo criterioso dos parâmetros intrínsecos e extrínsecos, tais como temperatura, pH ou a_w (atividade de água). Isto permite aos pesquisadores estudarem a fase de adaptação dos microrganismos, o tempo de geração ou ainda a taxa exponencial de crescimento (DICKSON et al., 1992; VAN IMPE et al., 1995).

Os modelos primários descrevem as mudanças do número de microrganismos com o tempo em condições de cultivo determinadas. A resposta pode ser medida diretamente pela contagem celular, formação de toxinas, nível de substrato ou produtos metabólicos, e

indiretamente por absorvância, densidade ótica ou impedância. Se a curva de crescimento é monitorada através da variação do crescimento com o tempo, os dados coletados podem ser graficados através de um modelo primário. Isto então pode gerar informação sobre o desenvolvimento microbiológico, como o tempo de geração, duração da fase lag, taxa de crescimento exponencial e densidade máxima da população microbiana (BUCHANAN, 1993; WHITING & BUCHANAN, 1993; WHITING, 1995).

O modelo de crescimento mais comumente utilizado é o da equação diferencial de primeira ordem, na qual a taxa de crescimento não depende diretamente do tempo. Neste caso estão incluídas as funções de Gompertz, Richards e Logístico.

Os modelos empíricos, tais como a função de Gompertz, são relacionados com conseqüências práticas e simplesmente descrevem os dados nas condições ambientais na forma de uma relação matemática conveniente (GIBSON et al., 1987). A equação original de Gompertz não considera a fase lag, como é o caso de sua forma modificada, mas apenas o aumento da densidade de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial (McMEEKIN & ROSS, 2002). A função de Gompertz é um modelo de crescimento primário comumente utilizado, e não foi originalmente estabelecido para modelar o logaritmo da concentração celular. A função de Gompertz, considerada puramente empírica, foi utilizada para prever fases de adaptação longas e tempos de geração curtos quando comparado com a função de Baranyi (FARBER et al., 1996).

O modelo original e modificado de Gompertz tem como base as Equações 8 e 9, conforme descrito por ZWIETERING et al. (1990).

$$y = A + Ce^{-\exp[B(t-M)]} \quad (8)$$

$$y = A \cdot e^{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]} \quad (9)$$

O modelo logístico descreve o crescimento da população microbiológica em função da concentração inicial, tempo de residência, taxa de crescimento e concentração final. A função logística original foi desenvolvida por Pear & Reed (1920), tendo base os trabalhos iniciais de VERHULST (1838). Estes autores apuraram que, para vários microrganismos, o gráfico do ln crescimento vs. tempo tinha uma forma sigmoidal. Foi verificado ainda que a taxa de aumento do crescimento microbiológico diminuía quando a população se aproximava do ponto de

saturação do ambiente, devido a fatores como redução da disponibilidade de nutrientes, predação, aumento da densidade de microrganismos e liberação de componentes tóxicos no meio. O uso do modelo logístico para descrever o crescimento nesses casos tem sido empírico, entretanto, o modelo pode ser derivado para que os coeficientes tenham significado biológico (WACHENHEIM et al., 2003; PELEG et al., 2007).

$$y = \frac{A+C}{1 + e^{-B(t-M)}} \quad (10)$$

O modelo de Baranyi é considerado um modelo dinâmico, capaz de lidar com condições ambientais que variam com o tempo (BARANYI et al., 1993; BARANYI et al., 1995; BOVILL et al., 2000; DONG et al., 2007). Este fato pode ser confirmado pelos trabalhos desenvolvidos por Baranyi et al., 1995 e Dong et al. (2007), em que foi testado com sucesso para prever o crescimento de *Brochothrix thermosphacta* e *Clostridium sporogenes*, respectivamente, em diferentes condições experimentais. Ao contrário dos demais modelos, a função de Baranyi descreve a fase lag como um processo de ajustamento ao novo ambiente (BARANYI et al., 1993; BARANYI et al., 1995).

O modelo de Baranyi (BARANYI, 1997) pode ser aplicado mediante a utilização das equações 11 e 12.

$$y = \mu_{\max} A(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} \cdot A(t)} - 1}{e^A} \right) \quad (11)$$

Onde:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-\mu_{\max} \cdot t} + e^{-\mu_{\max} \cdot \lambda} - e^{-\mu_{\max} \cdot (t+\lambda)} \right) \quad (12)$$

$$y = \ln \left(\frac{X}{X_0} \right)$$

$$A = \ln \left(\frac{X_{\max}}{X_0} \right)$$

No sentido de avaliar os modelos estabelecidos quanto ao ajuste e exatidão em relação aos valores observados, avaliações internas e externas são aplicadas. Os índices de desempenho dos modelos são obtidos através da Raiz quadrada do erro médio (RMSE), Erro padrão de predição (%SEP), Fator Bias (B_f) e Fator de acuracidade (A_f), calculados através das seguintes expressões (ROSS, 1996), conforme Equações 13-16:

$$\text{Raiz quadrada do erro médio (RMSE):} \quad \text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (\text{obs} - \text{pred})^2}{n}} \quad (13)$$

$$\text{Erro padrão de predição (%SEP):} \quad \% \text{SEP} = \frac{100}{X_{(\text{obs})}} \sqrt{\frac{\sum (\text{obs} - \text{pred})^2}{n}} \quad (14)$$

$$\text{Fator Bias (B}_f\text{):} \quad B_f = 10^{\frac{\sum \log(\text{pred}/\text{obs})}{n}} \quad (15)$$

$$\text{Fator de acuracidade (A}_f\text{):} \quad A_f = 10^{\frac{\sum |\log(\text{pred}/\text{obs})|}{n}} \quad (16)$$

Onde: obs = são os valores observados dos parâmetros de crescimento

pred = são os valores preditos dos parâmetros de crescimento

x_{obs} = são as médias dos valores observados

n = número de observações

A raiz quadrada do erro médio (RMSE) fornece a média da confiabilidade do modelo aos dados utilizados para produzi-lo. Um baixo valor de RMSE indica um bom ajuste aos dados experimentais (ZURERA-COSANO et al., 2006). O erro padrão de predição (%SEP) é utilizado para confirmar a concordância entre os valores observados e preditos. O cálculo deste parâmetro para erros relativos tem a vantagem de não depender da magnitude dos valores observados (ZURERA-COSANO et al., 2006; DONG et al., 2007). Os fatores de predição bias (B_f) e acuracidade (A_f) são os métodos mais comumente utilizados para avaliar a performance de modelos preditivos (ROSS, 1996). Entretanto, quando comparados com método de predição de zonas, B_f e A_f são considerados menos efetivos na detecção de problemas em modelos de crescimento, conforme já mencionado em trabalhos publicados

para *Salmonella* e *Escherichia coli* (OSCAR, 2005). O fator de bias (B_f) é a medida da extensão acima ou abaixo dos valores preditos pelo modelo, sendo um indicativo de um ajuste inadequado do modelo aos dados experimentais. Ross et al. (2000) propôs a seguinte interpretação do fator bias quando utilizado para a avaliação da performance de modelos envolvendo microrganismos patogênicos: 0,90-1,05 pode ser considerado aceitável; <0,70 ou > 1,15 deveria ser considerado inaceitável. Contudo, o valor de B_f não fornece indicação da exatidão média dos valores estimados, e deve ser interpretado com uma certa cautela, pois super-estimacões podem contrabalançar com sub-estimacões dando um B_f próximo da unidade. Uma solução para isto seria a análise da média e do intervalo entre os valores (DONG et al., 2007; LÓPEZ et al., 2007).

A média estimada tende a ser menos precisa com o aumento do valor de A_f , enquanto um valor de 1 indica que há uma consistência perfeita entre os valores preditos e observados (LEBERT et al., 2000). Ross et al. (2000) relataram que um fator de exatidão aceitável poderia ser determinado considerando o efeito do número de parâmetros ambientais no modelo cinético. Uma baixa relação entre os valores observados e preditos pode ser devido ao erro experimental, variabilidade natural e outros fatores adicionais relevantes que influenciam o crescimento nos modelos ou condições de crescimento não limitantes (LÓPEZ et al. 2004; ZURERA-COSANO et al. 2006; DONG et al., 2007).

2.8 Fatores que interferem no cultivo de cianobactérias

Os fatores de maior importância em um cultivo de cianobactérias são a temperatura, nutrientes, pH e para determinados processos a luminosidade (MARTÍNEZ et al., 2000; EHIRA et al., 2003; OBAJA et al., 2003; FONTENOT et al., 2007a).

De la Nöue & Pauw (1998) citaram que para o crescimento das cianobactérias são necessárias concentrações de nutrientes, tais como macronutrientes (carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre) e elementos traços como cobalto, molibdênio, manganês e vitaminas. De acordo com Pearson (1990) a relação entre nutrientes nitrogenados e fosforados (razões N/P) de 10 a 16 origina condições favoráveis para o desenvolvimento de florações de cianobactérias.

A degradação microbiológica depende da quantidade de carbono, nitrogênio e fósforo disponível. Se há pouco nitrogênio presente no meio, por exemplo, os microrganismos não terão como produzir as enzimas necessárias para utilizar o carbono. Por outro lado, se há

excesso de nitrogênio, particularmente na forma de amônia, esta poderá inibir o crescimento (FONTENOT et al., 2007a).

De acordo com Martínez et al. (2000) a temperatura afeta o crescimento de todos os microrganismos, não somente atuando diretamente nas reações químicas que ocorrem durante o crescimento celular mas também indiretamente influenciado a solubilidade do CO_2 e O_2 no meio.

A temperatura tem uma grande influência no metabolismo microbiano, afetando, por conseguinte, as taxas de oxidação da matéria carbonácea e nitrogenada. Em termos gerais, as taxas da maioria das reações químicas e biológicas aumentam com a temperatura, sendo que o crescimento dos microrganismos se mantém até uma temperatura ótima. A temperatura ótima para o crescimento de cianobactérias situa-se entre 25°C e 35°C (VON SPERLING, 1997).

O habitat das cianobactérias se espalha por todo o mundo de lagoas da Antártica a fontes de águas termais. Há espécies psicrotróficas que estão aptas a crescer em temperaturas abaixo de 0°C e espécies termofílicas aptas a crescer em temperaturas acima de 60°C (EHIRA et al., 2003).

Existem três temperaturas referenciais para cada espécie de organismo: temperatura mínima, temperatura ótima e temperatura máxima. As temperaturas mínima e máxima estabelecem limites mínimo e máximo, respectivamente, abaixo/acima do qual não há crescimento, e, na temperatura ótima, a velocidade de crescimento pode atingir o limite máximo. Assim, quanto mais distante a temperatura de operação de um sistema biológico estiver da temperatura ótima, menor será a velocidade crescimento (MADIGAN et al., 2000 apud MENDONÇA, 2002).

A temperatura apresenta um impacto definido na população microbiológica no efluente e pode afetar o processo de nitrificação e desnitrificação. Se for dado um considerável tempo para que a comunidade microbiana possa se aclimatar a uma determinada nova temperatura, a eficiência de remoção de carbono e nitrogênio no tratamento biológico pode então ser aumentada em níveis extremos de temperatura em relação aos valores ótimos (FONTENOT et al., 2007a).

Temperaturas transitórias no tratamento biológico de efluentes podem resultar de variações sazonais as quais no inverno podem representar grande desafio devido à redução da atividade microbiológica e afetar a performance do tratamento. Os efeitos de variações da temperatura no metabolismo, estrutura e características de floculação e sedimentação não são ainda bem entendidos (MORGAN-SAGASTUME & ALLEN, 2003). Wilén et al. (2000)

relataram o aumento da turbidez do efluente assim como fraca floculação quando ocorreu o decréscimo da temperatura de 20°C para 4°C. Morgan-Sagastume & Allen (2003) estudaram o impacto da variação da temperatura de 30°C a 45°C na estabilidade estrutural e carga superficial de flocos de lodo ativado em reator de batelada seqüencial do efluente da indústria de papel, e verificaram que a variação da temperatura alterou as propriedades físico-químicas de floculação do lodo, dificultando o processo de formação dos flocos.

As plantas de tratamento biológico de efluente que apresentam temperaturas elevadas operam tradicionalmente dentro da faixa mesófila (25°C a 35°C). Nos sistemas aeróbicos de tratamento que atuam no limite da faixa mesófila (35°C a 40°C), devido às maiores temperaturas no verão, com a diminuição no inverno podem acarretar na diminuição dos custos de equipamentos de resfriamento através da diluição direta do efluente, porém resultando em instabilidade do sistema, o que se reflete na redução da eficiência de remoção de matéria orgânica e aumento da concentração de sólidos suspensos (MORGAN-SAGASTUME & ALLEN, 2003). Estes autores estudaram os efeitos das variações de temperatura no tratamento biológico aeróbio de efluentes em relação à eficiência do tratamento, descarga de sólidos, propriedades físico-químicas e microbiológicas do lodo. Foi avaliado o efeito de mudanças da temperatura de 35°C a 45°C e 45°C a 35°C. Os autores constataram um decréscimo acima de 20% na eficiência de remoção de DQO, diminuição da sedimentação do lodo e decréscimo nas concentrações de protozoários e metazoários.

No sentido de estabelecer limites de temperatura no processo de nitrificação e desnitrificação quando é utilizado o sistema de batelada seqüencial, Obaja et al. (2003) realizaram experimentos em diferentes temperaturas no tratamento de efluente proveniente de fazendas de criação de porcos, o qual se caracteriza pela alta concentração de íon amônio, podendo alcançar 1650 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺. Os autores concluíram que temperaturas menores que 16°C interferem significativamente nas taxas de remoção de amônio e que a eficiência do tratamento se torna inaceitável a níveis práticos. Foi constatado também que o processo de desnitrificação não foi tão afetado pela temperatura como a nitrificação e, embora a porcentagem de remoção de nitrato tenha sido alta até mesmo nas baixas temperaturas testadas, as taxas de remoção foram notadamente menores.

O decréscimo da taxa de assimilação de nutrientes do meio pode ser um passo limitante para o crescimento de microrganismos à baixa temperatura. Algumas enzimas relacionadas à assimilação estão associadas com membranas, e que a insaturação dos lipídios

das membranas protegem essas enzimas da inativação à baixa temperatura (QUOC & DUBACQ, 1997; SAKAMOTO et al., 1998).

As temperaturas altas podem causar a inativação das enzimas das vias metabólicas enquanto que em temperaturas baixas as atividades enzimáticas são reduzidas, além de ser impedido o fluxo de nutrientes através da membrana celular, resultando em alta demanda para a energia de manutenção (CONVERTI & DOMINGUEZ, 2001).

Renaud et al. (2002) estudaram o efeito da temperatura no crescimento, composição química e composição de ácidos graxos em culturas de quatro espécies de microalgas. Os autores verificaram que três das espécies alcançaram crescimento máximo a temperaturas entre 25°C e 30°C, com menor crescimento e declínio do número de células a temperaturas acima de 30°C. Foram atribuídos a isso o rompimento do metabolismo celular e a morte das células.

2.9 Tratamento físico-químico por coagulação/floculação

O processo de coagulação/floculação consiste de três etapas distintas. Primeiro o coagulante é adicionado ao efluente e uma rápida e intensa mistura é iniciada. O objetivo é obter a completa mistura do coagulante com o efluente para maximizar a eficiência da desestabilização das partículas coloidais e iniciar a coagulação. Os parâmetros críticos para esta etapa são a duração e a intensidade ou velocidade da agitação. Na segunda etapa a suspensão é agitada lentamente para aumentar o contato entre as partículas e facilitar o desenvolvimento dos flocos. Novamente a duração e a intensidade da floculação são os parâmetros críticos. A terceira etapa consiste em encerrar o mecanismo de agitação e permitir que o floco formado sedimente (EBELING et al., 2003).

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. Para uma concentração de cloreto de cálcio igual a 50 mg.L⁻¹, os testes mostraram uma redução na Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 12 mg.L⁻¹ e turbidez igual 3 NTU, considerando que os valores médios de DQO e turbidez no efluente são 46 mg O₂ L⁻¹ e 16 NTU, respectivamente.

A coagulação é geralmente utilizada para eliminar substâncias orgânicas. Por outro lado, os produtos normalmente usados não têm efeito na eliminação de corantes solúveis. 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. Esse processo, principalmente quando é seguido pela sedimentação, evidentemente remove quantidades consideráveis de contaminantes que causam obstrução de membranas, como as utilizadas, por exemplo, na microfiltração e osmose reversa (KIM et al., 2005; ALLÈGRE et al., 2006).

A hidrólise de agentes coagulantes como do FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ no meio alcalino resulta na formação de hidróxidos dos sais correspondentes carregados positivamente na forma de monômeros ou polímeros. Os compostos carregados positivamente se combinam com cargas negativas provenientes das partículas coloidais presentes no efluente através de um mecanismo de neutralização das cargas e após um tempo de sedimentação pela ação da gravidade ocorrerá a separação do precipitado do efluente (GABELICH et al., 2002; EBELING et al., 2003; WANG et al., 2007).

No processo de coagulação/floculação a remoção do fósforo presente no efluente pode ser das seguintes formas: os fosfatos são incorporados aos sólidos em suspensão e a redução destes durante o processo incluirão a remoção do fósforo; adsorção direta dos íons fosfato nos produtos de hidrólise formados pelo íon metálico usado como coagulante; a remoção através da formação de precipitados de fosfato com os sais metálicos utilizados como coagulantes. A remoção de matéria orgânica e nitrogênio está relacionada com a remoção de material coloidal, por precipitação ou adsorção junto ao floco, sendo o nitrogênio representado em grande parte pela composição em proteínas, consideradas parcialmente hidrofóbicas, devido à presença de grupos $-\text{CH}_2$, e parcialmente hidrofílicas, devido aos grupos amino e carboxil que realizam as ligações peptídicas (VOLK et al., 2000; AGUILAR et al., 2002; EBELING et al., 2003).

Estudos comparativos entre FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ demonstraram que o primeiro possibilita a produção de uma água decantada de melhor qualidade em relação aos parâmetros DQO, SS e nutrientes (VOLK et al., 2000; EBELING et al., 2003, AL-MUTAIRI et al., 2004).

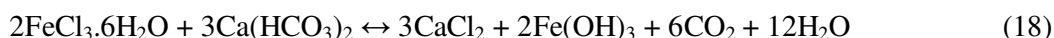
A principal desvantagem do uso de sulfato de alumínio é a limitada faixa de pH de 6,5-7,5 em que é mais efetivo. Por outro lado a faixa ótima de pH do cloreto férrico é mais ampla, e abrange de 4-11. O floco de hidróxido férrico é também mais pesado do que o floco de alumínio, aumentando a característica de sedimentação, podendo assim reduzir o tamanho

do clarificador (EBELING et al., 2003). Quando o sulfato de alumínio é adicionado ao efluente, a seguinte reação ocorre:



Um dos produtos formados, o hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), é um floco gelatinoso insolúvel que sedimenta vagarosamente, arrastando consigo o material em suspensão. Nesta reação é requerida alcalinidade e, se não está disponível deve ser adicionada na taxa de 0,45 mg.L^{-1} como CaCO_3 para cada 1 mg.L^{-1} de sulfato de alumínio.

De forma similar para o cloreto férrico:



O hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) é também um floco gelatinoso insolúvel que sedimenta arrastando consigo o material em suspensão. A alcalinidade também é requerida e, se não está disponível deve ser adicionada na taxa de 0,55 mg.L^{-1} como CaCO_3 para cada 1 mg.L^{-1} de sulfato de alumínio (EBELING et al., 2003).

Se o pH do sistema for muito baixo ($\text{pH} = 2,0-4,0$) os íons hidrogênio irão competir com alumínio para DQO, SS e turbidez, resultando em uma remoção pobre de contaminantes. Por outro lado, valores altos de pH poderão produzir cargas negativas em que a adsorção será eletrostaticamente impedida (Al-MUTAIRI et al., 2004).

Rizzo et al. (2008) realizaram um estudo comparativo entre quitosana e sais metálicos como agentes coagulantes. As amostras foram sujeitas a uma agitação rápida de 100 rpm por 1 min seguido de agitação lenta de 30 rpm por 30 min e a subsequente sedimentação por 60 min. O composto cloreto férrico foi considerado o melhor coagulante em todas as condições de pH (5, 6, 7 e 7,65) para a remoção de matéria orgânica e turbidez.

3 Referências

- ABDESSEMED, D.; NEZZAL, G. (2002). Treatment of primary effluent by coagulation-adsorption-ultrafiltration for reuse. *Desalination*, v. 152, p. 367-373.
- ABDESSEMED, D.; NEZZAL, G. (2005). Tertiary treatment of a secondary effluent by the coupling of coagulation-adsorption-ultrafiltration for reuse. *Desalination*, v. 175, p. 135-141.

- ACHOUR, M.; KHELIFI, O.; BOUAZIZI, I.; HAMDI, M. (2000). Design of an integrated bioprocess for the treatment of tuna processing. Liquid effluents. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1013-1017.
- AFONSO, M.D.; BÓRQUEZ, R. (2002). Review of the treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes – prospects of the ultrafiltration of wastewaters from the fish meal industry. *Desalination*, v. 142, p. 29-45.
- AGUILAR, M.I.; SÁEZ, J.; LLORÉNS, M.; SOLER, A.; ORTUÑO, J.F. (2002). Nutrient removal and sludge production in the coagulation-flocculation process. *Water Research*, v. 36, p. 2910-2919.
- ALLÈGRE, C.; MOULIN, P.; MAISSEU, M.; CHARBIT, F. (2006). Treatment and reuse of reactive dyeing effluents. *Journal of Membrane Science*, v. 269, p. 15-34.
- AI-MUTAIRI, N.Z.; HAMODA, M.F.; AI-GHUSAIN, I. (2004). Coagulant selection and sludge conditioning in a slaughterhouse wastewater treatment plant. *Bioresource Technology*, v. 95, p. 115-119.
- ALONSO, D.; MAROTO, F. (2000). Plants as ‘chemical factories’ for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 481-497.
- ANAND, N. Cyanobacterial Taxonomic – Classical Concepts and Modern Trends. In: Subramanian, G.; Kaushik, B. D.; Venkataraman, G.S. *Cyanobacterial Biotechnology*. Science Publishers. p. 337-340, 1998.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. (2000). Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 459-479.
- ARAÚJO, K.G.L.; FACCHINETTI, A.D.; SANTOS, C.P. (2003). Influência da ingestão de biomassas de spirulina (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 6-9.
- ARAÚJO, S.C.; GARCIA, V.M.T. (2005). 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.
- ARROJO, B.; MOSQUERA-CORRAL, A.; GARRIDO, J.M.; MÉNDEZ, R. (2004). Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors. *Water Research*, v. 38, p. 3389-3399.
- ASLAN, S.; KAPDAN, I.K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, v. 28, p. 64-70.
- ASPÉ, E.; MARTÍ, M.C.; ROECKEL, M. (1997). Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum. *Water Research*, v. 31, p. 2147-2160.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill International Editions. Chemical Engineering Series. 984p., 1986.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A.; McCLURE, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, v. 10, p. 43–59.

BARANYI, J.; ROBINSON, T.P.; KALOTI, A.; MACKEY, B.M. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology*, v. 27, p. 61-75.

BARANYI, J. (1997). Simple is good as long as it is enough. *Food Microbiology*, v. 14, p. 189–192.

BASHAN, L.E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J.P.; BASHAN, Y. (2002). 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.

BASTOS, R. G. et al. 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. (2004). 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.

BHAT, V.B.; MADYASTHA, K.M. (2001). Scavenging of peroxyxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 285, p. 262-266.

BECKER, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 207-210.

BELARBI, EL-HASSAN; MONINA, E.; CHISTI, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 951-969.

BELTRAN-HEREDIA, J.; TORREGROSA, J.; DOMINGUEZ, J.R.; GARCIA, J. (2000). Aerobic biological treatment of black table olive washing wastewaters: effect of an ozonation stage. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1183-1190.

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

BERTOLA, N.; PALLADINO, L.; BEVOLACQUA, A.; ZARITZKY, N. (1999). Optimization of the design parameters in an activated sludge system for the wastewater treatment of a potato processing plant. *Journal of Food Engineering*, v. 40, p. 27-33.

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

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução à química de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992.

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

BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. (2000). Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*, v. 59, p. 157-165.

BRASIL. CEPERG/RS – Centro de Pesquisa do Rio Grande /RS. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Desembarque de pescado no Rio Grande do Sul. 2007.

BRASIL. Lei Federal n.º 9.077, Portaria n.º 05/89. Norma Técnica n.º 01/89 da Secretaria da Saúde e Meio Ambiente, 4 de junho de 1990.

BRIAND, J.F.; ROBILLOT, C.; QUIBLIER-LLOBÉRAS, C.; HUMBERT, J. F.; COUTÉ, A.; BERNARD, C. (2002). Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Research*, v. 36, p. 3183-3192.

BUCHANAN, R.L. (1993). Predictive food microbiology. *Trends Food Science and Technology*, v. 4, p. 6-11.

BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C.; DAMERT, W.C. (1997). When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, v. 14, p. 313-326.

BURGESS, J.E.; PARSONS, S.A.; STUETZ, R.M. (2001). Developments in odor control and waste gas treatment biotechnology: a review. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 35-63, 2001.

CAMPOS, C.; GUERRERO, A.; CÁRDENAS, B. (2002). Removal of bacterial and viral fecal indicator organisms in a waste stabilization pond system in Choconta, Cundinamarca. *Water Science and Technology*, v. 45, p. 61-66.

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

CARRERA, J.; VICENT, T.; LAFUENTE, J. (2004). Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2035-2041.

CARVALHO, P.O.; SILVA, M.T.C.; PARK, Y.K. (1995). Produção de ácido γ -linolênico por novas linhagens de microorganismos. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas.

- CASANI, S.; LETH, T.; KNOCHER, S. (2006). Water reuse in a shrimp processing. Line: Safety considerations using a HACCP approach. *Food Control*, v. 17, p. 540-550.
- CHEN, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, v. 14, p. 421-426.
- CHERNICHARO, C.A. *Reatores anaeróbios*. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFMG, 1997, 246 p.
- CONTRERAS, E.M.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N.E. (2000). Growth kinetics of the filamentous microorganism *Sphaerotilus natans* in a model system of a food industry wastewater. *Water Research*, v. 34, p. 4455-4463.
- CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J.M. (2001). Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 75, p. 39-45.
- COOLINS, G.A.; THEIS, T.L.; KILAMBI, S.; HE, L.; PAVLOSTATHINS, G.S. (1998). Anaerobic treatment of low-strength domestic wastewater using an anaerobic expanded bed reactor. *Journal of Environmental Engineering*, v. 124, p. 652-659.
- COSTA, F.C.; CAMPOS, J.C.; SANT'ANNA JR, G.L.; DEZOTTI, M. (2003). Aplicação de carvão ativado em pó (CAP) ao processo biológico de tratamento de um efluente da indústria química. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 9, p. 170-176.
- CRAGGS, R.J.; McAULEY, O.J.; SMITH, V.J. (1997). Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Research*, v. 31, p. 1701-1707.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. *Biotechnologia, Manual de Microbiologia Industrial*. Zaragoza: Editora Acribia, 1993.
- DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUÍ, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. (2002). 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.
- De La NOÛE, J.; LALIBERTÉ, G.; PROULX, D. (1992). Algae and wastewater. *Journal Applied Phycology*, v. 4, p. 247-254.
- De La NOÛE, J.; LESSARD, P.; DUMAS, A. (1998). Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacteria *Phormidium bohneri*. *Aquacultural Engineering*, v. 17, p. 57-68.
- DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, p. 151-175.
- DEVI, M.A.; SUBBULAKSHMI, G.; DEVI, K.M.; VENKATARAMAN, L.V. (1981). Studies on the proteins of mass-cultivated, blue-green alga (*Spirulina platensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, p. 522-525.

- DICKSON, J.S. ; SIRAGUSA, G.R. ; WRAY, Jr. J.E. (1992). Predicting the growth of *Salmonella typhimurium* on beef by using the temperature function integration technique. *Applied and Environment Microbiology*, v. 58, p. 3482-3487.
- DONG, Q., TU, K., GUO, L., LI, H., ZHAO, Y. (2007). Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions. *Food Microbiology*, 24, 624-632.
- DORTCH, Q. ; CONWAY, H.L. (1984). Interactions between nitrate and ammonium uptake : variation with growth rate, nitrogen source and species. *Marine Biology*, v. 78, p. 151-164.
- DORTCH, Q.; POSTEL, J.R. (1989). Biochemical indicators for N utilization by phytoplankton during upwelling off the Washington coast. *Limnology and Oceanography*, v. 34, p. 758-773.
- EBELING, J.M.; SIBRELL, P.L.; OGDEN, S.R.; SUMMERFELT, S.T. (2003). 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.
- EHIRA, S. ; HAMANO, T. ; HAYASHIDA, T. ; KOJIMA, K. ; NAKAMOTO, H. ; HIYAMA, T. ; OHOMORI, M. ; SHIVAJI, S. ; SATO, N. (2003). Conserved temperature-dependent expression of RNA-binding proteins in cyanobacteria with different temperature optima. *FEMS Microbiology Letters*, v. 225, p. 137-142.
- EL-SHEEKH, M.M.; EL-SHOUNY, W.A.; OSMAN, M.E.H; EL-GAMMAL, E.W.E. (2005). Growth and heavy metals removal efficiency of *Nostoc muscorum* and *Anabaena subcylindrica* in sewage and industrial wastewater effluents. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 19, p. 357-365.
- FAO/WHO. *Report of ad Hoc Expert Committee on Energy and Protein Requeriments*. Tech. Report. Series 522. Roma, 1985.
- FABER, J.M.; CAI, Y.; ROSS, W.H. (1996). Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *International Journal of Food Microbiology*, v. 32, p. 133-144.
- FAY, P. *The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)*. First published in Great Britain. p. 01-88, 1983.
- FIKAR, M.; CHACHUAT, B.; LATIFI, M.A. (2005). Optimal operation of alternating activated sludge processes. *Control Engineering Practice*, v. 13, p. 853-861.
- FDZ-POLANCO, F.; MÉNDEZ, E.; URUEÑA, M.A.; VILLAVÉRDE, S; GARCÍA, P.A. (2000). Spatial distribution of heterotrophs and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification. *Water Research*, v. 34, p. 4081-4089.
- FIDALGO, J.P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. (1998). 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.

FLYNN, K.J.; DAVIDSON, K.; LEFTLWY, J.W. (1994). Carbon:nitrogen relations at whole cell and free amino acid levels during batch growth of *Isochrysis galbana* (Prasinophyceae) under conditions of alternating light and dark. *Marine Biology*, v. 188, p. 229-237.

FONTENOT, Q.; BONVILLAIN, C.; KILGEN, M.; BOOPATHY, R. (2007a). Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1700-1703.

FONTENOT, Q.; BONVILLAIN, C.; KILGEN, M.; BOOPATHY, R. (2007b). Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1700-1703.

FREIRE, R.S.; PLEGRINI, R.; KUBOTA, L.T. (2000). Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v. 23, p. 504-511.

FUENTES, M.M.R.; FERNÁNDEZ, G.G.A.; PÉREZ, J.A.S.; GUERRERO, J.L.G. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, v. 70, p. 345-353.

GABELICH, C.J.; YUN, T.I.; COFFEY, B.M.; SUFFET, I.H.M. (2002). Effects of aluminum sulfate and ferric chloride coagulant residuals on polyamide membrane performance. *Desalination*, v. 150, p. 15-30.

GALLUZZO, M.; DUCATO, R.; BARTOLOZZI, V.; PICCIOTTO, A. (2001). Expert control of DO in the aerobic reactor of an activated sludge process. *Computers and Chemical Engineering*, v. 25, p. 619-625.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, J.M.; DIEZ, J. (2004). Adaptive mechanisms of nitrogen and carbon assimilatory pathways in the marine cyanobacteria *Prochlorococcus*. *Research in Microbiology*, v. 155, p. 795-802.

GERNAEY, K.V.; LOOSDRECHT, M.C.M.; HENZE, M.; LIND, M.; JØRGENSEN, S.B. (2004). Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation: state of the art. *Environmental Modelling & Software*, v. 19, p. 763-783.

GIBSON, A.M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T.A. (1987). The effect of NaCl and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 62, p. 479-490.

GONZALEZ, J.F. *Wastewater treatment in the fishery industry*. Rome: Fisheries Technical Paper, n. 355, 1995. 52 p.

GONZÁLEZ, L.E.; CAÑIZARES, R.O.; BAENA, S. (1997). 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.

- GONZALEZ, L.E.; BASHAN, Y. (2000). Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environment Microbiology*, 66, 1527-1531.
- GRIMA, E.M.; BELARBI, E.H. FERNÁNDEZ, F.G.A.; MEDINA, A.R.; CHISTI, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 491-515.
- HAVENS, K.E.; JAMES, R.T.; EAST, T.L.; SMITH, V.H. (2003). N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution*, v. 122, p. 379-390.
- HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A.M.; FLORES, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 411-425.
- HOEK, C.V.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. *Algae: An introduction to phycology*. Oakleigh: Cambridge University Press, 1995.
- HORNES, M.O.; QUEIROZ, M.I. Evaluation of the growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in effluent of fishing industry. In: *16th International Congress of Chemical and Process Engineering*, 2004, Prague.
- HORNES, M.O.; CAMERINE, F.V.; QUEIROZ, M.I. Efeito da amônia no crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli e caracterização do efluente da indústria da pesca. In: *V Simpósio latino americano de ciência e tecnologia de alimentos*, 2004, Campinas.
- HUANG, X.; LIU, R.; QIAN, Y. (2000). Behavior of soluble microbial products in a membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 401-406.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; QUEIROZ, M.I.; NETTO, F.M. (2006). 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.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; PINTO, L.A.A.; QUEIROZ, M.I. (2007). Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Chemical Engineering and Process*, v. 46, p. 63-69.
- JEFFERSON, B.; BURGESS, J.E.; PICHON, A.; HARKNESS, J.; JUDD, S.J. (2001). Nutrient addition to enhance biological treatment of greywater. *Water Research*, v. 35, p. 2702-2710.
- JIANLONG, W.; HANCHANG, S.; YI, Q. (2000). Wastewater treatment in a hybrid biological reactor (HBR): effect of organic loading rates. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 297-303.
- JIMÉNEZ, J.M.; MARTINÉZ, M.E.; YOUSFI, F.E. (1999). Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 67, p. 233-240.

- JIMÉNEZ, J.M.; COSSÍO, B.; LABELLA, D.; NIEL, X. (2003). The feasibility of industrial production of *Spirulina* in Southern Spain. *Aquaculture*, v. 217, p. 179-190.
- JONES, A.; DENNISON, W.; PRESTON, N. (2001). Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture*, v. 193, p. 155-178.
- KARGI, F.; UYGUR, A.; BASKAYA, H.S. (2005). Phosphate uptake and release rates with different carbon sources in biological nutrient removal using a SBR. *Journal of Environmental Management*, v. 76, p. 71-75.
- KIM, J.K.; LEE, BUM-KYY. (2000). Mass production of *Rhodopseudomonas palustris* as diet for aquaculture. *Aquacultural Engineering*, v. 23, p. 281-293.
- KIM, SEUNG-HYUN; MOON, SEONG-YONG; YOON, CHO-HEE; YIM, SEONG-KEUN; CHO, JAE-WEON (2005). Role of coagulation in membrane filtration of wastewater for reuse. *Desalination*, v. 173, p. 301-307.
- KIRBY, R.M.; BARTRAM, J.; CARR, R. (2003). Water in food production and processing: quantity and quality concerns. *Food Control*, v. 14, p. 283-299.
- KOMOROWSKA-KAUFMAN, M.; MAJCHEREK, H.; KLACZYNSKI, E. (2006). Factors affecting the biological nitrogen removal from wastewater. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1015-1021.
- LEBERT, I.; ROBLES-OLVERA, V.; LEBERT, A. (2000). Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 27-39.
- LEBSKY, V. K.; GONZALEZ-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. (2001). Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalgae *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 1-8.
- LEE, B.K.; KIM, J.K. (2001). Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*, v. 25, p. 111-124.
- LEHNINGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1991. 725p.
- LIM, J.; KIM, T.; HWANG, S. (2003). Treatment of fish-processing wastewater by co-culture of *Candida rugopelliculosa* and *Brachionus plicatilis*. *Water Research*, v. 37, p. 2228-2232.
- LIU, Y.; CHEN, G.H.; ROLS, J.L. (1999). A kinetic model incorporating energy spilling for substrate removal in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, p. 647-651.
- LIU, R.; HUANG, X.; CHEN, L.; WEN, X.; QIAN, Y. (2005). Operational performance of a submerged membrane bioreactor for reclamation of bath wastewater. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 125-130.

- LÓPEZ, S.; PRIETO, M.; DIJKSTRA, J.; DHANOA, M.S.; FRANCE, J. (2004). Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology*, v. 96, p. 289-300.
- LORETO, C.; ROSALES, N.; BERMÚDEZ, J.; MORALES, E. (2003). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Botánica*, v. 60, p. 83-89.
- LOURENÇO, S.O.; MÁRQUEZ, U.; FILHO, J.M.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. (1997). Changes in Biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Composition of two culture media. *Aquaculture*, v. 148, p. 153-168.
- LOW, E.W.; CHASE, H.A. (1999). Reducing production of excess biomass during wastewater treatment. *Water Research*, v. 33, p. 1119-1132.
- LUCAS, A.P.C. *Tratamento anaeróbico de efluentes da indústria de pescado em reator UASB*. Rio Grande, Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG. 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), 1999.
- LUQUE, I.; VÁZQUEZ-BERMÚDEZ, M.F.; PAZ-YEPES, J.; FLORES, E.; HERRERO, A. (2004). In vivo activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiology Letters*, v. 236, p. 47-52.
- MACCOLL, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, v. 124, p. 311-334.
- MARTÍNEZ, M.E.; JIMÉNEZ, J.M.; EL YOUSFI, F. (2000). Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 67, p. 233-240.
- McMEEKIN, T.A.; ROSS, T. (2002). Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, v. 78, p. 133-153.
- MENDONÇA (2002) Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbico de leito expandido, Tese de doutorado
- METCALF & EDDY. *Wastewater Engineering: Treatment, disposal, reuse*. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 920p, 1991.
- MINKOVA, K.M.; TCHERNOV, A.A.; TCHORBADJIEVA, M.I.; FOURNADJIEVA, S.T.; ANTOVA, R.E.; BUSHEVA, M.Ch. (2003). Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 102, p. 55-59.
- MOHAN, S. V.; RAO, N.C.; PRASAD, K.K. (2005). Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1501-1508.

- MORENO, J.; VARGAS, M. Á.; RODRÍGUEZ, H. (2003). Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biomolecular Engineering*, v. 20, p. 191-197.
- MORGAN-SAGASTUME, F.; ALLEN, D.G. (2003). Effects of temperature transient conditions on aerobic biological treatment of wastewater. *Water Research*, v. 37, p. 3590-3601.
- MORI, S.; CASTORENO, A.; MULLIGAN, M.E.; LAMMERS, P.J. (2003). Nitrogen status modeluates the expression of RNA-binding proteins in cianobactéria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 227, p. 203-210.
- MORIST, A.; MONTESINOS, J.L.; CUSIDÓ, J.A.; GÒDIA, F. (2001). Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 535-547.
- MULKERRINS, D.; DOBSON, A.D.W.; COLLERAN, E. (2004). Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environment International*, v. 30, p. 249-259.
- MURO-PASTOR, M.I.; FLORÊNCIO, F.J. (2003). Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 595-603.
- NAKHLA, G.; LIU, V.; BASSI, A. (2006). Kinetic modeling of aerobic biodegradation of high oil and grease rendering wastewater. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 131-139.
- NIELL, F.; COSSIO, R.; JIMENÉZ, C. (2003). Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture*, v. 217, p.179-190.
- NUÑEZ, V.J.; VONTOLINA, D.; NIEVES, M.; PINA, P.; MEDINA, A.; GUERRERO, M. (2001). Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 78, p. 161-164.
- OBAJA, D.; MACÉ, S.; COSTA, J.; SANS, C.; MATA-ALVAREZ, J. (2003). Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, v. 87, p. 103-111.
- OGBONNA, J.C.; TANAKA, H. (2000). Production of pure photosynthetic cell biomass for environmental biosensors. *Materials Science and Engineering C*, v. 12, p. 9-15.
- OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; ÂNGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. (2001). 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.
- OLVERA-RAMÍREZ, R.; CORIA-CEDILLO, M.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; PONCE-NOYOLA, T.; RIOS-LEAL, E. (2000). Growth evaluation and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 121-124.

OSCAR, T.P. (2005). Development and validation of primary, secondary, and tertiary models for growth of *Salmonella typhimurium* on sterile chicken. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 2606-2613.

PADYANA, A.K.; BHAT, V.B.; MADYASTHA, K.M.; RAJASHANKAR, K.R.; RAMAKUMAR, S. (2001). Crystal structure of a light-harvesting protein c-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 282, p. 893-898.

PARK, E.; ENANDER, R.; BARNETT, S.M.; LEE, C. (2001). Pollution prevention and biochemical oxygen demand reduction in a squid processing facility. *Journal of Cleaner Production*, v. 9, p. 341-349.

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

PELEG, M.; CORRADINI, M.G.; NORMAND, M.D. (2007). The logistic (Vershulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Research International*, v. 40, p. 808-818.

PERNET, F.; TREMBLAY, R.; DEMERS, E.; ROUSSY, M. (2003). Variation of lipid and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isocrysis* sp. grown in semi-continuous system. *Aquaculture*, v. 221, p. 393-406.

PIVOKONSKY, M.; KLOUCEK, O.; PIVOKONSKA, L. (2006). Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research*, v. 40, p. 3045-3052.

QUEIROZ, M.I.; KOETZ, P.R.; TREPTOW, R.O. The *Nageli microscopica* *Aphanothece* potential in the production of the single-cell protein from the remaining water. In: CHAMES, S.W., CÁNOVAS-BARBOSA, G.V. and AGUILERA, J.M. (Ed.) *Proceedings of the eighth International Congress on Engineering and Food (ICEF 8)*, Pennsylvania, USA, p. 2027-2031, 2001.

QUEIROZ, M.I.; BASTOS, R.G.; BENERI, R.L.; ALMEIDA, R.G. (2002). 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.

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

QUEIROZ, M.I.; BENERI, R.; BASTOS, R.; ALMEIDA, R. (2004a). Single-cell protein production by *Aphanothece microscopica* *Nägeli* in rice parboiled effluent. *Food Science and Biotechnology*, v. 13, p. 142-150.

QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L.W. Cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* *Nägeli* visando a produção de proteína e ácidos graxos. *XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, 2005.

QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L.Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. (2007). 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.

QUOC, K.P.; DUBACQ, JEAN-PAUL (1997). Effect of growth temperature on the biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1346, 237-246.

RAFECAS, I.; ESTEVE, M.; FERNANDEZ-LOPES, A.; REMESAR, X.; ALEMANY, M. (1994). Whole-rate protein content estimation: applicability of the N x 6,25 factor. *British Journal of Nutrition*, v. 72, p. 199-209.

RAJOKA, M.I.; KHAN, S.H.; JABBAR, M.A.; AWAN, M.S.; HASHMI, A.S. (2006). Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1934-1941.

RAMALHO, R.S. *Introduction to wastewater treatment processes*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 580p, 1983.

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

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H; EMPIS, J.A.; NOVAIS, J.M. (1998). Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc sp.* *Bioresource Technology*, v. 66, p. 181-187.

RENAUD, S.M.; THINH, LUONG-VAN; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D.L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, v. 211, p. 195-214.

REYES-AVILA, J.; RAZO-FLORES, E.; GOMEZ, J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*, v. 38, p. 3313-3321.

RICHMOND, A.; VONSHAK, A. (1988). Mass production of the blue green alga *Spirulina* - An overview. *Biomass*, v. 2, p. 233-245.

RIZZO, L.; DI GENNARO, A.; GALLO, M.; BELGIORNO, V. (2008). Coagulation/chlorination of surface water: A comparison between chitosan and metal salts. *Separation and Purification Technology*, v. 62, p. 79-85.

ROMÁN, R.B., ALVÁREZ-PEZ, J.M.; FERNÁNDEZ, F.G.A.; GRIMA, E.M. (2002). Recovery of pure β -phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 73-85.

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

- ROSS, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 81, p. 501–508.
- ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. (2000). Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 62, p. 231-245.
- RUIZ, R.L.; MÓS, E.N. (1990). Produção de biomassa de *Spirulina maxima* para alimentação humana e animal. *Revista de Microbiologia*, v. 21, p. 85-97.
- RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. (2003). Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research*, v. 37, p. 1371-1377.
- SAHA, S. K.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. (2003). Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 45, p. 263-272.
- SAKAMOTO, T.; SHEN, G.; HIGASHI, S.; MURATA, N.; BRYANT, D.A. (1998). Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. *Archives of Microbiology*, v. 169, p. 20-28.
- SALTER, H.E.; BOYLE, L.; OUKI, S.K.; QUARMBY, J.; WILLIAMS, S.C. (1999). The performance of tertiary lagoons in the United Kingdom. *Water Research*, v. 33, p. 3775-3781.
- SANTIAGO-SANTOS, M.C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. (2004). Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2047-2052.
- SANTOS, G.M.; MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R.M. (2003). Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 17-21.
- SARKAR, B.; CHAKABARTI, P.P. VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. (2006). Wastewater treatment in dairy industries – possibility of reuse. *Desalination*, v. 7, p. 141-152.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos*. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. (2002). Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas implicações nas propriedades funcionais. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 36, p. 83-94.
- SHI, XIAN-MING; LIU, HUI-JUN; ZHANG, XUE-WU; CHEN, F. (1999). Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 341-347.

- SHI, XIAN-MING; ZHANG, XUE-WU; CHEN, F. (2000). Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 312-318.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p. 87-96.
- SUNG, S.; SANTHA, H. (2003). Performance of temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) system treating dairy cattle wastes. *Water Research*, v. 37, p. 1628-1636.
- TACON, A.G.J.; JACKSON, A.J. (1985). Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. *Nutrition and Feeding in Fish*, v. 14, p. 119-145.
- TANG, D.; SHI, S.; LI, D.; HU, C.; LIU, Y. (2007). Physiological and biochemical responses of *Scytonema javanicum* (cyanobacterium) to salt stress. *Journal of Arid Environments*, v. 71, p. 312-320.
- TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. (2000). Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, v. 107, p. 145-151.
- THAJUDDIN, N.; SUBRAMANIAN, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, v. 89, p. 46-57.
- TING, C.S.; ROCAP, G.; KING, J.; CHISHOLM, S.W. (2002). Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends in Microbiology*, v. 10, p. 134-142.
- TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M.K. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 1144-1148.
- TORRE, P.; SASSANO, C.E.N.; SATO, S.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; CARVALHO, J.C.M. (2003). Fed-batch addition of urea for *Spirulina platensis* cultivation. Thermodynamics and material and energy balances. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 698-707.
- TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M.F. (2006). Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggy waste. *Ecological Engineering*, v. 28, p. 158-165.
- TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H. *Biotechnología: Principios biológicos*. Zaragoza: Acribia, 1990.
- UZAL, N.; GÖKÇAY, C.F.; DEMIRER, G.N. (2003). Sequential (anaerobic/aerobic) biological treatment of malt whisky wastewater. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 279-286.
- VAN IMPE, J.F.; NICOLAI, B.M.; SCHELLEKENS, M.; MARTENS, T.; DE BAERDEMAEKER, J. (1995). Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiology*, v. 25, p. 227-249.

- VAVILIN, V.A.; LOKSHINA, L.Y. (1996). Modeling of volatile fatty acids degradation kinetics and evaluation of microorganism activity. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 69-80.
- VISKARI, P.J.; COLYER, C.L. (2002). Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 972, p. 269-276.
- VISKARI, P.J.; COLYER, C.L. (2003). Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry*, v. 319, p. 263-271.
- VOLK, C.; BELL, K.; IBRAHIM, E.; VERGES, D.; AMY, G.; LECHEVALLIER, M. (2000). Impact of enhanced and optimized coagulation on removal of organic matter and its biodegradable fraction in drinking water. *Water Research*, v. 34, p. 3247-3257.
- VOLTOLINA, D.; GÓMEZ-VILLA, H.; CORREA, G. (2005). Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 359-362.
- VON RÜCKERT, G.; GIANI, A. (2004). Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, p. 325-331.
- VON SPERLING, M. *Lagoas de estabilização. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, v. 3, 1997.
- VON SPERLING, M. (2001). Dimensionamento de lodos ativados por batelada utilizando os princípios da teoria de fluxo de sólidos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 6, p. 147-156.
- WACHENHEIM, D.E.; PATTERSON, J.A.; LADISCH, M.R. (2003). Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 157-164.
- WALSH, K.; JONES, G.J.; DUNSTAN, R.H. (1997). Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa*. *Phytochemistry*, v. 44, p. 817-823.
- WANG, T.C.; WEISSMAN, J.C.; RAMESH, G.; VARADARAJAN, R.; BENEMANN, J.R. (1998). Heavy metal binding and removal by *Phormidium*. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, v. 60, p. 739-744.
- WANG, Y.; HUANG, X.; YUAN, Q. (2005). Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic/aerobic membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1733-1739.
- WANG, J.P.; CHEN, Y.Z.; GE, X.W.; YU, H.Q. (2007). Optimization of coagulation-flocculation process for a paper-recycling wastewater treatment using response surface methodology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v. 302, p. 204-210.

WHEATON, F.W.; LAWSON, T.B. *Processing aquatic food products*. New York: John Wilwy & Sons, 1985.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. (1993). A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology*, v. 10, p. 175-177.

WHITING, R.C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food and Science Nutrition*, v. 35, p. 464-494.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. (1997). Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology*, v. 36, p. 111-125.

WILÉN, B.M.; NIELSEN, J.L.; KEIDING, K.; NIELSEN, P.H. (2000). Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids and Surfaces B*, v. 18, p. 145-156.

XU, W.; TANG, H.; WANG, Y.; CHITNIS, P. (2001). Proteins of the cyanobacterial photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1507, p. 32-40.

YUAN, Z.; BOGAERT, H.; LETEN, J.; VERSTRAETE, W. (2000). Reducing the size of a nitrogen removal activated sludge plant by shortening the retention time of inert solids via sludge storage. *Water Research*, v. 34, p. 539-549.

YONG, M.; YONGZHEN, P.; JEPPSSON, U. (2006). Dynamic evaluation of integrated control strategies for enhanced nitrogen removal in activated sludge processes. *Control Engineering Practice*, v. 14, p. 1269-1278.

ZEHR, J.P.; WARD, B.B. (2002). Nitrogen cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, p. 1015-1024.

ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. (2008). Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1311-1316.

ZHAO, J.; SHEN, G.; BRYANT, D.A. (2001). Photosystem stoichiometry and state transitions in a mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 lacking phycocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1505, p. 248-257.

ZURERA-COSANO, G.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, R.; HERVAS-MARTÍNEZ, C. (2006). Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. *Food Control*, v. 17, p. 429-438.

ZWIETERING, M.H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN'T RIET, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environment Microbiology*, v. 56, p. 1875-1881.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

**Influência da temperatura na remoção de nutrientes do efluente da indústria
processadora de pescado por *Aphanothece microscopia* Nägeli**

Influência da temperatura na remoção de nutrientes do efluente da indústria processadora de
pescado por *Aphanothece microscopica* Nägeli

M. O. Hornes; M. I. Queiroz

Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química – Laboratório de
Biotecnologia. Rua Eng. Alfredo Huch 475, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil.

Telefone (53) 32338636 - FAX (53) 32338745 - biotecnofurg@yahoo.com.br

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar a influência da temperatura na remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo do efluente da indústria processadora de pescado pela cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. As condições experimentais foram temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C, pH ajustado a 7,5, aeração de 1 VVM e inóculo de 200 mg.L⁻¹. Os experimentos foram realizados em um reator de mistura completa com capacidade para 4,5 L, tendo em sua parte inferior acoplado um sistema para promover a aeração e agitação do meio. Os resultados indicaram remoções significativas ($p \leq 0,05$) de DQO e $P-PO_4^{-3}$ em até 48 h de cultivo para todas as condições analisadas. Quanto ao parâmetro NTK, verificaram-se remoções médias de 92% e 93% nos experimentos a 20°C e 30°C, respectivamente, em 30 h de cultivo. Os limites mínimos estabelecidos pela legislação brasileira foram atingidos para os cultivos a 20°C e 30°C. À 10°C foram determinadas remoções de 80% e 82% em 48 h de cultivo para os parâmetros DQO e NTK, respectivamente. A partir dos dados cinéticos para remoção simultânea de DQO, NTK e $P-PO_4^{-3}$ foi possível calcular o volume de um bioreator de mistura completa em sistema contínuo. A aplicação da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli é viável no tratamento do efluente do processamento de pescado na faixa de temperatura de 10°C a 30°C.

Palavras-chave: cianobactéria, efluente de pescado, remoção, temperatura

ABSTRACT

The work aimed to study the influence of temperature on the organic matter, nitrogen and phosphorus removal when the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli was grown in the fish industry effluent. The experimental conditions were temperature of 10°C, 20°C e 30°C, pH 7,5, 1 VVM and 200 mg.L⁻¹ inoculum. Batch cultures of the cyanobacterium were carried out in a 4,5 L complete stirred reactor, in its lower part a system with porous stones was coupled for the air entrance, providing aeration and agitation of the medium. The results indicated significant removals ($p \leq 0,05$) of COD and P-PO₄⁻³ in 48 h for all treatments. Towards the parameter TKN, it was verified an efficiency removal of 92% and 93% at 20°C and 30°C, respectively, in 30 h. The limits established by Brazilian legislation were reached for the treatments at 20°C and 30°C. For the treatment using the temperature of 10°C was found efficiency removals of 80% and 82% in 48 h for the parameters COD and TKN, respectively. From the kinetic data for simultaneous removal of COD, TKN and P-PO₄⁻³ was possible to estimate the volume of the continuous reactor. Those results indicate the viability of the application of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli as treatment of fish processing effluent in the temperature ranged from 10°C to 30°C.

Keywords: characterization, cyanobacterium, effluent, removal, temperature

1 INTRODUÇÃO

As indústrias de processamento de pescado são responsáveis pela descarga de efluentes com grande variabilidade em sua composição devido as diferentes matérias-primas e tipos de processamento empregados. Os efluentes são caracterizados por alto conteúdo de compostos biodegradáveis, como proteínas e óleos e graxas (ASPÉ et al., 1997; PARK et al., 2001; HORNES et al., 2004; OBAJA et al., 2005; WANG et al., 2005).

Nutrientes como nitrogênio e fósforo quando presentes nas águas residuárias são considerados fatores de extrema importância, devido aos vários efeitos adversos que podem causar ao meio ambiente (GARG et al., 2001; EL-BESTAWY, 2005). A eutrofização dos ecossistemas aquáticos pode causar o aumento das algas e plantas, mortandade das espécies e perda da função do ecossistema. Por essas razões numerosos estudos tem tido enfoque na remoção de nitrogênio e fósforo dos efluentes. A maior parte destes trabalhos são baseados nos processos biológicos com diferentes combinações de processos anaeróbicos e aeróbicos, tais como bioreator de membrana e reator de batelada seqüencial (WANG et al., 2005; KARGI et al., 2005; ASLAN & KAPDAN, 2006).

A utilização de cianobactérias e microalgas no tratamento de efluentes tem sido estudada visando a remoção destes compostos, demonstrando os resultados alto potencial destes microrganismos para remoção destes nutrientes (CRAGGS et al., 1997; MARTÍNEZ et al., 1999; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; ASLAN & KAPDAN, 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008). A utilização destes microrganismos traz consigo uma série de vantagens em relação aos processos convencionais de tratamento de efluentes. Entre elas é de importância salientar o fato de não causar qualquer dano ambiental, não provocando poluições secundárias, uma vez que a biomassa gerada pode ser utilizada em inúmeras aplicações tecnológicas, não só pela sua alta eficiência de reciclar nitrogênio e fósforo, mas também pela capacidade de purificação de efluentes pela produção de oxigênio e remoção de metais (PROULX et al., 1994, MARTÍNEZ et al., 1999; ASLAN & KAPDAN, 2006). Independente disto, muitas linhagens são capazes de crescerem na ausência de luz as expensas de matéria orgânica desenvolvendo com isso importante capacidade de remoção de matéria orgânica (FAY, 1983; SHI et al., 1999; SHI et al., 2000; QUEIROZ et al., 2002; WEN & CHEN, 2003; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007).

A *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma cianobactéria de ocorrência natural nos corpos hídricos adjacentes à cidade do Rio Grande e sua utilização em tratamento de efluentes

associada à produção de proteína unicelular vem sendo estudada pela Universidade Federal do Rio Grande, com importantes resultados na remoção de matéria orgânica e nitrogênio (QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008).

Vários fatores podem afetar a remoção biológica de nutrientes, como pH e concentração de matéria orgânica, ou parâmetros operacionais, tais como temperatura e concentração de oxigênio dissolvido. A dependência das constantes de reação biológica em relação à temperatura é fator de importância quando são estimadas as eficiências máximas dos processos de tratamento biológico. A temperatura não somente influencia as atividades metabólicas das populações microbianas, como também exerce um efeito profundo em fatores como taxas de transferência gás-líquido e nas características de sedimentação dos sólidos biológicos. Temperaturas abaixo da faixa ótima têm maior efeito na velocidade de crescimento do que temperaturas acima da faixa ótima. Tem sido observada a duplicação das velocidades de crescimento a cada 10°C de aumento na temperatura, aproximadamente, até que a temperatura ótima seja alcançada (MULKERRINS et al., 2004; MORGAN-SAGASTUME & ALLEN, 2005).

De acordo com as Normais Climatológicas Provisórias da Estação Meteorológica n.º 83995, no período de 1991 a 2000, a cidade do Rio Grande, RS, apresentou temperaturas mínimas de 9,53°C e 8,87°C nos meses de junho e julho e temperaturas máximas de 27,16°C e 26,89°C nos meses de janeiro e fevereiro, respectivamente (KRUSCHE et al., 2002). Assim, a avaliação da eficiência de remoção de nutrientes pelo microrganismo em estudo em intervalo de temperatura abrangente a estas variações torna-se resposta de interesse quando se visa a valoração de uma água residuária. Em face disto o trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da temperatura na remoção de nutrientes do efluente da indústria processadora de pescado pela cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

2.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSM92, 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 BG11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por RIPPKA et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 30°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 mediante uso de luxímetro tipo LX-101 digital e termômetros dispostos no interior do reator. A temperatura e intensidade luminosa foram otimizadas em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG11 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), ácido cítrico (0,006 g.L⁻¹) e citrato férrico de amônio (0,006 g.L⁻¹) (RIPPKA et al., 1979).

A concentração celular na fase exponencial para tomada do inóculo foi determinada gravimetricamente mediante filtração de volume conhecido de meio de cultura BG11 contendo as células do microrganismo 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

O meio de cultivo utilizado foi o efluente do processamento do pescado, coletado no tanque de equalização do sistema de tratamento de efluente de uma empresa processadora de pescado do setor industrial da cidade de Rio Grande, RS, Brasil. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e então esterilizadas a 1,1 Kgf.cm⁻² (120°C) por 15 minutos. O efluente foi caracterizado quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$), fósforo ($P-PO_4^{3-}$), sólidos totais (ST), sólidos suspensos (SS) e sólidos voláteis (SV). As análises foram realizadas segundo os procedimentos descritos em Standard Methods para análise de águas e efluentes (APHA, 2005).

2.3 Desenvolvimento dos experimentos

Experimentos em duplicata na ausência de luz e temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C 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 80 cm de altura e 10 cm de diâmetro, tendo sua parte inferior acoplada a um sistema para promover a aeração de 1 VVM e agitação do meio. Os experimentos foram conduzidos em câmara com controle de temperatura. O efluente foi inoculado em média com 200 mg.L⁻¹ de células de *Aphanothece microscopica* Nägeli obtidas a partir de um volume equivalente ao requerido para obter esta concentração de cultura desenvolvida em meio BG11, conforme descrito no item 2.1.1. O efluente foi previamente ajustado a pH 7,6, razão C/N 20 e razão N/P 10, aferido com glicose, sulfato de amônio ou fosfato de potássio em função das concentrações de DQO, NTK e P-PO₄⁻³ presentes no efluente, conforme indicado por Hornes & Queiroz (2004). Os experimentos foram monitorados mediante tomada de amostras a intervalos regulares, filtrados em filtro Millipore de 0,45 µm de porosidade e a biomassa determinada segundo o item 2.1.1. O filtrado foi avaliado quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺) e fósforo (P-PO₄⁻³), de acordo com a metodologia descrita em Standard Methods para análise de águas e efluentes (APHA, 2005).

2.4 Eficiência de remoção

A eficiência de remoção dos nutrientes foi calculada de acordo com a equação 1.

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

Onde: C_A = concentração do constituinte no efluente antes da inoculação do microrganismo;

C_B = Concentração do constituinte a cada tomada de amostra.

2.5 Cinética

As variáveis cinéticas velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}$), tempo de geração (tg), taxa específica de remoção de substrato (q_s) e fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) foram determinadas conforme indicado por Levenspiel (2000). O procedimento de avaliação teve como base as equações 2, 3, 4, 5 e 6.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \quad (2)$$

Integrando-se a equação 2 obtém-se:

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

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

Onde: tg = tempo de geração (h)

O fator de conversão substrato-microrganismo foi obtido através da equação 5.

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

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

$$q_s = -\frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (6)$$

2.6 Estimativa do processo contínuo

O volume do reator contínuo foi estimado a partir do balanço de massa da variável DQO, assumindo volume constante, geometria cilíndrica e sem recirculação de sólidos (equação 7).

$$V = \frac{F}{q_s} \left[\left(\frac{S}{S_0} \right) - 1 \right] \quad (7)$$

Onde: V = volume do reator (m³)

F = vazão do fluido (m³.h⁻¹)

q_s = taxa específica de consumo do substrato (h⁻¹)

S = concentração final do substrato (mg.L⁻¹)

S₀ = concentração inicial do substrato (mg.L⁻¹)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do efluente

Na tabela 1 está registrada a caracterização do efluente do processamento de pescado coletado após o tratamento primário durante um período amostral de dois anos. O tratamento primário é composto de um sistema de gradeamento, caixa de gordura e tanque de equalização. Pode-se verificar a alta variabilidade quanto aos parâmetros analisados, principalmente para N-NH₄⁺, SS, DQO e P-PO₄⁻³, os quais apresentaram os maiores coeficientes de variação. De acordo com Afonso & Bórquez (2002) e Lim et al. (2003) isto é comum nos efluentes das indústrias processadoras de pescado, devido à variabilidade do tipo e quantidade de matéria-prima que é processada.

Tabela 1. Caracterização do efluente proveniente do tratamento primário de uma indústria de processamento de pescado

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média	CV
pH	6,91	8,01	7,67	4,2
DQO	575	2663	1518	38,5
NTK	52,4	177	112	30,8
N-NH ₄ ⁺	13,1	111	38,7	65,5
P-PO ₄ ⁻³	4,1	17,5	9,9	38,5
ST	1570	4035	2787	26,8
SS	255	460	418	44,8
SV	555	1935	1320	36,1
C/N	6,39	17,9	13,8	32,3
N/P	6,49	14,8	12,1	31,2

*Amostras provenientes do tanque de equalização

*DQO: demanda química de oxigênio (mg.L⁻¹); NTK: nitrogênio total Kjeldahl (mg.L⁻¹); N-NH₄⁺: nitrogênio amoniacal (mg.L⁻¹); P-PO₄⁻³: fósforo (mg.L⁻¹); ST: sólidos totais; SS: sólidos suspensos; SV: sólidos voláteis; C/N: razão carbono/nitrogênio; N/P: razão nitrogênio/fósforo; CV: coeficiente de variação (%)

Dados obtidos a partir de 20 repetições

Os valores máximos e mínimos de NTK foram 52,4 mg.L⁻¹ e 177 mg.L⁻¹, respectivamente. Conforme pode ser verificado na tabela 2, observa-se grande relação deste componente com o nitrogênio amoniacal ($r = 0,88$), sendo este fato importante, uma vez que deve ser considerada a quantidade de nitrogênio amoniacal presente no meio quando se pensa em tratamento biológico, com destaque na utilização de cianobactérias (SHI et al., 2000; VON RÜCKERT & GIANI, 2004; QUEIROZ et al., 2007). Hornes et al. (2004) verificaram a presença do N-NH₄⁺ em concentrações crescentes no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli concluindo que a maior concentração utilizada (140 mg.L⁻¹) não foi letal, sendo a cianobactéria resistente a essa concentração.

As concentrações de DQO variaram de 575 mg.L⁻¹ a 2663 mg.L⁻¹. Estes valores estão de acordo com as concentrações de matéria orgânica dos efluentes do processamento de pescado encontradas na literatura, provenientes principalmente das etapas de evisceração e fileteamento, onde é carreado sangue e material orgânico solúvel (WHEATON & LAWSON, 1985; AFONSO & BÓRQUEZ, 2002; CASANI et al., 2006). De acordo com Afonso & Bórquez (2002) uma característica comum dos efluentes do processamento do pescado é o seu conteúdo de proteína dissolvida, a qual é considerada uma matéria-prima de grande valor e que poderia ser recuperada e reutilizada em produtos para consumo humano ou animal.

Tabela 2. Matriz de correlação entre os parâmetros avaliados

	DQO	NTK	N-NH ₄ ⁺	P-PO ₄ ⁻³	pH	C/N	N/P	ST	SS	SV
DQO	1,00	0,34	0,26	0,07	0,32	0,64	-0,23	0,16	0,47	0,55
NTK	0,34	1,00	0,88	0,73	0,19	-0,21	0,15	0,01	0,10	0,05
N-NH ₄ ⁺	0,26	0,88	1,00	0,51	0,30	-0,16	0,22	-0,31	0,14	-0,21
P-PO ₄ ⁻³	0,07	0,73	0,51	1,00	0,04	0,19	-0,53	0,22	0,44	0,36
pH	0,32	0,19	0,30	0,04	1,00	0,12	0,03	-0,38	-0,15	-0,42
C/N	0,64	-0,21	-0,16	0,19	0,12	1,00	-0,70	-0,08	-0,25	0,50
N/P	-0,23	0,15	0,22	-0,53	0,03	-0,70	1,00	-0,36	0,27	0,23
ST	0,16	0,01	-0,31	0,22	-0,38	-0,08	-0,36	1,00	0,10	0,67
SS	0,47	0,10	0,14	0,44	-0,15	-0,25	0,27	0,10	1,00	0,41
SV	0,55	0,05	-0,21	0,36	-0,42	0,50	0,23	0,67	0,41	1,00

*DQO: demanda química de oxigênio (mg.L⁻¹); NTK: nitrogênio total Kjeldahl (mg.L⁻¹); N-NH₄⁺: nitrogênio amoniacal (mg.L⁻¹); P-PO₄⁻³: fósforo (mg.L⁻¹); C/N: razão carbono/nitrogênio; N/P: razão nitrogênio/fósforo; ST: sólidos totais; SS: sólidos suspensos; SV: sólidos voláteis

A razão C/N calculada a partir dos valores médios de DQO e NTK apresenta um valor médio de 13,8. Fay et al. (1983) relatam que a relação ótima entre carbono e nitrogênio para o desenvolvimento de cianobactérias deve estar entre 20 e 30, verificando-se a necessidade de complementação por matéria carbonada. Fontenot et al. (2007) relatam que o processo de degradação biológica dos resíduos líquidos industriais depende da quantidade de carbono, nitrogênio e fósforo disponíveis. Quando há pouca quantidade de nitrogênio presente, os

microrganismos estarão inaptos a produzirem as enzimas necessárias para a utilização de carbono. Por outro lado, se há uma quantidade excessiva de nitrogênio, poderá ocorrer inibição ao crescimento (CAMPOS et al., 2002; SUNG & LIU, 2003). Xing et al. (2000) encontraram que variações na razão C/N no meio de cultivo resultaram em diferentes taxas de incorporação do carbono e nitrogênio nas células. Queiroz et al. (2003) estudaram a influência da razão C/N e N/P na remoção de nutrientes do efluente da parboilização do arroz, e verificaram que a maior remoção de nitrogênio e matéria orgânica ocorreram com razão C/N 50 e N/P 1,98. Por outro lado, Hornes & Queiroz (2004) verificaram que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando utilizada a razão C/N 20 e 60 na remoção de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica do efluente do processamento de pescado por *Aphanothece microscopica* Nägeli. É importante salientar o valor médio da razão N/P (12,1). De acordo com Pearson (1990), a proporção entre os componentes nitrogenados e fosforados de 10 a 16 é considerada favorável para o crescimento de cianobactérias. Estes parâmetros devem ser ajustados para manter a eficiência do processo, utilizando amostras padronizadas com razões C/N e N/P constantes.

De acordo com os dados da tabela 1 a concentração de sólidos voláteis compreende aproximadamente metade dos sólidos totais presentes. Isso indica que grande parte dos sólidos é constituído de material orgânico, uma vez que de acordo com Aguilar et al. (2002) os sólidos voláteis oferecem uma aproximação grosseira da quantidade de matéria orgânica presente. Para Tchobanoglous (1991) cerca de 75% dos sólidos em suspensão e 40% dos sólidos filtráveis são de natureza orgânica. Sarkar et al. (2006) relacionaram os níveis de sólidos suspensos presentes no efluente da indústria de laticínios ao conteúdo de matéria orgânica, que incluía gorduras, óleos e nutrientes tais como amônia e fosfatos. Esses dados são corroborados pelos coeficientes de correlação apresentados na tabela 2, em que são mostradas expressivas relações entre os sólidos suspensos e voláteis com a DQO.

Embora os valores máximos e mínimos de pH estejam entre 6,91 e 8,01, verificou-se que na maioria das observações o pH permaneceu próximo da média (7,67) e, uma vez que a faixa utilizada nos tratamentos biológicos varia entre 7,6-7,8 (TAM & WONG, 1996; OLVERA-RAMÍREZ et al., 2000), isso pode ser considerado um aspecto positivo quando se pensa nos custos operacionais de um sistema de tratamento de efluentes.

3.2 Crescimento e remoção de nutrientes

A figura 1 descreve a curva de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria da pesca, verificando-se ausência da fase lag a 20°C e 30°C. Guerrero et al. (1999) relataram que a ausência desta fase é uma característica de curvas de crescimento de cianobactérias quando inoculadas em efluentes de indústrias de alimentos, devido à alta disponibilidade de compostos carbonados e nutrientes como ácidos orgânicos e nitrogênio. Este fato já foi verificado por Queiroz et al. (2001), utilizando inóculos acima de 100 mg.L⁻¹ em experimento utilizando a cianobactéria *Aphanothece* no efluente da parboilização do arroz na ausência de luz e temperatura de 35°C.

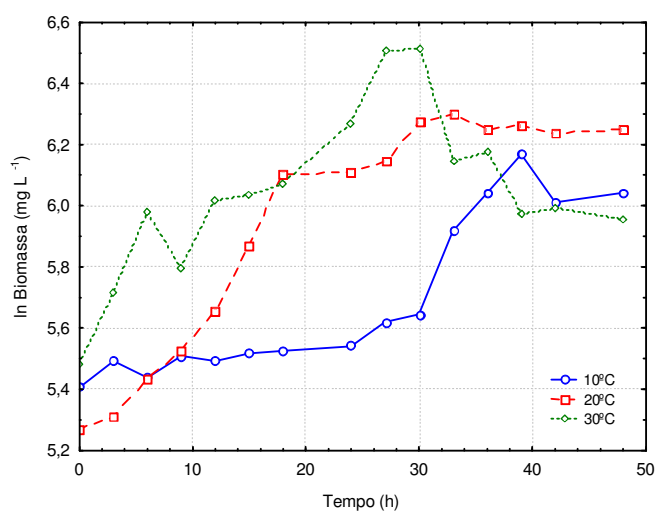


Figura 1. Curvas de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas

No presente trabalho o comportamento das curvas de crescimento sugere que a fase log durou 27 h quando foi utilizada a temperatura de 30°C, com concentração celular máxima de 670 mg.L⁻¹ neste período. Estes resultados demonstram a possibilidade de aplicar a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no tratamento de efluentes em reatores com baixos tempos de residência, inferiores aos aplicados em sistemas de lodo ativado convencionais (VON SPERLING, 1997).

A figura 2 apresenta o comportamento do pH do meio de cultivo para o crescimento da cianobactéria *Aphanothece* nas diferentes temperaturas avaliadas. Observa-se o aumento significativo em função do tempo, independente da temperatura de cultivo aplicada.

Przytocka-Jusiak et al. (1977) reportaram que o crescimento heterotrófico de cianobactérias é usualmente acompanhado por uma modificação do pH. O incremento do pH ocorreu durante os períodos de maior taxa de consumo de substrato, conforme figuras 3 a 6, e pode ser atribuído ao consumo dos ácidos orgânicos presentes no efluente (GUERRERO et al., 1999; RANGEL-YAGUI et al., 2004).

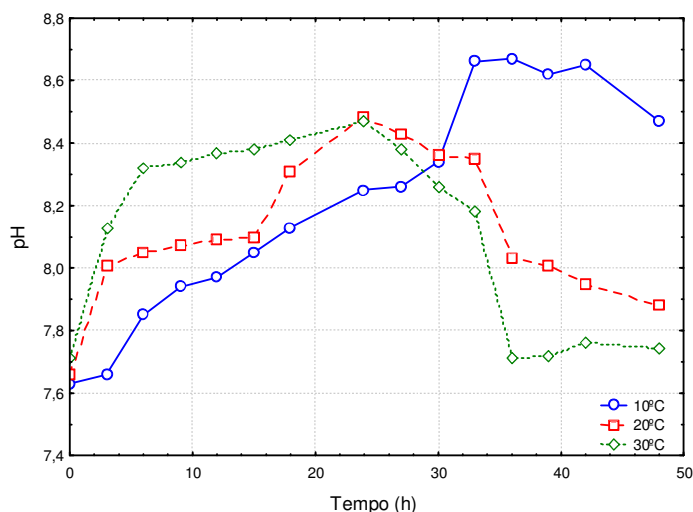


Figura 2. Variação do pH com o tempo no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas

A figura 3 apresenta a variação de DQO no efluente do processamento de pescado com o tempo. As maiores remoções foram observadas em 48 h, 42 h e 27 h de cultivo, para os experimentos desenvolvidos a 10°C, 20°C e 30°C, respectivamente. Estes períodos corresponderam à fase estacionária de crescimento, sendo obtidos 80% e 100% de remoção para os experimentos a 10°C e 20°C, respectivamente. O maior desempenho de remoção registrado foi verificado quando o microrganismo foi cultivado a 30°C, com 100% de remoção na fase logarítmica de crescimento. O nível exigido pela legislação estadual brasileira (abaixo de 405 mg.L⁻¹) nos cultivos a 20°C e 30°C foi atingido em até 30 h, enquanto que na temperatura de 10°C a concentração mínima ocorreu em 48 h, conforme expresso na tabela 3 (CONSEMA, 2006).

Em todos os tratamentos as concentrações iniciais de DQO foram acima de 1700 mg.L⁻¹. Nestas condições o microrganismo foi capaz de se multiplicar utilizando como substrato a matéria orgânica presente no efluente. No trabalho realizado por Travieso et al. (2006), experimentos com concentrações iniciais de 1100 mg.L⁻¹ no efluente de dejetos de

porcos realizados sob luz natural, com temperaturas que variaram de 27°C a 32°C durante o dia e 21°C a 25°C durante a noite, o crescimento e a eficiência de remoção deste substrato diminuíram significativamente devido ao processo de inibição. Nesse sentido, os resultados apresentados no presente trabalho são um indicativo da possibilidade de utilização do efluente do processamento de pescado no desenvolvimento da cianobactéria *Aphanothece*, uma vez que é capaz de se multiplicar utilizando o material orgânico e demais nutrientes presentes neste meio, estando estes em concentrações abaixo da toxicidade para este microrganismo.

Considerando o experimento realizado na maior temperatura, o resultado pode ser comparado ao trabalho feito por Queiroz et al. (2007) que registraram remoção de 83,4% de DQO em 15 h de cultivo quando utilizada a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da parboilização do arroz na mesma temperatura. A alta eficiência pode ser explicada pela habilidade de algumas espécies de cianobactéria em crescerem com o metabolismo heterotrófico, assimilando compostos orgânicos imediatamente após serem transferidas para o ambiente com ausência de luz (FAY, 1983; SHI et al., 1999; TAM & WONG, 2000; QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004; HORNES & QUEIROZ, 2004; QUEIROZ et al., 2007). Nesse sentido a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli pode ser utilizada em reatores sem a necessidade de fontes luminosas para a remoção de matéria orgânica do efluente da indústria da pesca.

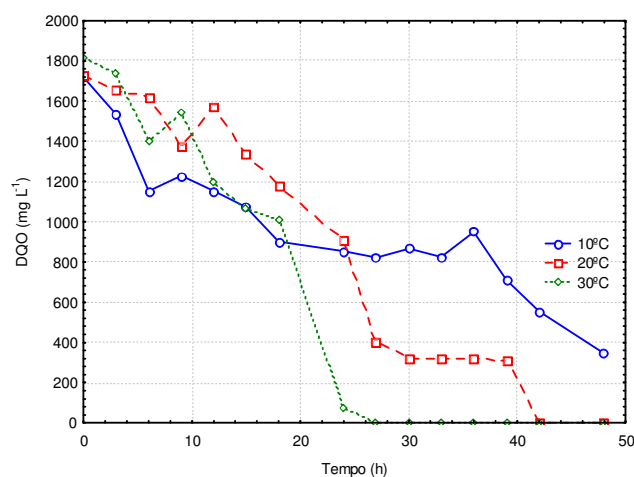


Figura 3. Variação da concentração de DQO com o tempo no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas

A figura 4 apresenta as eficiências de remoção para a variável NTK durante o período experimental. Da mesma forma que para a DQO, a máxima remoção de NTK para o experimento a 30°C ocorreu no tempo de 27 h, correspondente à fase logarítmica de crescimento, com eficiência de 93%. Estes resultados são superiores aos obtidos por Martínez et al. (2000), os quais verificaram a remoção máxima de NTK em 188 h para a microalga *Scenedesmus obliquus* sob as condições de luz e temperatura de 20°C. Entretanto, a remoção de nitrogênio por culturas de cianobactérias e microalgas não pode ser exclusivamente atribuídas à conversão em nitrogênio. Outros mecanismos não biológicos são capazes de eliminar este componente em sistemas intensamente aerados, tais como volatilização da amônia, absorção e sedimentação (TALBOT & De La NÖUE, 1993; TAM & WONG, 1996; BICH et al., 1999).

No que concerne à influência da temperatura, verifica-se notadamente que a remoção do substrato é mais rápida nas temperaturas mais elevadas. Verificaram-se remoções de 92% e 93% a 20°C e 30°C, respectivamente, enquanto que a 10°C a remoção foi 82% em 48 h (tabela 3). A elevação da temperatura de 10°C para 20°C provocou um aumento aproximado de 12% na remoção de NTK. Pode ser observado que ao final do período de cultivo a concentração de NTK está em decréscimo, o que sugere uma remoção próxima ao limite estabelecido pela legislação brasileira, que estabelece um valor máximo para o parâmetro NTK de 10 mg.L⁻¹ (CONSEMA, 2006).

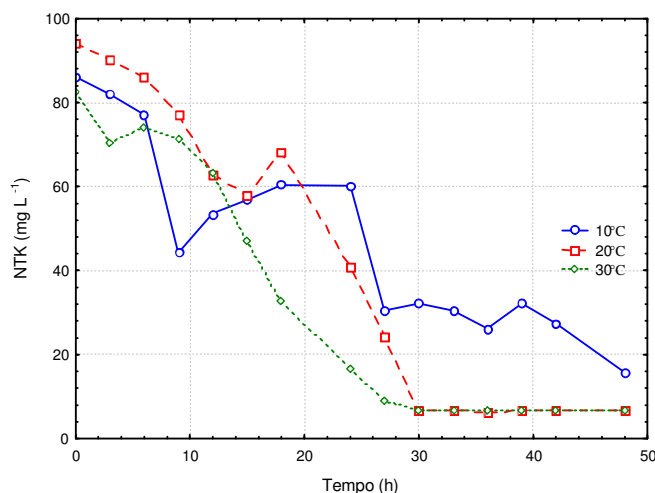


Figura 4. Variação da concentração de NTK com o tempo no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nægeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas

Na figura 5 é apresentada a remoção de N-NH_4^+ nas diferentes condições analisadas. Culturas de cianobactérias são capazes de assimilar diferentes formas de nitrogênio, como uréia, aminoácidos, nitrito, nitrato e amônio, embora este último seja a forma preferida (HERRERO et al., 2001; MURO-PASTOR & FLORÊNCIO, 2003). Nesse sentido, um fator que pode ter contribuído para isso é que aproximadamente 50% do nitrogênio total inicial é composto por N-NH_4^+ (figuras 4 e 5, tabela 3) e, uma vez que este componente é considerado a forma nitrogenada preferencial a ser consumida pelos microrganismos de forma geral, a absorção deste resultará em reduções dos valores de NTK.

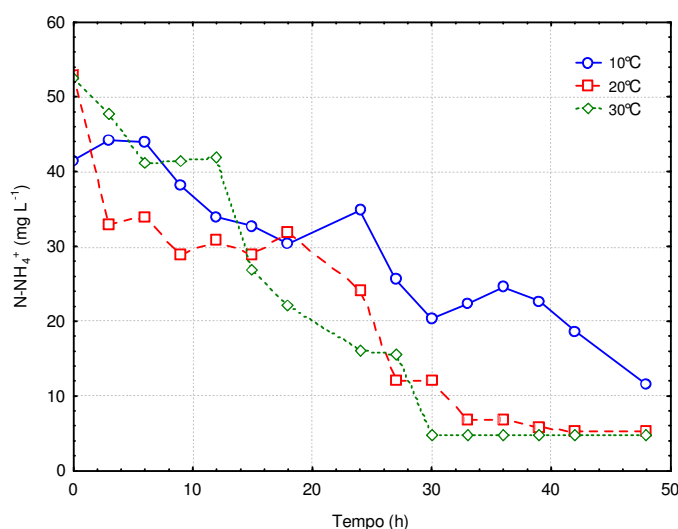


Figura 5. Variação da concentração de N-NH_4^+ com o tempo no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas

De acordo com os dados das figuras 4 e 5 se pode verificar que o aumento da temperatura acarretou em maior eficiência de remoção dos compostos nitrogenados. Contudo, no que se refere às temperaturas de cultivo de 20°C e 30°C é possível constatar que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), o que demonstra a sua maior estabilidade frente a mudanças ambientais (tabela 3). Embora não tenha sido quantificada, a perda de nitrogênio amoniacal por volatilização nas condições experimentais utilizadas pode ter sido significativa. No trabalho realizado por Proulx et al. (1994) no tratamento de efluente doméstico por *Phormidium bohneri* a 30°C, foi observada a remoção de 38% de amônia por volatilização. Isso pode ser destacado principalmente para os experimentos a 20°C e 30°C, em que o pH atinge os maiores valores (8,48-8,47) entre 24 h e 30 h de cultivo, período este em que

ocorreram as maiores remoções deste parâmetro. NUÑEZ et al. (2001) relataram que as altas temperaturas irão acarretar o decréscimo da solubilidade dos gases dissolvidos no meio e, portanto, aumentar a perda de NH_3 para a atmosfera. Estes autores verificaram que a perda de amônia foi entre três e quatro vezes a quantidade de nitrogênio recuperada como proteína, sendo a maior parte desta contabilizada em relação ao nitrato que desapareceu do meio.

Tabela 3. Eficiências de remoção máximas para as variáveis DQO, NTK, N-NH_4^+ e P-PO_4^{-3} no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas

Tratamento	DQO			NTK			N-NH_4^+			P-PO_4^{-3}		
	CI	CF	E	CI	CF	E	CI	CF	E	CI	CF	E
10°C	1720	345	80 ^a (48 h)	86,1	15,7	82 ^a (48 h)	41,5	11,5	72 ^a (48 h)	7,1	2,2	69 ^a (48 h)
20°C	1725	0,0	100 ^b (42 h)	94,0	6,9	92 ^b (30 h)	53	6,7	87 ^b (33 h)	5,36	0,0	100 ^b (27 h)
30°C	1818	0,0	100 ^b (27 h)	82,6	9,1	93 ^b (27 h)	52,6	4,8	91 ^b (27 h)	5,41	0,0	100 ^b (27 h)

CI: concentração inicial (mg.L^{-1}); CF: concentração final (mg.L^{-1}); E: eficiência de remoção (%)

*letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

O consumo de P-PO_4^{-3} com o tempo em diferentes temperaturas de cultivo está descrito na figura 6. Os gráficos mostram que o tratamento pela cianobactéria removeu substancialmente o fósforo presente no meio. Assim como ocorreu para os parâmetros NTK e N-NH_4^+ , entre os experimentos a 20°C e 30°C não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), observando-se a completa remoção de P-PO_4^{-3} em 18 h de cultivo. À temperatura de 10°C, embora tenha removido 69% deste componente em 48 h (tabela 3), a concentração final permaneceu acima do limite da legislação, que estabelece um máximo de 1 mg.L^{-1} (CONSEMA, 2006).

Assim como para os compostos nitrogenados, os altos valores de pH e a constante aeração também podem contribuir para que ocorra a remoção de fósforo, neste caso por precipitação pela associação com os sais presentes no meio de cultivo (TAM & WONG, 2000; EL-BESTWAY et al., 2005). Contudo, através da análise das figuras 1 e 3-6 pode-se verificar que as remoções de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo ocorreram entre 4 h e 30 h de cultivo, período este em que foi verificado o aumento logarítmico das células de *Aphanothece*. Após esse período o conteúdo de nutrientes do meio reduziu em até 69% para os experimentos a 10°C e acima de 80% a 20°C e 30°C. Com o esgotamento dos nutrientes iniciou a fase estacionária e posteriormente o declínio do crescimento. Este comportamento é um indício que o desenvolvimento celular está intimamente relacionado com a concentração

dos componentes presentes no meio, e se fossem utilizados artifícios para reduzir as perdas por volatilização e precipitação, a concentração celular poderia atingir valores mais elevados com o aumento da produtividade.

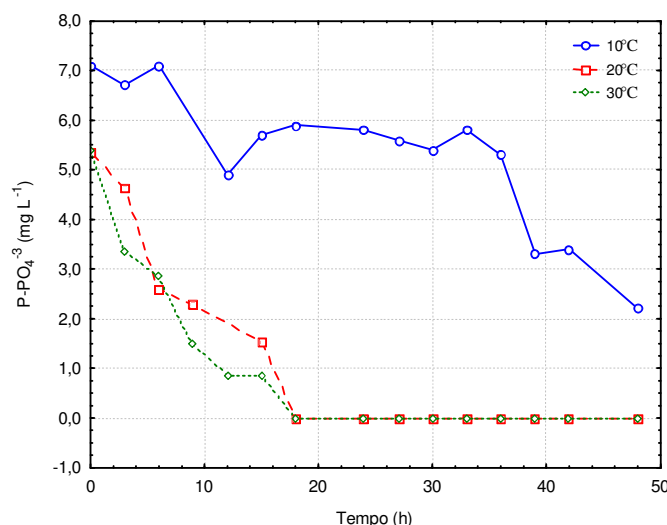


Figura 6. Variação da concentração de P-PO_4^{-3} com o tempo no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nægeli no efluente do processamento de pescado a diferentes temperaturas

A eficiência de remoção atingida para o cultivo da cianobactéria *A. microscopica* Nægeli na temperatura de 20°C é superior a outros estudos previamente publicados com cianobactérias e microalgas em geral. Lafarga-De la Cruz et al. (2006) estudaram a produção de biomassa e fixação de P-PO_4^{-3} em cultivo de batelada da microalga *Rhodomonas* sp., por um tempo de residência de 7 dias a 20°C e diferentes concentrações iniciais de nutrientes. Os autores constataram que o crescimento apresentou uma relação direta com a concentração inicial de P-PO_4^{-3} . No experimento com concentração inicial de P-PO_4^{-3} de 3,7 mg.L^{-1} o microrganismo assimilou 2,76 mg.L^{-1} , resultando em 74% de remoção, enquanto que com 5,5 mg.L^{-1} a eficiência foi de 96%. Voltolina et al. (1998) estudaram o crescimento de *Scenedesmus* sp. em efluente artificial com concentração inicial de fósforo de 2,14 mg.L^{-1} , a temperatura de 23°C, iluminação contínua e tempo de residência de 15 dias, onde no final deste período foi verificado a remoção de 56,1% deste componente. Nos experimentos com a cianobactéria *A. microscopica* Nægeli a concentração inicial a 20°C e 30°C foi 5,36 e 5,41 mg.L^{-1} , respectivamente, com remoções de 100% em 24 h de cultivo. Aslan & Kapdan (2006) realizaram experimentos em batelada, a temperatura de 20°C e iluminação contínua de 4,1

Klux, para investigar o efeito da concentração inicial de fósforo em efluente sintético na performance de remoção de nutrientes da microalga *Chlorella vulgaris*. Os autores verificaram 78% de remoção quando a concentração inicial foi de 7,7 mg.L⁻¹. As concentrações iniciais superiores a 7,7 mg.L⁻¹ resultaram em remoções abaixo de 30%. Contudo, no trabalho realizado por Hornes & Queiroz (2004), o cultivo da cianobactéria *A. microscopica* Nägeli no efluente do processamento do pescado resultou em 100% de remoção de P-PO₄⁻³, mesmo com concentrações iniciais acima de 8 mg.L⁻¹. Nesse sentido, considerando a temperatura de 20°C, estes exemplos são um indicativo da eficiência da cianobactéria *A. microscopica* Nägeli, uma vez que é apta em remover uma concentração de P-PO₄⁻³ superior em um menor tempo de cultivo.

3.3 Análise cinética

Os valores das variáveis cinéticas da cianobactéria *A. microscopica* Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado estão mostrados na tabela 4. O fator de conversão de substrato em célula foi 0,28, 0,26 e 0,24 mg biomassa mg.DQO⁻¹ quando a cianobactéria foi desenvolvida no efluente nas temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C, respectivamente. Esta informação sugere que a cianobactéria *A. microscopica* Nägeli pode remover grandes quantidades de matéria orgânica, porém com baixa conversão em biomassa. Por outro lado, o fator de conversão de substrato em célula considerando a variável NTK foi de 4,70, 4,22 e 5,85 mg biomassa.mg NTK⁻¹ para os cultivos a 10°C, 20°C e 30°C, respectivamente. Esses valores foram maiores do que aqueles encontrados em sistemas convencionais de remoção de nitrogênio, onde o crescimento microbiológico é mais lento (VON SPERLING, 1997).

Tabela 4. Variáveis cinéticas nas condições experimentais

Variável	Parâmetro	Tratamento		
		10°C	20°C	30°C
$\mu_{\text{máx}}$		0,018	0,033	0,038
tg		37,0	20,7	18,2
$q_{\text{máx}}$	DQO	-0,028	-0,088	-0,10
$Y_{X/S}$		0,28	0,26	0,24
$q_{\text{máx}}$	NTK	-0,003	-0,004	-0,005
$Y_{X/S}$		4,70	4,22	5,85
$q_{\text{máx}}$	N-NH ₄ ⁺¹	-0,001	-0,002	-0,002
$Y_{X/S}$		10,8	4,22	11,6
$q_{\text{máx}}$	P-PO ₄ ⁻³	-0,000	-0,000	-0,000
$Y_{X/S}$		68	75,9	79,5

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica de crescimento máxima (h⁻¹); tg: tempo de geração (h); $q_{\text{máx}}$: taxa máxima de remoção de substrato (mg S.mg biomassa⁻¹.h⁻¹); $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em célula (mg biomassa.mg S⁻¹)

A maior utilização de nitrogênio em comparação com a matéria orgânica foi também verificada no estudo realizado por Queiroz et al. (2007), os quais avaliaram a cinética de remoção destes componentes no cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da parboilização do arroz, na ausência de luz e temperatura de 30°C.

Vários autores têm mostrado evidências de grandes reduções de matéria orgânica com baixa conversão em biomassa quando o consumo de moléculas simples, tais como acetato, glicose e ácidos orgânicos, ocorreram na ausência de luz (FAY, 1983; SHI et al., 1999; TAM & WONG, 2000; QUEIROZ et al., 2007). Isto sugere que as cianobactérias apresentam a existência de um metabolismo capaz de garantir um crescimento lento no escuro, explicando assim a alta remoção de DQO, entretanto com baixa conversão em biomassa. Por outro lado, o valor do fator de conversão de substrato (NTK) em célula qualifica esta água residuária como uma fonte de nitrogênio para produção de proteína unicelular. De acordo com Faintuch et al. (1992), uma das principais dificuldades na produção de proteína unicelular é o custo de meios contendo compostos nitrogenados. Nesse sentido, a incorporação do nitrogênio contido no efluente do processamento de pescado na biomassa poderia contribuir para resolver os problemas relacionados à poluição e gerar uma fonte alternativa de proteína.

No que se refere a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), verifica-se o aumento deste parâmetro com o aumento da temperatura. A velocidade específica de crescimento máxima registrada foi $0,038 \text{ h}^{-1}$, para o experimento a 30°C, valor este superior do que o obtido por outros autores para *Scenedesmus* e *Chlorella* quando cultivada em efluentes e meio sintético (TAM & WONG, 2000; MARTÍNEZ et al., 2000). O menor tempo de geração 18,2 h foi registrado em relação ao tempo da fase exponencial de 27 h. Esta informação é fundamental para a eficiência do processo em reatores com agitação sem a recirculação de sólidos (VON SPERLING, 1997).

O aumento do fator de conversão em célula em relação ao parâmetro P-PO_4^{-3} mostra que a temperatura afeta não somente a cinética de crescimento, mas também a eficiência de converter o fósforo presente no meio em biomassa. A diferença entre a temperatura ótima de conversão (20°C) e a temperatura ótima para o crescimento (30°C) foi indicada no trabalho de MARTÍNEZ et al. (2000), onde a temperatura ótima para a conversão de fósforo em biomassa foi de 25°C, enquanto que para o crescimento foi 30°C. No entanto esta disparidade foi constatada apenas em relação ao P-PO_4^{-3} . Para os demais parâmetros, a taxa de remoção de substrato e o fator de conversão de substrato em célula para os experimentos desenvolvidos a

30°C apresentaram valores iguais ou superiores quando a biomassa foi cultivada a 20°C (tabela 4).

O estudo de aumento de escala e estimativa do volume do reator foi possível através da utilização das variáveis cinéticas (tabela 4). Assumiu-se geometria cilíndrica, reator de mistura completa, alimentação de efluente industrial, DQO e tempo de detenção hidráulico. Considerou-se a vazão total durante a lavagem e evisceração durante a jornada diária de trabalho, correspondente a $19,2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. O tempo de detenção hidráulico foi 30 h, determinado a partir da remoção máxima de DQO e acrescido de um fator de segurança. Os valores contidos na tabela 5 apresentam esta estimativa, utilizando como base de cálculo o balanço de DQO. O volume estimado do bioreator poderia conter 184 m^3 de fluido contendo efluente do processamento de pescado e biomassa. Portanto, o sistema de tratamento de efluentes por microalgas é considerado uma boa opção para o tratamento biológico de efluentes industriais.

Tabela 5. Estimativa do reator sequencial de batelada para a redução de DQO

Variável cinética	Valor
$F (\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1})$	19,2
$q_{\text{DQO}} (\text{h}^{-1})$	-0,10
$S_0 (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	1818
$S (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	75
$V (\text{m}^3)$	184

F: vazão do fluido; q_{DQO} : taxa específica de consumo do substrato (DQO); S_0 : concentração inicial do substrato; S: concentração final do substrato; V: volume do fluido

4 CONCLUSÃO

A caracterização do efluente do processamento de pescado apresentou elevada variabilidade quanto aos parâmetros pH, DOQ, NTK, N-NH_4^+ , P-PO_4^{-3} , sólidos totais, sólidos suspensos e sólidos voláteis.

A temperatura influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) a remoção de DQO, NTK, N-NH_4^+ e P-PO_4^{-3} .

As remoções dos substratos ocorreram mais rapidamente nos cultivos a 20°C e 30°C.

Os limites mínimos estabelecidos pela legislação estadual foram atingidos para os cultivos a 20°C e 30°C.

À 10°C foram determinadas remoções de 80% e 82% em 48 h de cultivo para os parâmetros DQO e NTK, respectivamente.

À partir das variáveis cinéticas e parâmetros operacionais foi possível estimar o volume do bioreator para remoção simultânea de DQO, NTK e $P-PO_4^{-3}$.

A aplicação da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no tratamento do efluente do processamento de pescado é viável na faixa de temperatura de 10°C a 30°C.

5 REFERÊNCIAS

AFONSO, M.D.; BÓRQUEZ, R. (2002). Nanofiltration of wastewaters from the fish meal industry. *Desalination*, v. 151, p. 131-138.

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

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2005), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. Washington.

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

ASPÉ, E.; MARTÍ, M.C.; ROECKEL, M. (1997). Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum. *Water Research*, v. 31, p. 2147-2160.

BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I.; ALMEIDA, T.L.; BENERI, R.L.; ALMEIDA, R.V.; PADILHA, M. (2004). 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.

BICH, N.N.; YAZIZ, M.I.; KAKTI, N. (1999). Combination of *Chlorella vulgaris* and *Andeichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. *Water Research*, v. 33, p. 2357-2362.

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

CASANI, S.; LETH, T.; KNOCHÉL, S. (2006). Water reuse in a shrimp processing. Line: Safety considerations using a HACCP approach. *Food Control*, v. 17, p. 540-550,

CONSEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente. *Lei Estadual n.º 10.330, Resolução CONSEMA n.º 128/2006 da Secretaria do Meio Ambiente*, 27 de dezembro de 1994.

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

EL-BESTAWY, E.; HUSSEIN, H. (2005). Comparison between biological and chemical treatment of wastewater containing nitrogen and phosphorus. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 195-203.

FAINTUCH, L.; SATOS, B.; AQUARONI, E. (1992). Emprego de algumas fontes de nitrogenados na obtenção de biomassa de *Oscillatoria limnética*. *Revista Microbiologia*, v. 23, p. 32-36.

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

FONTENOT, Q.; BONVILLAIN, C.; KILGEN, M.; BOOPATHY, R. (2007). Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology*, v. 98, v. 1700-1703.

GARG, S.K.; BHATNAGAR, A.; KALLA, A.; NARULA, N. (2001). In vitro nitrogen fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 101-109.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MENDEZ, R.; LEMA, J.M. (1999). Anaerobic hydrolysis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. *Water Research*, v. 33, p. 3250-3281.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A.M.; FLORES, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 411-425.

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

HORNES, M.O.; CAMERINE, F.V.; QUEIROZ, M.I. Efeito da amônia no crescimento da cianobactéria *Aphanotece microscopica* Nägeli e caracterização do efluente da indústria da pesca. In: *V Simpósio latino americano de ciência e tecnologia de alimentos*, 2004, Campinas.

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

KARGI, F.; UYGUR, A.; BASKAYA, H.S. (2005). Phosphate uptake and release rates with different carbon sources in biological nutrient removal using a SBR. *Journal of Environmental Management*, v. 76, p. 71-75.

KRUSCHE, N.; SARAIVA, J.M.B.; REBOITA, M.S. Normais climatológicas provisórias de 1991 a 2000 para Rio Grande, RS. Rio Grande: Ed. FURG, 2002. 104 p.

LAFARGA-DE LA CRUZ, F.; VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN-NÚÑEZ, R.; TREES, C.C.; SANTAMARÍA-DEL-ÁNGEL, E.; NÚÑEZ-CEBRERO, F. (2006). Nutrient uptake, chlorophyll *a* and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (*Cryptophyceae*) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering*, v. 35, p. 51-60.

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

LIM, J.; KIM, T.; HWANG, S. (2003). Treatment of fish-processing wastewater by co-culture of *Candida rugopelliculosa* and *Brachionus plicatilis*. *Water Research*, v. 37, p. 2228-2232.

MARTÍNEZ, M.E.; JIMÉNEZ, J.M.; YOUSFI, F. (1999). Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 67, p. 233-240.

MARTÍNEZ, M.E.; JIMÉNEZ, J.M.; EL YOUSFI, F. (2000). Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 67, p. 233-240.

MORGAN-SAGASTUME, F.; ALLEN, D.G. (2005). Activated sludge deflocculation under temperature upshifts from 30 to 45°C. *Water Research*, v. 39, p. 1061-1074.

MULKERRINS, D.; DOBSON, A.D.W.; COLLERAN, E. (2004). Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environment International*, v. 30, p. 249-259.

MURO-PASTOR, M.I.; FLORÊNCIO, F.J. (2003). Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 595-603.

NUÑEZ, V.J.; VONTOLINA, D.; NIEVES, M.; PINA, P.; MEDINA, A.; GUERRERO, M. (2001). Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 78, p. 161-164.

OBAJA, D.; MACÉ, S.; MATA-ALVAREZ, J. (2005). Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. *Bioresource Technology*, v. 73, p. 263-272.

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

PEARSON, M.J. Toxic blue-green algae. Report of the National Rivers Authority Water Quality series n.0 2, United Kingdom, Rushden, Northants, Stanley. L.; 1990.

PARK, E.; ENANDER, R.; BARNETT, S. M.; LEE, C. (2001). Pollution prevention and biochemical oxygen demand reduction in a squid processing facility. *Journal of Cleaner Production*, v. 9, p. 341-349.

PROULX, D.; LESSARD, P.; NOÛE, J. de la. (1994). Tertiary treatment of secondary treated urban wastewater by intensive culture of *Phormidium bohneri*. *Environmental Technology*, v. 15, p. 449-458.

PRZYTOCKA-JUSIAK, M.; MIYNARCZYK, A.; KULESZA, M.; MYCIELSKI, R. (1977). Properties of *Chlorella vulgaris* strain adapted to high concentration of ammonium nitrogen. *Acta Microbiologica Polonica*, v. 26, p. 185-197.

QUEIROZ, M.I.; KOETZ, P.R.; TREPTOW, R.O. The *Nageli microscopica* *Aphanothece* potential in the production of the single-cell protein from the remaining water. In: CHAMES, S.W., CÁNOVAS-BARBOSA, G.V. and AGUILERA, J.M. (Ed.) *Proceedings of the eighth International Congress on Engineering and Food (ICEF 8)*, Pennsylvania, USA, p. 2027-2031, 2001.

QUEIROZ, M. I.; BASTOS, R. G.; BENERI, R. L.; ALMEIDA, R. G. (2002). 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.

QUEIROZ, M.I.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; BASTOS, R. (2003). Influência da razão C/N, temperatura e tempo de detenção na produção de proteína unicelular e remoção de nitrogênio por cianobactéria a partir do efluente da parboilização do arroz. In: VIII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba-Pr, pp. 115-119.

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

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. (2007). 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.

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

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

SARKAR, B.; CHAKABARTI, P.P. VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. (2006). Wastewater treatment in dairy industries – possibility of reuse. *Desalination*, v. 7, p. 141-152.

SHI, XIAN-MING; LIU, HUI-JUN; ZHANG, XUE-WU; CHEN, F. (1999). Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 341-347.

SHI, XIAN-MING; ZHANG, XUE-WU; CHEN, F. (2000). Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 312-318.

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

- TALBOT, P.; De La NÖUE, J. (1993). Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bonheri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Research*, v. 27, p. 153-159.
- TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. (1996). Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 45-50.
- TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. (2000). Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, v. 107, p. 145-151.
- TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M.F. (2006). Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggy waste. *Ecological Engineering*, v. 28, p. 158-165.
- VON SPERLING, M. *Lagoas de estabilização. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, v. 3, 1997.
- VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVES, M.; SOTO, L.P. (1998). Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 265-268.
- VON RÜCKERT, G.; GIANI, A. (2004). Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, p. 325-331.
- WANG, Y.; HUANG, X.; YUAN, Q. (2005). Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic/aerobic membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1733-1739.
- WEN, ZHI-YOU; CHEN, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 21, p. 273-294.
- WHEATON, F.W.; LAWSON, T.B. *Processing aquatic food products*. New York: John Wilwy & Sons, 1985.
- XING, X.H.; JUN, B.M.; YANAGIDA, M.; TANJI, Y.; UNNO, H. (2000). 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.
- ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. (2008). Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1311-1316.

ARTIGO 2

**Efeito de coagulantes no efluente do processamento do pescado visando a separação de
biomassa quando tratado por cianobactéria**

Efeito de coagulantes no efluente do processamento do pescado visando a separação de biomassa quando tratado por cianobactéria

M. O. Hornes; M. I. Queiroz

Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química – Laboratório de Biotecnologia. Rua Eng. Alfredo Huch 475, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil.

Telefone (53) 32338636 - FAX (53) 32338745 - biotecnofurg@yahoo.com.br

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do cloreto férrico e sulfato de alumínio no efluente oriundo do processamento de pescado visando a utilização destes coagulantes na separação de biomassa do efluente tratado por cianobactéria. Foram realizados dois planejamentos fatoriais completos (3^2) 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). Foram consideradas como respostas: sólidos suspensos (SS), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) e fósforo (P-PO_4^{3-}). A melhor condição foi utilizada para avaliar o efeito na separação da biomassa do efluente quando tratado por cianobactéria. Os resultados indicaram aumento da eficiência com a concentração e pH, sendo demonstrada maior eficácia para o FeCl_3 . A melhor condição indicada (300 mg.L^{-1} de FeCl_3 e pH 8,0) mostrou-se eficiente na separação da biomassa. O processo de lavagem da biomassa após tratamento com coagulante pode resultar em 97,6% de remoção do FeCl_3 residual, ficando demonstrada a possibilidade de separação da biomassa pelo uso de coagulantes.

Palavras-chave: coagulante, efluente, pescado, separação de biomassa

ABSTRACT

The work objectives to evaluate the effect of the coagulants ferric chloride and aluminum sulfate when they were used in the effluent from the fish industry to recover the biomass from the effluent. Two factorial designs were used where the variable factors were: coagulant concentration (50 mg.L⁻¹, 300 mg.L⁻¹ and 550 mg.L⁻¹) and pH (6,0, 7,0, 8,0). As a response, suspended solids (SS), chemical oxygen demand (COD), total Kjeldahl nitrogen (TKN), amoniacal nitrogen (N-NH₄⁺) and phosphorus (P-PO₄⁻³) were considered. The best condition was used to assess the effect on the separation of biomass from the effluent. The results showed that the increase of the concentration and pH generated greater efficiency, and the coagulant FeCl₃ was considered the best coagulant. The best condition considered (300 mg.L⁻¹ de FeCl₃ e pH 8,0) showed efficient to harvest the biomass. The process of washing biomass after treatment with coagulant can achieved 97,6% of FeCl₃ residual removal, leaving demonstrated the possibility of separation of biomass for the use of coagulants.

Keywords: coagulant, effluent, fish, separation of biomass

1 INTRODUÇÃO

O crescimento contínuo da industrialização e a rápida urbanização têm aumentado consideravelmente a taxa de poluição da água. O esgotamento do suprimento dos recursos naturais de água tem feito disto uma repressão para o crescimento industrial e para o padrão razoável de vida urbana. As agências de proteção ambiental têm imposto proibições regulatórias mais exigentes e tem iniciado ações de vigilância mais severas junto a organizações não governamentais para a proteção do ambiente (WANG et al., 2005; SARKAR et al., 2006). Há, portanto, a necessidade de utilização de diferentes técnicas de tratamento dos efluentes industriais e domésticos no sentido de atingir os padrões previstos pela legislação ou o reaproveitamento da água gerada nos processos industriais.

As cianobactérias vem sendo aplicadas no tratamento de efluentes industriais devido à sua habilidade para remover com baixo custo o excesso de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo (De LA NÖUE et al., 1992; LEE & KIM, 2001; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007). Por outro lado, estes nutrientes presentes nas águas residuárias podem ser reciclados em uma biomassa de grande valor comercial, a qual pode ser cultivada e utilizada para consumo humano ou na produção de ração animal.

O valor da biomassa está usualmente relacionado com o conteúdo de proteína, ainda que outros constituintes estejam ganhando significativo aumento para determinar o valor nutricional dos alimentos ou suplementos como a fração lipídica e qualidade dos ácidos graxos (QUOC & DUBACQ, 1997; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; QUEIROZ et al., 2002; TOKUSOGLU & ÜNAL, 2003; QUEIROZ et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2007; ZEPKA et al., 2008). No entanto, um dos problemas que vêm sendo enfrentados é a questão da separação da biomassa gerada do efluente tratado.

No processo de separação da biomassa de cianobactérias do meio de cultura um dos maiores problemas está relacionado às características morfológicas das culturas. As cianobactérias possuem um diâmetro pequeno ($< 20 \mu\text{m}$) e muitas espécies apresentam a densidade específica ligeiramente maior do que a água, o que torna a sua separação difícil e onerosa (CRAGGS et al., 1997; BASHAN et al., 2002). Os grupos funcionais orgânicos localizados na parede celular 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.

A literatura cita o processo de floculação/sedimentação como uma das principais alternativas de recuperação de células em suspensão (GRIMA et al., 2003; KIM et al., 2005; RIZZO et al., 2008). A coagulação é um processo físico-químico de tratamento de efluentes utilizado principalmente na redução de turbidez, cor e sólidos suspensos, removendo o material coloidal presente no efluente, antes do tratamento químico ou biológico, para promover a separação de biomassa oriunda do tratamento biológico (Al-MUTAIRI et al., 2004; ABDSEMED & NEZZAL, 2005; KIM et al., 2005; AMUDA & ALADE, 2006; CHOO et al., 2007).

Os compostos químicos que têm sido usados como coagulantes no tratamento de águas e efluentes industriais são o cloreto férrico, sulfato ferroso, cloreto de alumínio, cloreto de cálcio, sulfato de alumínio juntamente com óxido de cálcio hidratado ou carbonato de cálcio, sendo a adição de álcalis necessária quando a água possui alcalinidade muito baixa. Os diferentes coagulantes afetam diferentes graus de desestabilização. Quanto maior a valência do íon, maior é o efeito e menor é a dose necessária para a coagulação (Al-MALACK et al., 1999, SONG et al., 2004; ABDESSEMED & NEZZAL, 2005; SARKAR et al., 2006). Um exemplo disso é a ionização do coagulante cloreto férrico, onde as associações com as cargas negativas presentes nas suspensões coloidais presentes nos efluentes formam os seguintes íons de ferro, os quais são altamente dependentes do pH: $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}_2(\text{OH})_4^{2+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_4^{5+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ e $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ (ABDESSEMED & NEZZAL, 2005; CHOO et al., 2007).

No processo de coagulação/floculação muitos fatores podem influenciar a sua eficiência, tais como tipo e dose de coagulante, pH, velocidade e tempo de mistura, entre outros. A otimização destes fatores pode aumentar significativamente a eficiência do processo (SARKAR et al., 2006; WANG et al., 2007).

O tratamento de efluentes como muitos outros processos industriais podem ser otimizados alterando uma variável de cada vez. Este método assume que os parâmetros do tratamento não interagem e que a variável resposta é função somente de um único parâmetro. Entretanto, a resposta obtida do tratamento resulta das influências interativas de diferentes variáveis. Quando a combinação de várias variáveis independentes e suas interações afetam as respostas desejadas, a metodologia de superfície de resposta é uma ferramenta efetiva para a otimização do processo. A metodologia de superfície de resposta usa o planejamento fatorial para o ajuste do modelo pela técnica dos mínimos quadrados. É uma técnica estatística para o planejamento de experimentos, construção de modelos, avaliação dos efeitos de vários fatores e a busca de condições ótimas para as respostas desejadas (WANG et al., 2007). O

planejamento reduz o número de experimentos ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados, além de ser possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo. A adequação do modelo proposto é então revelado por testes de checagem fornecidos pela análise de variância (ANOVA). Os gráficos de superfície de resposta podem então ser empregados para estudar as superfícies e localizar os pontos ótimos (RODRIGUES & IEMMA, 2005; WANG et al., 2007). Em face disso o trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ no efluente da indústria da pesca em função da concentração e pH em condições padronizadas de velocidade e tempo de mistura, bem como o efeito da melhor condição definida na separação da biomassa gerada no efluente tratado com cianobactéria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Efluente

O efluente foi coletado na planta de tratamento de efluente de uma indústria de processamento de pescado localizada na cidade de Rio Grande, RS, Brasil. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia localizado na Universidade Federal Rio Grande (FURG), Brasil.

2.2 Tratamento químico

Os ensaios para a avaliação do tratamento químico por floculação/coagulação utilizando FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ foram realizados em *Jar-Test* (Jar-Test Milan – modelo JT 101), com seis jarros (copos com capacidade de 2000 mL, altura de 19 cm e largura de 12,5 cm).

Os ensaios foram realizados com 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 20 min. A suspensão foi mantida em repouso para que ocorresse a sedimentação dos flocos e determinada a qualidade do líquido clarificado.

2.2.1 Planejamento experimental

Os experimentos foram realizados segundo dois planejamentos fatoriais completos 3^2 resultando em 18 ensaios sem a inclusão de pontos centrais em duplicata. Os fatores em

estudo foram concentração do coagulante e pH do efluente em três níveis. Os valores reais e codificados para os agentes cloreto férrico e sulfato de alumínio assim como a faixa testada das variáveis em estudo estão expressos na tabela 1. Os valores foram determinados de acordo com a expressão de codificação (equação 1), sendo que a diferença entre os valores das variáveis deve ser a mesma.

$$X = 2 \cdot \frac{\xi_v - \bar{\xi_v}}{\xi_{maior} - \xi_{menor}} \quad (1)$$

Onde: ξ_v = valor da variável; $\bar{\xi_v}$ = valor médio da variável; ξ_{maior} = valor maior da variável e ξ_{menor} = valor menor da variável.

Tabela 1. Codificação dos níveis das variáveis testadas nos planejamentos fatoriais completos 3^2

Variáveis	Níveis das variáveis e faixa estudada		
	-1	0	+1
X_1	50	300	550
X_2	6,0	7,0	8,0

X_1 : concentração do coagulante (mg.L^{-1}); X_2 : pH

2.2.2 Avaliação dos resultados dos planejamentos fatoriais

Os parâmetros considerados como respostas do planejamento experimental foram: eficiência de remoção da demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) e fósforo (P-PO_4^{-3}), avaliados segundo metodologia indicada em Standard Methods para análise de água e efluentes (APHA, 2005).

As eficiências de remoção foram calculadas de acordo com a equação 2.

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

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

C_B = Concentração do constituinte após o tratamento com coagulante.

Utilizando-se a análise de regressão múltipla foram gerados modelos quadráticos, calculados como a soma de uma constante mais os efeitos de primeira ordem, efeitos de interação e os efeitos de segunda ordem das variáveis independentes, conforme expresso na equação 3. Após as superfícies de respostas foram obtidas no sentido de entender o efeito global da concentração de coagulante e pH empregado na remoção dos parâmetros com os maiores coeficientes de regressão.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (3)$$

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

2.3 Separação da biomassa

2.3.1 Cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da indústria da pesca

2.3.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSMAN92, 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 BG11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por RIPPKA et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 30°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 mediante uso de luxímetro tipo LX-101 Digital e termômetros dispostos no interior do reator. A temperatura e intensidade luminosa foram otimizadas em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG11 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 (0,2 g.L⁻¹), $NaNO_3$ (1,5 g.L⁻¹), ácido cítrico (0,006 g.L⁻¹), citrato de amônio férrico (0,006 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),

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,222 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,39 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,079 \text{ g.L}^{-1}$) e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,040 \text{ g.L}^{-1}$) (RIPPKA et al., 1979).

2.3.1.2 Efluente

O meio de cultivo utilizado foi o efluente do processamento do pescado, coletado no tanque de equalização do sistema de tratamento de efluente de uma empresa processadora de pescado do setor industrial da cidade de Rio Grande, RS, Brasil. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e então esterilizado a $1,1 \text{ kgf.cm}^{-2}$ (120°C) por 15 minutos.

2.3.1.3 Desenvolvimento dos experimentos

Os experimentos em duplicata 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 80 cm de altura e 10 cm de diâmetro, tendo sua parte inferior acoplada a um sistema para promover a aeração de 1 VVM e agitação do meio. Um volume de cultura equivalente ao requerido foi centrifugada a 4000 rpm por 20 min, separado do sobrenadante e transferido para o reator sob aeração constante, pH 7,8 a 30°C , ausência de luminosidade, razão C/N 20, N/P 10 e tempo de cultivo de 30 h (HORNES & QUEIROZ, 2004). Os experimentos foram conduzidos em câmara com controle de temperatura.

2.3.1.4 Separação da biomassa gerada

Para a separação da biomassa foi utilizada a melhor condição indicada pela avaliação dos dados obtidos pelo planejamento experimental, quanto ao tipo de coagulante, concentração e pH, seguindo-se o procedimento de separação em *Jar-Test* (Jar-Test Milan – modelo JT 101), conforme descrito no item 2.2. A eficiência do processo foi avaliada com base na remoção de DQO e SS do FeCl_3 nas condições consideradas do efluente do processamento de pescado quando este é tratado por cianobactéria.

Os resultados foram avaliados por análise de Variância (ANOVA) e diferença de médias pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 2 e 3 apresentam as eficiências de remoção das variáveis respostas segundo os planejamentos experimentais utilizados.

Tabela 2. Matriz de planejamento experimental utilizando o coagulante cloreto férrico para o tratamento físico-químico e eficiência de remoção dos parâmetros avaliados

Ensaio	Valores reais e codificados		Resultados				
	X ₁	X ₂	DQO	NTK	N-NH ₄ ⁺	P-PO ₄ ⁻³	SS
1	-1 (50)	-1 (6,0)	63,3	22,8	31,4	0,0	7,4
2	0 (300)	-1 (6,0)	67,1	25,8	33,2	0,0	11,6
3	+1 (550)	-1 (6,0)	79,7	27,3	35,6	0,0	80,1
4	-1 (50)	0 (7,0)	67,1	22,8	26,0	16,7	25,2
5	0 (300)	0 (7,0)	74,7	25,2	32,0	58,7	59,8
6	+1 (550)	0 (7,0)	75,9	29,9	27,3	67,1	78,2
7	-1 (50)	+1 (8,0)	54,4	20,1	29,7	16,3	41,2
8	0 (300)	+1 (8,0)	72,3	22,8	19,6	8,7	88,4
9	+1 (550)	+1 (8,0)	86,1	23,1	17,8	5,9	87,7

*X₁: Concentração do coagulante (mg.L⁻¹); X₂: pH; DQO: demanda química de oxigênio; NTK: nitrogênio total Kjeldahl; N-NH₄⁺: nitrogênio amoniacal; P-PO₄⁻³: fósforo; SS: Sólidos suspensos

Tabela 3. Matriz de planejamento experimental utilizando o coagulante sulfato de alumínio para o tratamento físico-químico e eficiência de remoção dos parâmetros avaliados

Ensaio	Valores reais e codificados		Resultados				
	X ₁	X ₂	DQO	NTK	NH ₄ ⁺	P-PO ₄ ⁻³	SS
1	-1 (50)	-1 (6,0)	44,2	15,3	23,2	0,0	30,8
2	0 (300)	-1 (6,0)	56,9	17,8	12,2	0,0	69,2
3	+1 (550)	-1 (6,0)	57,9	19,3	12,2	0,0	70,6
4	-1 (50)	0 (7,0)	36,6	15,4	10,4	8,9	24,2
5	0 (300)	0 (7,0)	48,6	18,2	12,2	42,8	58,3
6	+1 (550)	0 (7,0)	64,2	21,8	12,8	52,5	79,5
7	-1 (50)	+1 (8,0)	40,4	12,2	12,2	9,8	22,3
8	0 (300)	+1 (8,0)	56,7	14,6	6,7	5,8	67,8
9	+1 (550)	+1 (8,0)	60,4	15,3	6,7	2,5	73,5

*X₁: Concentração do coagulante (mg.L⁻¹); X₂: pH; DQO: demanda química de oxigênio; NTK: nitrogênio total Kjeldahl; N-NH₄⁺: nitrogênio amoniacal; P-PO₄⁻³: fósforo; SS: Sólidos suspensos

A análise dos dados indica que independente da condição avaliada, as maiores remoções foram registradas para DQO e sólidos suspensos. Isso se justifica, uma vez que os processos de coagulação e floculação são técnicas padrões utilizadas em tratamento de efluentes para remoção de sólidos suspensos, matéria orgânica e turbidez (VOLK et al., 2000; AGUILAR et al., 2002; EBELING et al., 2003; Al-MUTAIRI et al., 2004; SARKAR et al., 2006). No entanto, no que se refere as melhores condições, tomando como base estas variáveis, verifica-se uma superioridade quanto às eficiências de remoção dos parâmetros avaliados quando se utiliza como coagulante o FeCl₃, notadamente para os experimentos 3, 6,

8 e 9. A maior eficiência para o FeCl_3 em relação ao $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ tem sido evidenciada por diferentes autores (NUÑEZ et al., 1999; EBELING et al., 2003; Al-MUTAIRI et al., 2004; MITTAL, 2006; SARKAR et al., 2006). Nuñez et al. (1999) trabalhando com FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ no tratamento de águas residuárias de abatedouro bovino obtiveram remoções de DQO de 75% e 45%, respectivamente. Esses valores são muito próximos aos encontrados para as condições 3, 5, 6 e 9 para FeCl_3 e 1 e 5 para $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ neste trabalho.

Os dados registrados indicam ainda que a remoção dos compostos nitrogenados foi baixa em todos os tratamentos, com valores máximos de 29,9% e 21,8% para o NTK e 35,6% e 23,2% para o N-NH_4^+ , quando utilizados os coagulantes FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 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 NTK as maiores remoções (86,7% e 5,9%, respectivamente) foram constatadas a pH 6,0. Para o coagulante FeCl_3 a melhor condição encontrada pelos autores foi 200 mg.L^{-1} e pH 6,0, com remoção média de 79,3%, 38,9%, 5,55% e 5,62% para os parâmetros fósforo total, DQO, NTK e N-NH_4^+ , respectivamente. Por outro lado, o aumento do pH de 6,0 para 8,0 não provocou mudanças perceptíveis na remoção dos parâmetros avaliados.

Para as melhores condições sugeridas pelos dados obtidos (experimentos 3, 6, 8 e 9), observa-se de forma geral que o aumento da concentração de coagulante levou a maior eficiência de remoção das variáveis analisadas. Essa tendência pode ser confirmada em função dos dados apresentados nas tabelas 4 e 5, que mostram a influência dos efeitos e significâncias das variáveis em estudo sobre a eficiência de redução de DQO, NTK, N-NH_4 , P-PO_4^{-3} e SS quando utilizados os agentes coagulantes FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, respectivamente.

Tabela 4. Análises dos efeitos principais e interação para a ação do coagulante cloreto férrico na remoção dos parâmetros avaliados

Fator	DQO			NTK			N-NH_4^+			P-PO_4^{-3}			SS		
	Efeito	Err.P	p	Efeito	Err.P.	p	Efeito	Err.P	p	Efeito	Err.P	p	Efeito	Err.P.	p
Interc.	74,7	0,39	0,00	24,6	0,40	0,00	25,7	1,16	0,00	24,1	0,34	0,00	64,8	0,58	0,00
X ₁	21,1	0,86	0,00	4,4	0,86	0,00	-3,40	2,57	0,22	12,4	0,74	0,00	53,2	1,29	0,00
X ₂	3,03	0,86	0,00	-3,7	0,89	0,00	-12,3	2,57	0,00	5,9	0,74	0,00	30,3	1,29	0,00
X ₁ X ₂	6,53	0,76	0,00	-1,42	0,79	0,11	-3,88	2,28	0,12	-13,2	0,66	0,00	-12,8	1,14	0,00

X₁: Concentração de coagulante; X₂: pH; X₁ X₂: interação entre concentração de coagulante e pH

Interc.: Intercepção; Err. P: Erro padrão

Tabela 5. Análises dos efeitos principais e interação para a ação do coagulante sulfato de alumínio na remoção dos parâmetros avaliados

Fator	DQO			NTK			N-NH ₄ ⁺			P-PO ₄ ⁻³			SS		
	Efeito	Err.P	p	Efeito	Err.P	p	Efeito	Err.P	p	Efeito	Err.P	p	Efeito	Err.P	p
Interc.	54,9	0,67	0,00	16,7	0,45	0,00	10,1	0,74	0,00	1,12	0,12	0,00	65,6	0,72	0,00
X ₁	20,0	1,48	0,00	4,14	0,99	0,00	-4,80	1,63	0,02	0,00	0,28	0,98	52,1	1,59	0,00
X ₂	-0,93	1,48	0,55	-3,79	0,99	0,00	-7,45	1,63	0,00	1,93	0,28	0,00	-9,53	1,60	0,00
X ₁ X ₂	-1,23	1,31	0,37	1,02	0,95	0,31	-0,36	1,45	0,81	-0,96	0,25	0,00	-0,21	1,42	0,88

X₁: Concentração de coagulante; X₂: pH; X₁ X₂: interação entre concentração de coagulante e pH

Interc.: Intercepção; Err. P: Erro padrão

Na tabela 4 se pode verificar que o efeito da concentração de coagulante foi significativo e positivo para todas as respostas em um nível de confiança de 95%. A exceção ocorreu para o parâmetro N-NH₄⁺, em que a concentração de coagulante apresentou efeito negativo e não significativo, resultando em maior redução da DQO, NTK, P-PO₄⁻³ e SS quando há o aumento da concentração de coagulantes de 50 mg.L⁻¹ para 550 mg.L⁻¹. Amuda & Amoo (2007) constataram que concentrações acima de 400 mg.L⁻¹ de FeCl₃ no efluente da indústria de bebidas conferiram cargas positivas na superfície das partículas redispersando-as. Para o Al₂(SO₄)₃ a variável pH não exerceu efeito significativo na remoção de matéria orgânica (tabela 5). O aumento no pH de 6,0 para 8,0 exibiu o aumento em pequena ordem para a remoção de P-PO₄⁻³ e o decréscimo da remoção de SS. A concentração de coagulante, contudo, apresentou efeito não significativo apenas para a remoção de P-PO₄⁻³. Ao contrário do efeito do agente coagulante FeCl₃, a concentração de coagulante para a remoção de P-PO₄⁻³ e o pH para a remoção de DQO não apresentaram efeito significativo. Também no que se refere à variável P-PO₄⁻³ o coagulante Al₂(SO₄)₃ apresentou efeito pequena ordem quando se leva em conta o pH.

Os efeitos de ordem maior foram verificados para a remoção de DQO e SS, observando-se ainda que para o FeCl₃ tanto a concentração de coagulante como o pH tiveram efeito significativo e positivo. Os efeitos não significantes ou de ordem inferior encontrados para a variável pH, quando utilizado o coagulante Al₂(SO₄)₃, não foram considerados erros no processo ou má atuação do agente, uma vez que a faixa ótima de atuação deste composto em relação ao pH está entre 6,5-7,5 (EBELING et al., 2003) e o delineamento experimental extrapolou estes limites. A maior sensibilidade ao pH pelo coagulante Al₂(SO₄)₃ em relação ao FeCl₃ foi também verificado por Al-Malack et al. (1999) no tratamento de efluentes industriais pelo processo de coagulação/floculação, os quais realizaram experimentos variando o pH na faixa de 6,0 a 10.

O efeito do pH para ambos coagulantes foi negativo para as variáveis $N-NH_4^+$ e NTK, o que indica uma maior remoção em pH 6,0-7,0. Isso pode ser atribuído ao fato que quando o pH fica na faixa de 5,0-7,0 irá predominar o íon amônio, e nesta forma o íon amônio permanecerá na forma ionizada no meio ou se unirá por atração eletrostática à superfície das partículas coloidais carregadas negativamente e a remoção destas partículas pela coagulação/floculação causará a redução do nitrogênio amoniacal associada a elas (SONG et al., 2004; El-BESTAWY & HUSSEIN, 2005).

A alta remoção de sólidos suspensos pela ação de coagulante está de acordo com o estudo realizado por Ata & Jameson (2005), que encontraram 98% de remoção em efluentes industriais. No presente trabalho o valor máximo (89%) para a remoção de sólidos suspensos do efluente do processamento de pescado foi alcançado no maior valor de pH e concentração.

A tabela 6 apresenta os modelos polinomiais na forma codificada gerados a partir da análise de regressão para as respostas eficiência de remoção de DQO e SS, quando utilizados os coagulantes $FeCl_3$ e $Al_2(SO_4)_3$.

Tabela 6. Modelos de regressão para as variáveis respostas

Modelo Codificado	R ²	
$FeCl_3$		
DQO = $74,1 + 9,6.X_1 - 0,09.X_1^2 + 2,47.X_2 - 0,02.X_2^2 + 0,001.X_1.X_2$		
Erro Puro: 2,05	0,87	Eq. 3
SS = $42,7 + 20,2.X_1 - 0,19.X_1^2 + 17,9.X_2 - 0,17.X_2^2 - 0,002.X_1.X_2$		
Erro Puro: 4,59	0,93	Eq. 4
$Al_2(SO_4)_3$		
DQO = $52,1 + 13,5.X_1 - 0,13.X_1^2 - 3,21.X_2 + 0,03.X_2^2$		
Erro Puro: 6,03	0,87	Eq. 5
SS = $70,9 + 45,9.X_1 - 0,45.X_1^2 - 6,56.X_2 + 0,06.X_2^2$		
Erro Puro: 7,02	0,88	Eq. 6

X_1 : concentração de coagulante; X_2 : pH; R²: coeficiente de determinação

A eficiência estatística das equações polinomiais é validada pelo teste de Fisher, e que 87% a 93% da variabilidade das respostas pode ser explicada pelos modelos propostos, indicando que estes se ajustam aos dados experimentais. A 95% de confiança o valor de F calculado é maior que o F crítico (tabelas 7 e 8) para a remoção de DQO e SS.

Tabela 7. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados para o coagulante cloreto férrico

Fonte de Variação	DQO					SS				
	SQ	GL	MQ	F _{Calc}	F _{Crit}	SQ	GL	MQ	F _{Calc}	F _{Crit}
Regressão	1249	5	250	16,3	3,11	14302	5	2860	32,5	3,11
Resíduo	183	12	15,3			1055	12	87,9		
Falta Ajuste	165	3	55,1			1014	3	338		
Erro Puro	18,4	9	2,1			41,3	9	4,59		
Total	1434	17	84,3			15357	17	903		

Tabela 8. Análise de variância para o ajuste dos modelos gerados para o coagulante sulfato de alumínio

Fonte de Variação	DQO					SS				
	SQ	GL	MQ	F _{Calc}	F _{Crit}	SQ	GL	MQ	F _{Calc}	F _{Crit}
Regressão	1336	4	334	21,1	3,18	10081	4	2520	23,9	3,18
Resíduo	206	13	15,8			1372	13	106		
Falta Ajuste	151	4	37,8			1309	4	327		
Erro Puro	54,3	9	6,0			63,2	9	7,0		
Total	1541	17	90,7			11453	17	674		

As figuras 1 e 2 apresentam os diagramas das superfícies de respostas elaboradas a partir dos modelos de regressão expressos na tabela 6, os quais descrevem o comportamento da remoção de DQO e SS em função dos fatores em estudos descritos pela matriz de planejamento experimental (tabela 1).

No que concerne à remoção de sólidos suspensos, observa-se nas figuras 1 e 2 que o pH exerce maior influência no processo de coagulação utilizando o FeCl_3 do que o $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, onde as maiores remoções são registradas para os maiores valores de pH. Contudo, os melhores resultados para remoção de DQO e SS, considerando os dois tipos de coagulantes estudados, podem ser encontrados com as concentrações maiores na faixa experimental estudada (300 mg.L^{-1} e 550 mg.L^{-1}). Esses resultados estão de acordo com Nuñez et al. (1999), que aplicaram os coagulantes FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ no tratamento de efluente de abatedouro bovino. Os pesquisadores mostraram reduções de DQO de 75% e 45%, respectivamente. Resultados similares foram relatados na aplicação do processo de coagulação-floculação como tratamento em efluente doméstico misturado com efluente industrial no qual a redução de 69,5% de DQO foi obtida na presença de 200 mg.L^{-1} de FeCl_3 a pH 6,0 (El-BESTAWY & HUSSEIN, 2005).

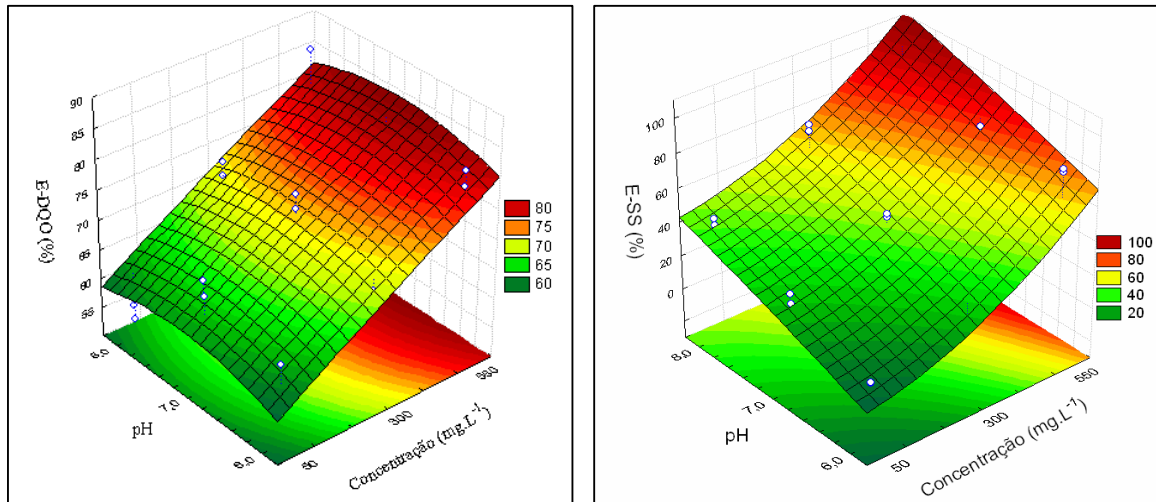


Figura 1. Superfícies de resposta para eficiência de remoção de DQO e SS utilizando FeCl_3 como coagulante

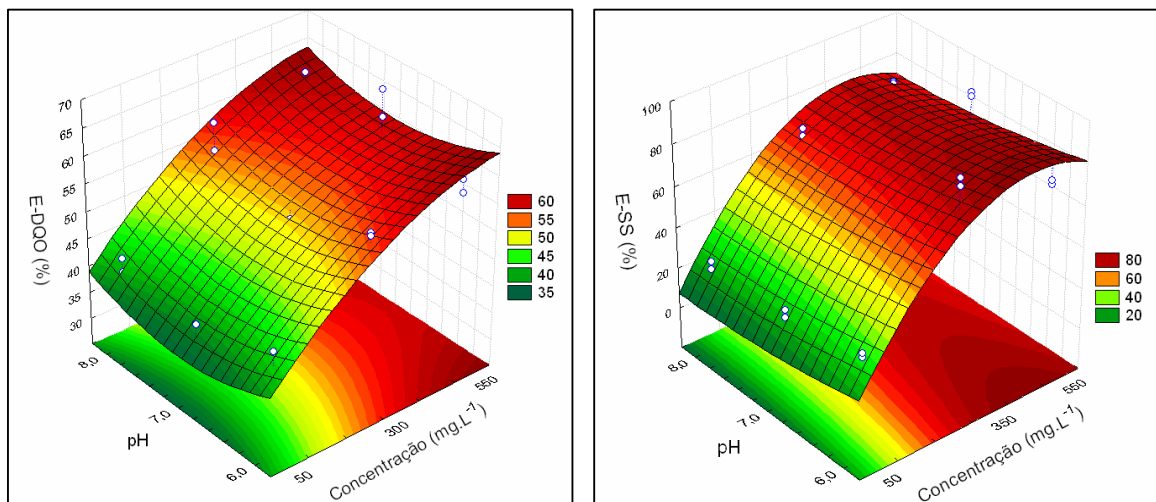


Figura 2. Superfícies de resposta para eficiência de remoção de DQO e SS utilizando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ como coagulante

A tabela 9 apresenta as diferenças de médias segundo o teste de Tukey para os valores de eficiência de remoção de DQO e SS registrados para as condições 3, 6, 8 e 9 utilizando FeCl_3 . Os dados indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto a eficiência de remoção de DQO do experimento 9 em relação aos demais experimentos, os quais não diferiram entre si. Quanto a variável SS, os resultados indicam diferença significativamente definida ($p \leq 0,05$) em relação a todos os tratamentos com exceção do tratamento 8 e 9. Contudo, para o tratamento 8 (300 mg.L^{-1}) a concentração de coagulante utilizada é inferior ao tratamento 9 (550 mg.L^{-1}). Considerando ainda que o tratamento pela cianobactéria *Aphanothece*

microscopica Nägeli já é capaz de remover significativamente a matéria orgânica (HORNES & QUEIROZ, 2008), é possível definir como melhor condição a ser utilizada para separação da biomassa segundo o planejamento experimental utilizado o uso de cloreto férrico na concentração de 300 mg.L⁻¹ a pH 8,0, uma vez que este tratamento não difere significativamente ($p \leq 0,05$) quanto a eficiência de remoção de sólidos suspensos do experimento 9 e traz consigo a vantagem de utilizar menor concentração de coagulante.

Tabela 9. Diferença de médias segundo teste de Tukey para as eficiências de remoção de DQO e SS para os experimentos 3, 6, 8 e 9 utilizando como coagulante cloreto férrico

Parâmetro	Experimento			
	3	6	8	9
E-DQO	79,7 ^a	75,9 ^a	72,3 ^a	86,1 ^b
E-SS	80,1 ^a	78,2 ^b	88,4 ^c	87,7 ^c

*Experimento 3 (550 mg.L⁻¹; pH 6,0); Experimento 6 (550 mg.L⁻¹; pH 7,0); Experimento 8 (300 mg.L⁻¹; pH 8,0); Experimento 9 (550 mg.L⁻¹; pH 8,0); E-DQO: Eficiência de remoção de DQO (%); E-SS: Eficiência de remoção de SS (%)

Na tabela 10 pode ser verificado o efeito de FeCl₃ na concentração de 300 mg.L⁻¹ a pH 8,0 na separação da biomassa gerada no efluente da indústria da pesca pela cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. Avaliando os dados expressos é importante salientar que as indústrias processadoras de alimentos resultam em efluentes com elevada DQO (GUERRERO et al., 1999; BERARDINO et al., 2000; SROKA et al., 2004). De acordo com Sroka et al. (2004) com a aplicação de um processo de tratamento biológico é possível atingir em torno de 90% de remoção. A cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli tem demonstrado importante capacidade removedora de DQO (QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2005; QUEIROZ et al., 2007), com registros equivalentes e mesmo superiores aos registrados neste trabalho. No entanto é notória a vantagem ao utilizarmos coagulante para separação da biomassa gerada, resultando em efluente com eficiência de 100% de remoção, o qual poderia resultar em água de reuso industrial.

Tabela 10. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos suspensos (SS) por *Aphanothece microscopica* Nägeli e cloreto férrico

Parâmetro (mg.L ⁻¹)	EA	EB	ET
DQO	100	100	100
SS	-88,1	88,4	88,4

*EA: eficiência de remoção por *Aphanothece microscopica* Nägeli; EB: eficiência de remoção por coagulação com FeCl₃ após tratamento com *Aphanothece*; ET: eficiência de remoção total

Um dos problemas na utilização de microalgas para a remoção de nutrientes é a sua recuperação do efluente tratado, em virtude de seu pequeno diâmetro, tornando difícil sua separação, sendo o processo por sedimentação ou floculação indicado (LALIBERTÉ et al., 1997; CRAGGS et al., 1997; BASHAN et al., 2002; GRIMA et al., 2003). A alta eficiência de remoção (88,4%) de sólidos suspensos registrada neste trabalho após o tratamento com cianobactéria associada ao coagulante sugere a eficácia do FeCl_3 nas condições utilizadas para a separação da biomassa. Este efeito pode ser atribuído a propriedade de rápida associação cinética entre compostos orgânicos e íons de ferro no pH considerado. Semmens & Field (1980) reportam que a elevada eficiência de remoção de matéria orgânica e sólidos para coagulantes como FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ pode estar ligada a propriedade de associação cinética dos parâmetros considerados a íons de ferro e alumínio no intervalo de pH de 5,0 a 8,0.

A existência de uma carga superficial negativa em muitas cianobactérias resulta em alta afinidade com íons metálicos, o que tornam estes microrganismos especialmente efetivos na remoção destes componentes (VOLTOLINA et al., 1998; BASHAN et al., 2002; MOHAN, RAO & PRASSAD, 2005). Isso justifica a alta eficiência no processo de separação da biomassa registrada. No entanto passa a ser uma preocupação, considerando que segundo GRIMA et al. (2003) o uso de sais metálicos pode ser inaceitável dependendo da finalidade a qual será dada a biomassa. Nesse sentido a dessorção de FeCl_3 na biomassa por sucessivas lavagens foram consideradas.

A tabela 11 fornece o resultado de remoção de FeCl_3 da biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente da indústria da pesca e separada mediante o uso de coagulante metálico, em função do número de lavagem com água após o processo de separação, bem como a concentração residual de coagulante no efluente tratado.

Tabela 11. Remoção de cloreto férrico da biomassa em função de sucessivas lavagens

Etapa	FeCl_3 residual (mg)	% Remoção
0 ¹	382 ^a ±43	
1 Lavagem	1249 ^b ±169	53,7
2 Lavagem	574 ^c ±98	78,7
3 Lavagem	231 ^d ±58	91,4
4 Lavagem	107 ^d ±21	96,1
5 Lavagem	67 ^d ±27	97,5
6 Lavagem	65 ^d ±15	97,6
Total	2676	

¹A etapa "0" corresponde ao FeCl_3 residual no efluente após a sedimentação da biomassa, antes de ser submetido às lavagens. Os valores apresentados são médias de 6 repetições ± Desvio Padrão.

Os dados expressos consideram a biomassa total gerada em um volume de efluente de 9 L com adição de 300 mg.L^{-1} de FeCl_3 o que perfaz uma massa de 2700 mg. Observa-se uma eficiência de dessorção de 53,7% na primeira lavagem, considerando a concentração de FeCl_3 residual de 382 mg após a precipitação da biomassa. É atingido 91,4% na terceira lavagem, sendo demonstrada pela análise de variância não haver diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quanto às eficiências expressas na 4ª, 5ª e 6ª etapa do processo. Esses resultados sugerem que a otimização do processo de lavagem pode resultar em biomassa praticamente isenta de FeCl_3 adsorvido.

4 CONCLUSÃO

A análise dos resultados permite concluir maior eficácia do FeCl_3 em relação ao $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ como coagulante, sendo indicada como melhor condição a utilização de 300 mg.L^{-1} de FeCl_3 a pH 8,0.

Os coagulantes utilizados demonstram-se eficientes quanto à remoção de DQO e SS, no entanto com baixa eficiência para NTK, N-NH_4^+ e P-PO_4^{-3} .

O tipo de coagulante, concentração e pH influenciam significativamente na remoção dos parâmetros avaliados, aumentando notadamente a eficiência de remoção com a utilização de cianobactéria.

O processo associado ao tratamento de efluente por *Aphanothece* e a separação da biomassa por FeCl_3 na melhor condição considerada resulta em 100% de remoção de DQO.

A melhor condição considerada demonstrou ser altamente eficiente para a separação da biomassa gerada no tratamento de efluente por *Aphanothece microscopica* Nägeli.

O processo de lavagem da biomassa após tratamento com coagulante pode resultar em 97% de remoção do FeCl_3 residual, ficando demonstrada a possibilidade de separação da biomassa pelo uso de coagulantes.

5 REFERÊNCIAS

- ABDESSEMED, D.; NEZZAL, G. (2005). Tertiary treatment of a secondary effluent by the coupling of coagulation-adsorption-ultrafiltration for reuse. *Desalination*, v. 175, p. 135-141.
- AGUILAR, M.I.; SÁEZ, J.; LLORÉNS, M.; SOLER, A.; ORTUÑO, J.F. (2002). Nutrient removal and sludge production in the coagulation-flocculation process. *Water Research*, v. 36, p. 2910-2919.

- Al-MALACK, M.H.; ABUZAIID, N.S.; El-MUBARAK, A.H. (1999). Coagulation of polymeric wastewater discharged by a chemical factory. *Water Research*, v. 33, p. 521-529.
- Al-MUTAIRI, N.Z.; HAMODA, M.F.; Al-GHUSAIN, I. (2004). Coagulant selection and sludge conditioning in a slaughterhouse wastewater treatment plant. *Bioresource Technology*, v. 95, p. 115-119.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2005), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. Washington.
- AMUDA, O.S.; ALADE, A. (2006). Coagulation/flocculation process in the treatment of abattoir wastewater. *Desalination*, v. 196, p. 22-31.
- AMUDA, O.S.; AMOO, I.A. (2007). Coagulation/flocculation process and sludge conditioning in beverage industrial wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 141, p. 778-783.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. (2000). Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 459-479.
- ATA, S.; JAMESON, G.J. (2005). The formation of bubble clusters in flotation cells. *International Journal of Mineral Processing*, v. 76, p. 123-139.
- BASHAN, L.E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J.P.; BASHAN, Y. (2002). 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.
- BERARDINO, S.; COSTA, S.; CONVERTI, A. (2000). Semi-continuous anaerobic digestion of a food industry wastewater in an anaerobic filter. *Bioresource Technology*, v. 71, p. 261-266.
- CHOO, K.H.; CHOI, S.J.; HWANG, E.D. (2007). Effect of coagulant types on textile wastewater reclamation in a combined coagulation/ultrafiltration system. *Desalination*, v. 202, p. 262-270.
- CRAGGS, R.J.; McAULEY, O.J.; SMITH, V.J. (1997). Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Research*, v. 31, p. 1701-1707.
- De La NOÛE, J.; LALIBERTÉ, G.; PROULX, D. (1992). Algae and wastewater. *Journal Applied Phycology*, v. 4, p. 247-254.
- EBELING, J.M.; SIBRELL, P.L.; OGDEN, S.R.; SUMMERFELT, S.T. (2003). 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.

EI-BESTAWY, E.; HUSSEIN, H. (2005). Comparison between biological and chemical treatment of wastewater containing nitrogen and phosphorus. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 195-203.

GRIMA, E.M.; BELARBI, E.H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; ROBLES, M.A.; CHISTI, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 491-515.

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

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

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

KIM, S.H.; MOON, S.Y.; YOON, C.H.; YIM, S.K.; CHO, J.W. (2005). Role of coagulation in membrane filtration of wastewater for reuse. *Desalination*, v. 173, p. 301-307.

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

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

MITTAL, G.S. (2006). Treatment of wastewater from abattoirs before land application – a review. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1119-1135.

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

NUÑEZ, L.A.; FUENTE, E.; MARTINEZ, B.; GARCIA, M. (1999). Slaughterhouse wastewater treatment using ferric and aluminum salts and organic polyelectrolites. *Journal of Environment Science and Health*, v. 34, p. 721-736.

QUEIROZ, M.I.; BASTOS, R.G.; BENERI, R.L.; ALMEIDA, R.G. (2002). 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.

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

- QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L. Q.; MITTERER, M.L.; GOLDBECK, R.; PINTO, L.A.A.; TREPTOW, R.O. (2005). Avaliação da cor da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em diferentes condições de secagem. *Revista Vetor*, v. 15, p. 33-40.
- QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. (2007). 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.
- QUOC, K.P.; DUBACQ, JEAN-PAUL. (1997). Effect of growth temperature on the biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1346, p. 237-246.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. (1979). Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, p. 01-61.
- RIZZO, L.; Di GENNARO, A.; GALLO, M.; BELGIORNO, V. (2008). Coagulation/chlorination of surface water: A comparison between chitosan and metal salts. *Separation and Purification Technology*, v. 62, p. 79-85.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos – Uma estratégia seqüencial de planejamento*. São Paulo: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.
- SARKAR, B.; CHAKRABARTI, P.P.; VIJAYKUMAR, A.; KALE, V. (2006). Wastewater treatment in dairy industries – possibility of reuse. *Desalination*, v. 195, p. 141-152.
- SEMMENS, M.J.; FIELD, T.K. (1980). Coagulation: experiences in organic removal. *Journal American Water Works Association*, p. 476-83.
- SONG, Z.; WILLIAMS, C.J.; EDYVEAN, R.G.J. (2004). Treatment of tannery wastewater by chemical coagulation. *Desalination*, v. 164, p. 249-259.
- SROKA, A.; KAMINSKI, W.; BOHDZIEWICZ, J. (2004). Biological treatment of meat industry wastewater. *Desalination*, v. 162, p. 85-91.
- TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M.K. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 1144-1148.
- VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVES, M.; SOTO, L.P. (1998). Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 265-268.
- VOLK, C.; BELL, K.; IBRAHIM, E.; VERGES, D.; AMY, G.; LECHEVALLIER, M. (2000). Impact of enhanced and optimized coagulation on removal of organic matter and its biodegradable fraction in drinking water. *Water Research*, v. 34, p. 3247-3257.
- ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. (2008). Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1311-1316.

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

WANG, J.P.; CHEN, Y.Z.; GE, X.W.; YU, H.Q. (2007). Optimization of coagulation-flocculation process for a paper-recycling wastewater treatment using response surface methodology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v. 302, p. 204-210.

ARTIGO 3

**Efeito da temperatura na composição química, clorofila *a* e ficocianina da cianobactéria
Aphanothece microscopica Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de
pescado**

Efeito da temperatura na composição química, clorofila *a* e ficocianina da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado

M. O. Hornes; M. I. Queiroz

Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química – Laboratório de Biotecnologia. Rua Eng. Alfredo Huch 475, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil.

Telefone (53) 32338636 - FAX (53) 32338745 - biotecnofurg@yahoo.com.br

RESUMO

A biomassa gerada no efluente do processamento do pescado a 10°C, 20°C e 30°C e em meio padrão BG11 a 30°C foi caracterizada quanto à composição química e teores de clorofila *a* e ficocianina. Foram realizados experimentos em duplicata utilizando inóculos de 200 mg.L⁻¹ em reatores de mistura completa com capacidade de 4,5 L, tendo sua parte inferior acoplada a um sistema de aeração e agitação do meio. Os experimentos no efluente foram conduzidos na ausência de luz e em meio padrão a 2 klux em fotoperíodo de 12 h. Os resultados indicaram que a temperatura exerce influência significativa ($p \leq 0,05$) na composição química, conteúdo de clorofila *a* e ficocianina. São indicadas as temperaturas de 10°C e 20°C para a otimização da produção de lipídios e carboidratos e 30°C para proteínas e sais minerais. Ficou demonstrado o potencial de utilização do efluente do processamento de pescado na produção de proteína unicelular, caracterizando-se a biomassa como importante fonte de proteína, carboidratos, lipídios, sais minerais e pigmentos como clorofila *a* e ficocianina.

Palavras-chave: cianobactéria, composição química, clorofila *a*, efluente pescado, ficocianina, temperatura

ABSTRACT

The chemical profile (protein, carbohydrate, lipid and ash) and the concentration of chlorophyll *a* and phycocyanin of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli was studied at 10°C, 20°C and 30°C in the fish processing effluent and in BG11 medium at 30°C. Experiments in duplicate using 200 mg.L⁻¹ inoculums were carried out in 4,5 L complete stirred reactor, and in its lower part a system with porous stones was coupled for the air entrance, providing aeration and agitation of the medium. The experiments in the effluent were run in darkness and in BG11 medium at 2 klux and 12 h photoperiod. The results showed the significant influence ($p \leq 0,05$) of the temperature in the chemical composition and chlorophyll *a* and phycocyanin content. The temperatures of 10°C and 20°C are indicated for the production optimization of lipids and carbohydrates and 30°C for proteins and mineral salts. It was demonstrated the potential of the fish processing effluent in single cell protein production, and the importance of the biomass as a source of protein, carbohydrate, lipid, mineral salts and pigments like chlorophyll *a* and phycocyanin.

Keywords: cyanobacterium, chemical composition, chlorophyll *a*, fish effluent, phycocyanin, temperature

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias constituem um grupo imenso e diverso de organismos procariontes fotossintéticos que estão entre os mais antigos do planeta. Tem sido demonstrado o potencial de cianobactérias e microalgas na remoção de nutrientes de efluentes de indústrias alimentícias, uma vez que várias espécies são capazes de utilizarem compostos orgânicos como fonte de carbono (VOLTOLINA et al., 1998; KALAVATHI et al., 2001; ASLAN & KAPDAN, 2006; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007).

O desenvolvimento de trabalhos que enfatizem o crescimento e composição química de cianobactérias cultivadas em efluentes se torna importante, considerando que a composição e concentração de substâncias celulares irão variar de acordo com fatores como a natureza do microrganismo, meio de cultivo e as condições em que estes se realizam (FIDALGO et al., 1998; FUENTES et al., 2000; SANTOS et al., 2003; RANGEL-YAGUI et al., 2004). Assim, o interesse por estes microrganismos tem sido baseado em suas diferentes aplicações, como biofertilizantes, antibióticos, corantes para alimentos e bebidas, alimentação humana e animal, entre outras (KREITLOW et al., 1999; OLVERA-RAMÍREZ et al., 2000; TOKUSOGLU & ÜNAL, 2003; GARCÍA-FERNÁNDEZ & DIEZ, 2004; SPOLAORE et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; SILVA & SILVA, 2007; ZEPKA et al., 2008).

Outra questão que desperta interesse são as altas taxas de crescimento que estabelecem vantagens tecnológicas e comerciais em comparação com as técnicas convencionais de produção de nutrientes. Alguns produtos obtidos a partir destas técnicas tem sido denominados proteínas unicelulares, que se referem a células desidratadas de determinados microrganismos utilizados como alimentos ou aditivos. De acordo com Anupama & Ravindra (2000), além das frações de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e lipídios, estão inclusos no termo proteínas unicelulares os pigmentos. Estes últimos componentes têm sido objeto crescente de interesse comercial tanto no que se refere a sua aplicação como corantes naturais, substituindo os sintéticos nas indústrias de alimentos e cosméticos, como as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (AUSTIN et al., 1996; LORETO et al., 2003; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004; STREIT et al., 2005).

As cianobactérias podem apresentar substâncias celulares como ácidos graxos, carboidratos, proteínas e pigmentos em composição e concentração variáveis, refletindo a natureza do organismo, a influência das condições de cultivo e o próprio estado fisiológico de culturas. Desta forma existe a possibilidade de se obter uma espécie com diferentes

composições bioquímicas produzidas pela manipulação de alguns fatores (LOURENÇO et al., 1997; ROMANO et al., 2000).

Faintuch et al. (1992) reportam que a maior experiência disponível sobre cianobactérias como fonte de proteína relaciona-se com a *Spirulina maxima*. No entanto, muitas investigações tem sido realizadas com outras espécies, como as pertencentes aos gêneros *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Aphanothece* (HALPERIN et al., 1974; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2004; ZEPKA et al., 2007; ZEPKA et al., 2008).

A *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma cianobactéria da família *Choroococaceae*, constituindo um dos maiores sub-grupos de procariontes apresentando cerca de 150 gêneros e mais de mil espécies descritas (RIPKA et al., 1979). É caracterizada por apresentar células esféricas, ovóides ou cilíndricas, medindo 9,0-9,5µm x 4,2 µm, cerca de 2,1 vezes mais comprida que larga (HALPERIN et al., 1974). Este microrganismo tem sido estudado quanto à capacidade de remoção de nutrientes de efluentes industriais com importantes resultados (QUEIROZ et al. 2002; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2007), mostrando rápido crescimento quando cultivada no efluente da parboilização do arroz, tanto na presença como na ausência de luz (QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007).

A eficiência quanto à produção de compostos de interesse pode ser otimizada em função de parâmetros como temperatura, luminosidade, concentração e natureza de nutrientes em condições de cultivo controladas. A *Aphanothece microscopica* Nägeli tem sido apontada como importante fonte de ácidos graxos e aminoácidos essenciais (JACOB-LOPES, 2006; ZEPKA et al., 2007; ZEPKA et al., 2008). Neste contexto, vários estudos já foram realizados sobre o efeito de diferentes condições de cultivo na biomassa utilizando principalmente como meio de cultura o efluente da parboilização do arroz (QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2007). No entanto, quanto a influência da temperatura na composição proximal, clorofila *a* e ficocianina quando desenvolvida no efluente da indústria processadora do pescado não se tem qualquer informação. Em face disso, o trabalho teve por objetivo avaliar a composição em proteína, carboidratos, lipídios, cinzas, clorofila *a* e ficocianina na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado a diferentes temperaturas e em meio padrão BG11.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

2.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSMAN92, 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 BG11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por RIPPKA et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 30 °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 mediante uso de luxímetro tipo LX-101 Digital e termômetros dispostos no interior do reator. A temperatura e intensidade luminosa foram otimizadas em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG11 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), ácido cítrico (0,006 g.L⁻¹) e citrato férrico de amônio (0,006 g.L⁻¹) (RIPPKA et al., 1979).

A concentração celular na fase exponencial para tomada do inóculo foi determinada gravimetricamente mediante filtração de volume conhecido de meio de cultura BG11 contendo as células do microrganismo 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 Meios de cultivo

Os meios de cultivos utilizados foram o efluente do processamento do pescado e meio padrão BG11 (RIPKA et al., 1979). O efluente foi coletado no tanque de equalização do sistema de tratamento de efluente de uma empresa processadora de pescado do setor industrial da cidade de Rio Grande, RS, Brasil. As amostras foram transportadas em garrafas de

polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e então esterilizadas a $1,1 \text{ kgf.cm}^{-2}$ (120°C) por 15 minutos. O efluente foi caracterizado quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) e fósforo (P-PO_4^{-3}). As análises foram realizadas segundo os procedimentos descritos em Standard Methods para análise de águas e efluentes (APHA, 2005).

2.3 Desenvolvimento dos experimentos

Experimentos em duplicata na ausência de luz e temperaturas de 10°C , 20°C e 30°C em efluente e em meio BG11 com luz a 30°C foram conduzidos em reator de mistura completa em sistema descontínuo com capacidade de 4,5 L. Para os experimentos desenvolvidos no efluente o reator foi constituído de uma extensão cilíndrica de PVC com dimensões de 80 cm de altura e 10 cm de diâmetro, tendo sua parte inferior acoplada a um sistema para promover a aeração de 1 VVM e agitação do meio. O efluente foi previamente ajustado a pH 7,6, razão C/N 20 e razão N/P 10, aferido com glicose, sulfato de amônio ou fosfato de potássio em função das concentrações de DQO, NTK e P-PO_4^{-3} presentes no efluente, conforme indicado por Hornes & Queiroz (2004). Os experimentos em meio BG11 foram realizados em reatores de vidro a 2 klux de luminosidade e fotoperíodo de 12 h, com sistema de agitação e aeração. O sistema contendo efluente de pescado ou meio BG11 foi inoculado com em média 200 mg.L^{-1} de células de *Aphanothece microscopica* Nägeli obtidas a partir de um volume de cultura equivalente ao requerido para obter esta concentração desenvolvida em meio BG11. Os experimentos foram conduzidos em câmara com controle de temperatura.

2.4 Cinética

As variáveis cinéticas velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (tg) e fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) foram determinadas segundo Levenspiel (2000). O procedimento de avaliação teve como base as equações 1, 2, 3 e 4.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} X \quad (1)$$

Integrando-se a equação 1 obtém-se:

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} (\Delta t)} \quad (2)$$

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (3)$$

Onde: tg = tempo de geração (h)

O fator de conversão substrato-microrganismo foi obtido através da equação 4.

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (4)$$

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

A produtividade foi calculada de acordo com a equação 5:

$$P_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (5)$$

2.5 Separação da biomassa

Ao final da fase exponencial de crescimento o experimento foi interrompido e a biomassa separada do meio de cultivo por coagulação/floculação. Como agente coagulante foi utilizado cloreto férrico (FeCl_3) na concentração de 300 mg.L^{-1} e pH aferido a 8,0. O procedimento foi realizado em *Jar-Test* (Jar-Test Milan – Modelo JT 101) com jarros de 2000 mL de capacidade, 19 cm de altura e 12,5 cm de largura. 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 (HORNES & QUEIROZ, 2008b).

2.6 Secagem da biomassa

A biomassa foi seca em secador descontínuo de bandejas com escoamento de ar paralelo ($1,5 \text{ m.s}^{-1}$) a 60°C conforme indicado por JACOB-LOPES et al. (2006).

2.7 Composição química

2.7.1 Proteína total

O nitrogênio total da biomassa foi determinada pelo método micro Kjeldahl, utilizando 6,25 como fator de conversão (AOAC, 2000).

2.7.2 Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram determinados por colorimetria pelo método fenol-sulfúrico, utilizando glicose como padrão segundo metodologia descrita por DUBOIS et al. (1956).

2.7.3 Lipídios totais

Os lipídios foram extraídos com éter de petróleo pelo método de Soxhlet (Extrator Soxtec modelo 2055) e seco a 60°C até peso constante (AOAC, 2000).

2.7.4 Cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração da amostra a 450°C (AOAC, 2000).

2.7.5 Pigmentos

A concentração em clorofila *a* e ficocianina foi determinada por espectrofotometria após extração dos pigmentos em acetona 90% a 5°C por 24 h. A leitura para a determinação

da clorofila *a* foi realizada nos comprimentos de onda de 664 nm e 647 nm e para ficocianina a 615 nm e 652 nm, conforme descrito por AMINOT (1983).

2.8 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 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química

3.1.1 Proteína

O efeito da temperatura na composição proximal da biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado e meio padrão BG11 pode ser avaliado na tabela 1.

Tabela 1. Composição química da cianobactéria *Aphanothece* desenvolvida no efluente do processamento de pescado em diferentes temperaturas e em meio BG11 à 30°C

Parâmetro	Tratamento			Meio BG11
	10°C	20°C	30°C	
Proteína	49,9 ^a ±1,49	52,5 ^a ±0,62	63,8 ^b ±1,66	66,3 ^b ±1,48
Carboidratos	29,1 ^a ±1,92	27,1 ^a ±2,25	14,1 ^b ±0,78	12,9 ^b ±0,77
Lipídios	15,3 ^a ±0,78	13,8 ^a ±1,07	7,1 ^b ±0,62	9,1 ^c ±0,05
Cinzas	5,7 ^a ±0,30	6,5 ^a ±1,47	14,8 ^b ±1,35	11,5 ^c ±1,44

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes temperaturas aplicadas
Os valores apresentados são médias de 6 repetições $\pm$ Desvio Padrão

A análise dos dados evidencia que a fração protéica é o maior constituinte da biomassa, notadamente influenciada pela temperatura de cultivo e diferindo significativamente ($p \leq 0,05$). Diferentes autores como Parson et al. (1984) e Fogg & Thake (1987) reportam que a proteína é o constituinte mais abundante em todas as classes de microalgas. Os valores registrados, independentes da temperatura, encontram-se dentro da faixa de concentração (40-60%) citada por diversos autores para diferentes fontes de proteína unicelular (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; MORIST et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002; DANESI et al., 2002; ZEPKA et al., 2008). No entanto, é importante salientar que mesmo na menor temperatura avaliada (10°C), independente das demais condições de cultivo a

concentração de proteína é superior ao intervalo de concentração registrado para este microrganismo, quer coletado diretamente no meio ambiente (30,29% a 43,71%) conforme descrito por QUEIROZ et al. (1998), ou desenvolvido no efluente da parboilização do arroz, a 30°C, com mínimos e máximos de 41,33% e 46,80%, respectivamente (ZEPKA et al., 2007). Esses resultados sugerem a possibilidade de utilização deste microrganismo com o duplo propósito de tratamento do efluente do processamento do pescado e na geração de proteína em regiões onde são registradas temperaturas médias ambientais em torno de 10°C. Isto pode ser corroborado pelos resultados obtidos por Hornes & Queiroz (2008a), que avaliando a eficiência de remoção de DQO e NTK do efluente do processamento do pescado na mesma temperatura por *Aphanothece microscopica* Nägeli, reportam eficiências de remoção de 80% e 82%, respectivamente.

Araújo & Garcia (2005) avaliaram a composição química de *Chaetoceros wighamii* quando cultivada a 20°C, 25°C e 30°C em fotoperíodo e sob luz contínua obtendo variações de proteína de 26,6% a 61,8%. Foi observada uma tendência a menores teores protéicos na temperatura de 25°C, aumentando com as maiores temperaturas. O valor máximo encontrado por estes autores é equivalente ao obtido neste trabalho para temperatura de 30°C, independente do meio de cultivo. Teor muito próximo (63%) ao registrado para *Aphanothece* a 30°C (63,8%) é reportado por Tokusoglu & Ünal (2003) para a *Spirulina platensis* à temperatura de cultivo de 20°C na presença de luz. Este valor é superior ao reportado por Zepka et al. (2008) e Jacob-Lopes et al. (2007) para o microrganismo em estudo quando cultivado no efluente da parboilização do arroz a 30°C e desidratado em iguais condições de secagem expressos neste trabalho. Estes autores encontraram concentrações de proteína entre 41,3% e 49,3%. Isso reflete a influência do meio de cultivo no processo de produção e acúmulo de substâncias celulares na biomassa de cianobactérias e microalgas reportadas em diversos trabalhos (LOURENÇO, 1996; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; ROMANO et al., 2000; MORIST et al., 2001; GRIMA et al., 2003; RANGEL-YAGUI et al., 2004).

Utting (1985) reporta que a composição protéica é influenciada pela quantidade de nitrogênio, e reduções deste nutriente resultam em decréscimo significativo dos níveis celulares de proteína. A composição protéica também é influenciada pela natureza da fonte nitrogenada, sendo este efeito diferenciado e dependente da espécie e da fase de crescimento (FABREGAS et al., 1985). Considerando a ampla variação dos compostos nitrogenados constituintes do efluente do processamento de pescado, quer na forma orgânica como em nitrogênio amoniacal (HORNES & QUEIROZ, 2008a), este efluente pode ser importante

meio de cultivo, permitindo a otimização da composição química da biomassa gerada. Nas condições avaliadas a maior concentração protéica (66,3%) em valor absoluto foi registrada para a biomassa cultivada no meio BG11. No entanto, esse valor quando comparado com o encontrado para a biomassa gerada no efluente da indústria processadora de pescado na ausência de luz (63,8%) a mesma temperatura (30°C), não apresenta diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Santos et al. (2003) trabalhando a diferentes temperaturas (25-35°C) em cultivos de *Spirulina maxima* em meio KNO_3 nas concentrações de 2,5 g.L⁻¹ e 0,2 g.L⁻¹, constataram que o aumento da temperatura resultou na redução em proteína de 1,42% em meio contendo 2,5 g.L⁻¹ de KNO_3 e acréscimo de 14,87% quando utilizaram 0,2 g.L⁻¹ de KNO_3 , demonstrando a influência do meio de cultivo e da temperatura na produção de proteína. Neste trabalho são registrados teores de proteínas superiores aos encontrados por estes autores a 25°C (42,6%) e 35°C (50,1%).

3.1.2 Carboidratos

Avaliando comparativamente o efeito da temperatura na produção de proteína e carboidratos, verifica-se comportamento inverso ao encontrado para proteína. São registradas reduções superiores a 50% nos teores de carboidratos quando a biomassa é cultivada a 30°C em relação ao cultivo a 10°C. Renaud et al. (2002) estudando diferentes espécies de microalgas a diferentes temperaturas verificaram que para a maioria das espécies a concentração de carboidratos sofria redução nas maiores temperaturas.

O intervalo de concentrações encontra-se dentro da ampla variação para as microalgas e cianobactérias de uma forma geral, em que são indicados valores de 10% a 40% (BOROWITZA et al., 1994, LOURENÇO, 1996; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; ZEPKA et al., 2008). Concentração esta maior do que para outras espécies, como *Spirulina platensis*. Zepka et al. (2008) encontraram para a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada a 30°C no efluente da parboilização do arroz valores médios de carboidratos de 17,67%, para as mesmas condições de secagem submetida à biomassa neste trabalho.

Considerando a variação dos teores de carboidratos com a temperatura, a associação deste fator à fonte de nitrogenado 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 maxima*. Os autores reportam aumento de

39% quando utilizam meio de cultivo contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de KNO_3 , variando a temperatura de 35°C para 25°C . Segundo Lourenço et al. (1997) e Olguín et al. (2001) a carência de nitrogênio no meio pode estimular a síntese de compostos não nitrogenados, conduzindo ao aumento nos teores de lipídios e carboidratos. Por outro lado em meio com alta concentração de nitrogênio dissolvido há o favorecimento à síntese e ao acúmulo de proteína.

Lourenço (1996), trabalhando com a microalga *Chlorella*, utilizou em experimentos distintos uréia, nitrato de sódio e sulfato de amônio, verificando que a forma em que o nitrogênio está disponível, bem como a concentração exerce influência no conteúdo de carboidratos. Paralelamente Lourenço et al. (1997) estudaram o crescimento e a composição química de *Tetraselmis gracilis* em diferentes fases de crescimento e em dois meios de cultura, demonstrando que com baixas concentrações de nitrogênio a microalga tende a produzir carboidratos. No entanto, Araújo & Garcia (2005) reportam que para a microalga *Chaetoceros wighamii* cultivada a diferentes temperaturas, a composição em carboidratos e lipídios foi mais afetada pela temperatura que por outras variáveis consideradas, sendo registrado aumento de carboidratos e lipídios quando cultivada a 25°C em relação a maiores temperaturas. Comportamento similar é registrado para *Aphanothece* desenvolvida no efluente. Levando em consideração o intervalo de temperatura avaliada, observa-se que as maiores concentrações em carboidratos e lipídios foram registradas para as menores temperaturas (10°C e 20°C). Em meio BG11 os valores registrados para este parâmetro também seguiram este comportamento, sendo registrado teor significativamente inferior ao determinado para a biomassa gerada no efluente da indústria da pesca nas temperaturas de 10°C e 20°C ($p \leq 0,05$). Tokusoglu & Ünal (2003) obtiveram para microalga *Isochrysis galbana* cultivada a 20°C percentual de carboidratos de 16,98%, concentração esta maior que para outras espécies estudadas no mesmo trabalho como a *Spirulina platensis*. Na mesma temperatura foi obtida para *Aphanothece* cultivada no efluente a concentração de 27,1%. Estes resultados demonstram a importância da avaliação da temperatura, além do meio de cultivo para a otimização de constituintes celulares.

3.1.3 Lipídios

A literatura tem indicado que altas temperaturas de cultivo tem sido relacionadas com o decréscimo de proteína e aumento de lipídios e carboidratos (TOMASELLI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 1999). No entanto, relata também comportamento inverso para várias

espécies de microalgas, associando altas temperaturas com aumento de proteína e redução de carboidratos (THOMPSON et al., 1992; RENAUD et al., 2002) e lipídios (RENAUD et al., 1995; RENAUD et al., 2002), tendência esta descrita no presente trabalho. Diferentes autores sugerem que este efeito esteja relacionado com o cessar do crescimento, atribuindo a danos irreversíveis dos sistemas enzimáticos que promovem a síntese destes compostos (THOMPSON et al., 1992; RENAUD et al., 1995; RENAUD et al., 2002).

O conteúdo de lipídios das cianobactérias tende a ser inversamente proporcional à taxa de crescimento, com indução das células a acumularem reservas de lipídios ricos em ácidos graxos saturados para armazenamento de carbono em culturas de maior tempo de residência (BOROWITZA et al., 1994; ROMANO et al., 2000; FUENTES et al., 2000). Este fato se reflete nos dados cinéticos expressos na tabela 3. A análise dos dados indica um aumento das velocidades de crescimento com a temperatura, o que corresponde à redução dos teores de lipídios conforme pode ser visto na tabela 1. São observados valores médios de 15,3%, 13,8% e 7,1% para a biomassa desenvolvida no efluente a 10°C, 20°C e 30°C, respectivamente.

A temperatura tem sido considerada o maior efeito no tipo de ácidos graxos produzidos pelas microalgas (ACKMAN et al. 1968; THOMPSON et al., 1992). Muitas espécies respondem a redução do crescimento com o aumento da razão entre os ácidos graxos poliinsaturados/saturados (AGPI/AGS). Isso pode estar associado quando se cultiva a *Aphanothece* a 10°C, obtendo-se menores taxas de crescimento ($p \leq 0,05$) e maior teor em ácido graxo (15,3%) para a biomassa gerada no efluente em relação às demais temperaturas avaliadas. É preciso considerar que estas respostas variam de espécie para espécie e com a temperatura de crescimento. Renaud et al. (1995) avaliaram o efeito da temperatura no crescimento e no conteúdo de lipídios totais em diferentes microalgas no intervalo de 10 a 35°C. Esses autores demonstraram que culturas da microalga *Nitzschia paleacea* crescendo a 10°C produziram maiores concentrações de lipídios enquanto que outras espécies registraram máximos em 30°C. Esta constatação torna-se importante uma vez que a temperatura é um dos fatores que influenciam no tipo de ácido graxo produzido pelas microalgas. Isso tem sido reportado para algumas microalgas em que a redução da temperatura resulta no aumento da razão ácidos graxos poliinsaturados/saturados (AGPI/AGS) (ACKMAN et al., 1968; THOMPSON et al., 1992). Os valores da relação AGPI/AGS recomendada para a dieta humana pela FAO são superiores a 0,45 (FAO/WHO, 1998). Matson et al. (1988) revelam que microalgas quando cultivadas a temperaturas consideradas superiores (32°C) contém menor percentual de ácidos graxos insaturados. No entanto, o perfil lipídico obtido por Zepka

et al. (2007), para a *Aphanothece microscopica* Nägeli desenvolvida no efluente da parboilização do arroz a 30°C, e desidratada em iguais condições que a biomassa em estudo indicaram altas relações AGPI/AGS. Foi registrada uma AGPI/AGS de 1,48, valor este três vezes superior ao recomendado pela FAO, e superior em valor absoluto ao reportado por Romano et al. (2000) (1,22) para a cianobactéria *Spirulina genus* em condições ótimas de crescimento. Esses resultados refletem a influência da espécie na composição química.

Outros autores relatam a influência da espécie na concentração de lipídios totais (PERNET et al., 2003; TOKUSOGLU & ÜNAL, 2003). Tokusoglu & Ünal (2003) registraram para cultura de *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Isochrysis galbana* cultivadas a 20°C teores de 7,53, 13,32 e 17,16%, respectivamente. É importante salientar que o valor 7,53% registrado para *Spirulina platensis*, que também é uma cianobactéria, é muito próximo ao obtido para a *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada a 30°C no efluente do processamento de pescado (7,1%) (tabela 1) e da parboilização do arroz (7,1-7,9%) (ZEPKA et al. 2007), porém inferior ao encontrado quando desenvolvida no meio BG11 (9,1%) na mesma temperatura.

Esquivel et al. (1993) relatam níveis de lipídios totais de 7,7% para a *Phaelodactylum*. Autores como Pernet et al. (2003) relatam estudos a respeito da fração lipídica em microalgas indicando concentrações no intervalo de 7,1% a 7,5%, reportando que as menores concentrações foram registradas quando acrescido nitrogênio ao meio, demonstrando a influência do meio de cultivo nesta fração bioquímica.

As diferenças em função do meio de cultivo podem justificar as variações significativas ($p \leq 0,05$) dos teores de lipídios da biomassa gerada no efluente (7,1%) do valor registrado para biomassa desenvolvida no meio BG11 (9,1%) para a mesma temperatura. Isso sugere que o efluente do processamento de pescado pode desempenhar importante função como meio de cultivo no que se refere à produção de lipídios totais. Em face disso, a associação do tratamento de efluente com a geração de biomassa poderia ser uma importante alternativa, considerando que o cultivo a 20°C resulta em remoções de NTK e DQO dentro dos limites indicados pela legislação (HORNES & QUEIROZ, 2008a), e que os teores em lipídios e carboidratos não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) quando se avalia comparativamente os resultados a 10°C e 20°C.

3.1.4 Cinzas

No que se refere ao teor de cinzas o comportamento foi similar ao registrado para a proteína, observando-se o aumento das concentrações em função da temperatura independente do meio de cultivo. Os valores máximos registrados foram 14,8% e 11,5% para as biomassas geradas no efluente do processamento de pescado e meio BG11, respectivamente, quando cultivados a 30°C. Estas concentrações são muito superiores as reportadas por vários autores, que situam em 7% (BOROWITZA, 1994; LOURENÇO, 1996; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; GRIMA et al., 2003). No entanto, Fuentes et al. (2000) reportam valores no intervalo de 16,8% a 23,6% para a microalga *Porphyridium cruentum* em cultivos a 20°C em diferentes condições de luminosidade e tempos de residência. Valores elevados de cinzas também foram registrados por Fidalgo et al. (1998), que avaliaram a fonte de nitrogênio no teor de cinzas da microalga *Isochrysis galbana*, registrando teores de 16,2% e 17,25% quando o microrganismo foi cultivado a 18°C em meio nitrato e uréia, respectivamente. A influência do meio de cultura se faz notar para a *Aphanothece* cultivada no efluente e meio BG11, com menores concentrações registradas quando se utiliza o meio BG11, o qual apresenta como fonte de nitrogênio o nitrato de sódio, sugerindo a influência do meio nos teores de cinzas, assim como a temperatura.

Renaud et al. (2002) verificaram correlação positiva entre o conteúdo de cinza e a temperatura no intervalo de 25° a 35°C. Uma razão inversa dos teores de cinzas com o tempo de residência tem sido registrada para microalgas com maiores concentrações reportadas para os menores tempos de residência. Este fato tem sido atribuído ao acúmulo de nutrientes minerais no interior da célula, visando compensar a alta pressão osmótica do meio de cultivo (FUENTES et al., 2000). Isso pode justificar as maiores concentrações em cinzas registradas na biomassa gerada no efluente quando são registradas as maiores velocidades específicas de crescimento (tabela 3) para as três condições consideradas.

3.2 Clorofila *a* e ficocianina

Os pigmentos que caracterizam as cianobactérias são a clorofila *a*, carotenos e ficobiliproteínas (BOROWITZA et al., 1994; SARADA et al., 1998; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000). A principal ficobiliproteína é a ficocianina (SARADA et al., 1998; DANESI et al., 2004). Os resultados obtidos para a clorofila *a* e ficocianina em função da

temperatura e meio de cultivo estão expressos na tabela 2. Observa-se a influência das condições de cultivo na produção de pigmentos, independente da temperatura. Os valores de clorofila *a* e ficocianina diferem significativamente ($p \leq 0,05$) na biomassa desenvolvida em meio BG11 a 30°C e 2 klux de luminosidade e no efluente na ausência de luz a mesma temperatura, demonstrando a influência do meio na concentração destes parâmetros. Não foram indicadas diferenças ($p \leq 0,05$) entre os valores de ficocianina na biomassa cultivada no efluente a 20 e 30°C. No entanto, diferenças significativas são observadas para as concentrações de clorofila *a*. Assim, visando a utilização do efluente da indústria processadora de pescado como meio de cultivo para a produção de pigmentos a temperatura de cultivo de 30°C seria melhor indicada.

Tabela 2. Concentrações de clorofila *a* e ficocianina para a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado a diferentes temperaturas e meio padrão BG11 a 30°C

Parâmetro	10°C		Efluente 20°C		30°C		Meio BG11 30°C	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Clorofila <i>a</i>	0,63 ^a ±0,01	1,48	0,82 ^b ±0,03	1,93	1,13 ^c ±0,00	2,66	0,91 ^b ±0,08	2,85
Ficocianina	52,8 ^a ±5,6	105,6	71,5 ^b ±10,6	143	82,5 ^b ±11,3	165	19,1 ^c ±2,8	38,2
px100/P Clorofila	0,13	0,29	0,16	0,37	0,18	0,42	0,14	0,43
px100/P Ficocianina	10,6	21,2	13,6	27,2	12,9	25,8	2,88	5,76

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes temperaturas aplicadas

Clorofila *a* (mg.g⁻¹); Ficocianina (mg.g⁻¹)

A: desidratado; B (clorofila *a*): valor corrigido para 74% de perda (Queiroz et al., 2008); B(ficocianina): valor corrigido para 50% de perda (Sarada et al., 1998)

px100P: percentual de pigmento (clorofila *a* ou ficocianina) em relação à concentração de proteína

Os valores apresentados são médias de 6 repetições ± Desvio Padrão

A literatura demonstra ampla variação na concentração de pigmentos em função de diferentes fatores como espécie, meio de cultivo, condições ambientais e conservação da biomassa, os quais podem ocasionar perdas destes componentes (FIDALGO et al., 1998; SARADA et al., 1998; ALOMAR et al., 1999; FUENTES et al., 2000; DANESI et al., 2002; RANGEL-YAGUI et al., 2004; QUEIROZ et al., 2005).

Sarada et al. (1998) relatam que as técnicas de secagem utilizadas para a conservação da biomassa de cianobactéria influenciam grandemente no rendimento de pigmentos, reportando perdas de 50% de ficocianina em *Spirulina* quando esta é seca em *Spry-Dryer*. Queiroz et al. (2005) avaliaram a influência da temperatura de secagem no teor de clorofila *a* da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli quando desenvolvida no efluente da parboilização do arroz e ausência de luminosidade. Os autores reportam reduções de 74% em

relação à biomassa fresca, quando a biomassa é processada a 60°C. Considerando a temperatura de secagem (60°C) utilizada neste trabalho, bem como os teores de clorofila *a* obtidos, é possível dizer que este microrganismo pode representar importante fonte deste pigmento.

Na tabela 2 podem ser avaliados os teores de clorofila *a* e ficocianina quando a biomassa é desidratada a 60°C e quando estes teores são corrigidos em função das perdas pelo processo de secagem. Embora os teores de pigmentos variem consideravelmente em função da espécie e condições de cultivo as concentrações registradas para a *Aphanothece* são similares e muitas vezes superiores aos registrados para outros microrganismos. Olvera-Ramirez et al. (2000) avaliaram o teor de ficocianina na cianobactéria *Calothrix* sp. quando cultivada em meio BG11 a 30°C, e registraram na biomassa fresca 46,2 mg.g⁻¹. Comparando este resultado com o registrado para a *Aphanothece* em iguais condições de cultivo e considerando válida uma perda de 50% por efeito do processo de secagem, pode ser observado valor próximo (38,2 mg.g⁻¹) ao registrado por este autor. Fazendo esta consideração, os resultados encontrados para a biomassa cultivada no efluente em qualquer condição de cultivo são superiores ao reportados por vários autores para diferentes espécies.

Saha et al. (2003) observaram para a cianobactéria *Oscillatoria willei* BDU 13051 cultivada a 25°C tendo como fonte de nitrogênio o nitrato de sódio concentrações de clorofila *a* e ficocianina de 0,769 mg.g⁻¹ e 99 mg.g⁻¹, respectivamente. Assim como para os resultados encontrados por FUENTES et al. (2000), que trabalhando a diferentes intensidades luminosas e tempos de residência, registraram para a microalga *Porphyridium cruentum* a 20°C uma variação de clorofila *a* de 1,06 mg.g⁻¹ a 4,67 mg.g⁻¹, intervalo que compreende os teores registrados neste trabalho, uma vez considerada as perdas por secagem. No entanto, a influência da espécie é um dos fatores de grande importância. A cianobactéria *Spirulina platensis* tem sido apontada como importante fonte de pigmentos em diferentes condições de cultivo, apresentando teores amplamente variáveis (BOROWITZA et al., 1994; DANESI et al., 2002; RANGEL-YAGUI et al., 2004). Rangel-Yagui et al. (2004) expressam para esse microrganismo cultivado a 30°C utilizando como fonte de nitrogênio 2,57 g.L⁻¹ de KNO₃ e diferentes intensidades luminosas concentrações de 12,1 mg.g⁻¹ a 19,0 mg.g⁻¹ de clorofila *a*, valores esses muito superiores ao registrado para a *Aphanothece* independente da condição avaliada. Esses autores registraram concentração de 14,2 mg.g⁻¹ a 2 klux, intensidade luminosa esta igual à aplicada no presente trabalho, tendo como fonte de nitrogênio nitrato de sódio em concentração 1,7 vezes menor que a utilizada por esses pesquisadores. Esses

resultados demonstram a influência não só da espécie como da concentração de compostos nitrogenados nos pigmentos. Esta constatação é elucidada pelos dados obtidos por Olvera-Ramírez et al. (2000) para *Calothrix* sp. que registraram valores de ficocianina reduzidos a metade quando as concentrações em nitrato de sódio no meio de cultivo eram reduzidas também à metade.

No que se refere à forma de nitrogenado, Danesi et al. (2002) registraram reduções do conteúdo de clorofila *a* em *Spirulina platensis* quando utilizada uréia como fonte de nitrogênio no meio de cultivo em comparação ao nitrato. Os autores encontraram melhores rendimentos na produção deste pigmento utilizando como fonte de nitrogênio nitrato. Avaliando comparativamente os teores apresentados a 30°C para a biomassa desenvolvida em efluente e meio BG11, verifica-se maior concentração quando o organismo é gerado no efluente. No entanto, é importante salientar que o cultivo no efluente independente da fonte nitrogenada orgânica e amoniacal, desenvolve-se na ausência de luz, considerando o fato que este microrganismo é capaz de se desenvolver no escuro às expensas de matéria orgânica como fonte de carbono (QUEIROZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2005; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008). Isto pode estar associado ainda ao fato da amônia ser mais facilmente assimilada pelas cianobactérias, uma vez que para assimilar o nitrato o microrganismo precisa se valer de processos enzimáticos catalisados pelas enzimas nitrato redutase na transformação de nitrato a nitrito e nitrito redutase para reduzir o nitrato e amônia (FAY, 1983; BOROWITZA et al., 1994; VON RÜCKERT & GIANI, 2004). Este fato poderia justificar os valores de clorofila *a* para a biomassa desenvolvida no efluente. Por outro lado o efluente já apresenta em sua composição concentrações de amônia na ordem de 13,1 mg.L⁻¹ a 111 mg.L⁻¹ (HORNES & QUEIROZ, 2008a), o que justificaria este resultado, uma vez que a amônia como tal já se encontra disponível para pronta assimilação. Pode-se destacar com relação ao problema da toxicidade da amônia, abordada por diferentes autores (GUERRERO et al., 1997; SHI et al., 2000; YANG et al., 2004; DANESI et al., 2002; HORNES & QUEIROZ, 2004), que o microrganismo em estudo apresenta alta resistência a este composto (HORNES & QUEIROZ, 2004). Esses resultados são corroborados pelos dados encontrados para a conversão de nitrogênio em célula obtidos a diferentes temperaturas de cultivo, conforme pode ser verificado na tabela 3.

Danesi et al. (2002) reportam valores de 2,7 g.g⁻¹ a 3,1 g.g⁻¹ para o fator Y_{X/S} obtidas a partir do cultivo de *Spirulina platensis* a 27°C, 30°C e 33°C em meio convencional. Valores superiores de 3,8 g.g⁻¹ a 6,6 g.g⁻¹ foram obtidos quando ao meio de cultivo eram adicionadas

diferentes concentrações de uréia como fonte de nitrogênio, intervalos esses no qual se situam os fatores de conversão de nitrogênio em célula obtidos para a biomassa cultivada no efluente. Isso sugere que o sistema alcançou uma relação adequada entre a concentração de nitrogênio no meio e temperatura no que se refere ao crescimento e conversão em componentes celulares nitrogenados, tais como proteína, clorofila *a* e ficocianina, uma vez que são registrados valores superiores ao encontrado para o meio padrão.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado a diferentes temperaturas

Parâmetro	Tratamento		
	10°C	20°C	30°C
X_0 (mg.L ⁻¹)	223	194	240
X (mg.L ⁻¹)	477	544	670
μ_{max} (h ⁻¹)	0,018	0,033	0,038
tg (h)	37,0	20,7	18,2
P_x (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	6,51 ^a	10,6 ^b	15,9 ^c
$Y_{X/S}$ (mg Biomassa.mg NTK ⁻¹)	4,70 ^a	4,22 ^a	5,85 ^b

X_0 : concentração inicial de biomassa; X : concentração final de biomassa; μ_{max} : velocidade específica de crescimento máxima; tg: tempo de geração; P_x : produtividade; $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em biomassa

Os valores apresentados são médias de 6 repetições; Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as temperaturas

A influência do meio de cultivo se faz sentir ainda quando comparamos o fator de conversão em células encontradas para as diferentes temperaturas como os registrados por Queiroz et al. (2007) para a biomassa gerada no efluente da parboilização de arroz. Esses autores obtiveram para o cultivo a 30°C com razão C/N 50 o valor de 11,4.

A máxima produtividade em células foi registrada a 30°C para a biomassa cultivada no efluente, significativamente diferente ($p \leq 0,05$) das encontradas na biomassa nas demais temperaturas avaliadas, guardando importante relação com os valores de pigmentos registrados, bem como com o crescimento celular. Lafarga-de La Cruz et al. (2006) descrevem para diferentes microalgas altas correlações (0,92 a 0,99) entre os teores de clorofila *a* e crescimento celular, indicando a avaliação de clorofila *a* como medida de produtividade. Isso se reflete para os dados registrados neste trabalho, em que o maior valor em clorofila *a* (2,66 mg.g⁻¹) e ficocianina (165 mg.g⁻¹) correspondem a maior produtividade registrada (15,9 mg.L⁻¹.h⁻¹) quando a biomassa é gerada a 30°C (tabelas 2 e 3). Os autores supracitados demonstraram relação inversa dos teores de clorofila *a* com a luminosidade e direta deste pigmento com os nutrientes. Austin et al. (1996) avaliando o crescimento e produção de pigmentos na cianobactéria *Nostoc* sp. quando cultivada na presença e ausência de luz, verificaram menores concentrações de clorofila *a* e concentrações equivalentes de

ficocianina para a biomassa desenvolvida na ausência de luz em relação à cultivada com luz. Isso justifica as concentrações em pigmentos obtidas neste trabalho. Por outro lado estas constatações estão também de acordo com Vonshak et al. (1996), que reportam que para condições de estresse a *Spirulina platensis* cultivada em alta salinidade e baixa luminosidade apresentou baixa concentração de proteína e clorofila *a*. Este fato justificaria os menores valores para esses dois parâmetros quando se trabalha a menores temperaturas (tabelas 1 e 2). É importante salientar ainda que as máximas concentrações de proteínas e pigmentos ocorreram nos mesmos tratamentos em que o máximo crescimento celular foi obtido (tabelas 1, 2 e 3). Comportamento similar foi obtido por Lourenço et al. (1997) para diferentes espécies de microalgas. Esta constatação sugere a associação entre o processo de crescimento e a síntese de proteína e pigmentos. Contrariamente, as máximas concentrações de carboidratos e lipídios não ocorreram no tratamento no qual o crescimento celular foi mais elevado (tabelas 1 e 3) o que se traduz em relação menos estreita entre crescimento e produção dessas substâncias associada ao processo de acúmulo de energia a ser utilizado em condições de estresse, como ausência de luz e baixa temperatura, a qual foi submetida a cianobactéria *Aphanothece*.

A literatura reporta que os teores de clorofila *a* nas microalgas são encontrados em pequenas quantidades quando comparado as concentrações de ficocianina, representando um percentual de apenas 1,1%, sendo considerado o principal pigmento a ficocianina, a qual pode chegar a 20% em peso seco de proteína celular (VONSHAK et al., 1996). Avaliando os dados da tabela 2 onde são expressas as porcentagens de pigmentos em relação aos teores de proteínas para as diferentes condições de cultivo, pode-se verificar relações em ficocianina superiores a 21,2%. Resultado este bastante promissor quando é visada a produção deste pigmento utilizando como meio de cultivo do microrganismo o efluente da indústria processadora de pescado. Borowitz et al. (1994) reportam que os pigmentos de ficobiliproteínas constituem importante porção da massa celular, servindo como estoque durante o período de exaustão de nitrogênio. A presença das concentrações obtidas pode indicar condições adequadas de nitrogênio no efluente, o que o justifica como meio de cultivo.

No Brasil a clorofila *a* é utilizada como corante natural, obtida a partir de espinafre que contém aproximadamente 0,06 mg.g⁻¹ deste pigmento (DANESI et al., 2002). Considerando as condições experimentais utilizadas e a possibilidade de otimização destes parâmetros, os resultados obtidos para clorofila *a* e ficocianina quando a biomassa é

desenvolvida no efluente de pescado são bastante promissores, quando se objetiva a produção de biomassa visando a produção de clorofila *a*. Além disso, no que se refere a ficocianina, atualmente as maiores fontes de pigmentos de coloração azul são compostos sintéticos, considerados potencialmente tóxicos e/ou carcinogênicos, e a utilização de um pigmento natural em produtos como alimentos e cosméticos é vantajosa, considerando ainda a possível atividade anticancerígena e imunomodulante dessas substâncias (ROMÁN et al., 2002; MINKOVA et al., 2003).

4 CONCLUSÃO

A temperatura e o meio de cultivo exercem influência na composição química e teor de pigmentos.

Nas condições avaliadas, o incremento da temperatura acarretou o aumento da velocidade específica de crescimento máxima e produtividade celular.

As concentrações de cinzas e proteínas apresentaram aumento com a temperatura, enquanto que os lipídios e carboidratos apresentaram comportamento inverso.

O cultivo da cianobactéria *Aphanothece* a 10°C e 20°C é indicado quando se visa à produção de lipídios e carboidratos a partir do efluente do processamento do pescado como meio de cultivo.

O cultivo da cianobactéria *Aphanothece* a 30°C é indicado quando se visa à produção de proteína e pigmentos a partir do efluente do processamento de pescado como meio de cultivo.

A composição em clorofila *a*, ficocianina na biomassa desenvolvida no efluente foi significativamente maior quando comparada à biomassa cultivada em meio padrão BG11 na mesma temperatura.

O efluente do processamento de pescado pode ser considerado um meio de cultivo potencial para o desenvolvimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli na produção de proteína unicelular, caracterizando-se a biomassa como importante fonte de proteína, carboidratos, lipídios, sais minerais e pigmentos como clorofila *a* e ficocianina.

5 REFERÊNCIAS

ACKMAN, R.G.; TOCHER, C.S; MCLACHLAN, J. (1968). Marine phytoplankton fatty acids. *Journal of Fish Research*, v. 25, p. 1603-1620.

ALOMAR, D.; FUCHSLOCHER, R.; STOCKBRANDS, S. (1999). Effects of oven or freeze-drying on chemical composition and NIR spectra of pasture silage. *Animal Feed Science and Technology*, v. 80, p. 309-319.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2005), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. Washington.

AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. (eds) Manuel des analyses chimiques em Millieu Marin. CNEXO-BNDO/Documentation, Brest, France, XV: 177-92, 1983.

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

ARAÚJO, S.C.; GARCIA, V.M.T. (2005). 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.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis, 15th edn. Washington, DC, 2000.

AUSTIN, P.A.; ROSS, S.; MILLS, J.D. (1996). Regulation of pigment content and enzyme activity in the cyanobacterium *Nostoc* sp. Mac grown in continuous light, a light-dark photoperiod, or darkness. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1277, p. 141-149.

BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I.; ALMEIDA, T.L.; BENERI, R.L.; ALMEIDA, R.V.; PADILHA, M. (2004). 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.

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

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

DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the rowth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, v. 26, p. 329-335.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTO, J.; REBERS, P.; SMITH, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 18, p. 350-356.

- ESQUIVEL, B.; VOLTOLINA, D.; SANDOVAL, F.C. (1993). The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 105, p. 369-373.
- FABREGAS, J.; HERRERO, C.; ABALDE, J.; CABEZAS, B. (1985). Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentration. *Aquaculture*, v. 50, p. 1-11.
- FAINTUCH, L.; SATOS, B.; AQUARONI, E. (1992). Emprego de algumas fontes de nitrogenados na obtenção de biomassa de *Oscilatória limnética*. *Reviews in Microbiology*, v. 23, p. 32-36.
- 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. (1998). 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.
- FOGG, G.E.; THAKE. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Madison: University of Wisconsin Press, 1987.
- FUENTES, M.M.R.; FERNÁNDEZ, G.G.A.; PÉREZ, J.A.S.; GUERRERO, J.L.G. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, v. 70, p. 345-353.
- GARCÍA-FERNANDEZ, J.M.; DIEZ, J. (2004). Recent developments in solid state fermentation. *Research in Microbiology*, v. 155, p. 795-802.
- GRIMA, E.M.; BELARBI, E.H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; ROBLES, M.A.; CHISTI, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 491-515.
- GUERRERO, L.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. (1997). Treatment of saline wastewaters from fish meal factories in an anaerobic filter under extreme ammonia concentrations. *Bioresource Technology*, v. 61, p. 69-78.
- HALPERIN, D.R.; CAIRE, Z.; MULLE, Z.,M.C. (1974). Contenido proteico de *Aphanothece stagnina* (Sprengel). A Braun (Cyanophyta, Chorococcaceae). *Physis Sección B*, v. 33, p. 159-164.
- HORNES, M.O.; QUEIROZ, M.I. (2004). Evaluation of the growth of cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in effluent of fishing industry. In: International Congress of Chemical and Process Engineering, 16th. Prague – Czech Republic.
- HORNES, M.I.; QUEIROZ, M.I. Influência da temperatura na remoção de nutrientes do efluente da indústria processadora de pescado por *Aphanothece microscopica* Nägeli. In: Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes

em *Aphanothece microscopica* Nägeli. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Furg, Rio Grande, 2008a. 28 p

HORNES, M.I.; QUEIROZ, M.I. Efeito de coagulantes no efluente do processamento do pescado visando a separação de biomassa quando tratado por cianobactéria. In: Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Furg, Rio Grande, 2008b. 22 p

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; QUEIROZ, M.I.; NETTO, F.M. (2006). 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.

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

KALAVATHI, F.D.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. (2001). Degradation and metabolization of the pigment melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p. 249-251.

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

LAFARGA-DE LA CRUZ, F.; VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN-NÚÑEZ, R.; TREES, C.C.; SANTAMARÍA-DEL-ÁNGEL, E.; NÚÑEZ-CEBRERO, F. (2006). Nutrient uptake, chlorophyll *a* and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (*Cryptophyceae*) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering*, v. 35, p. 51-60.

LEVENSPIEL, O. *Engenharia das Reações Químicas*. São Paulo: Edgard Blücher, 2000.

LORETO, C.; ROSALES, N.; BERMÚDEZ, J.; MORALES, E. (2003). Produccion de pigmentos y proteínas de la cianobactéria *Anabaena* PCC 7120 em relacion a alta concentracion de nitrogeno e irradiancia. *Gayana Botânica*, v. 60, p. 83-89.

LOURENÇO, S.O. *Variação da composição bioquímica de microalgas marinhas em cultivos, com ênfase nos efeitos da disponibilidade do elemento nitrogênio*. São Paulo, Instituto Oceanográfico de São Paulo. Tese de Doutorado, 1996.

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

MINKOVA, K.M.; TCHERNOV, A.A.; TCHORBADJIEVA, M.I.; FOURNADJIEVA, S.T.; ANTOVA, R.E.; BUSHEVA, M.Ch. (2003). Purification of C-phycoyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 102, p. 55-59.

MORIST, A.; MONTESINOS, J.L.; CUSIDÓ, J.A.; GÒDIA, F. (2001). Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured ina continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*. v. 37, p. 535-547.

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

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. (2001). 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.

OLIVEIRA, M.A.S.; MONTEIRO, M.P.; ROBBS, P.G.; LEITE, S.G. (1999). Growth and chemicals composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at diferents temperatures. *Aquaculture International*, v. 7, p. 261-275.

PARSON, T.R.; TAKAHASHI, M.; HARGRAVE, B. *Biological Oceanographic Process*. Oxford: Pergamons Press, 1984, 330 p.

PERNET, F.; TREMBLAY, R.; DEMERS, E.; ROUSSY, M. (2003). Variation of lipid and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Ichrysis* sp. grown in semicontinuous system. *Aquaculture*, v. 221, p. 393-406.

QUEIROZ, M.I.; SOARES, L.A.S.; KOETZ, P.R.; TREPTOW, R.O.; YUNES, J.S. (1998). *Avaliação do teor de proteína da Aphanothece sp. Caracterização em aminoácidos*. In: Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos. v. 2, n. 1, p. 1089-1091.

QUEIROZ, M.I.; BASTOS, R.G.; BENERI, R.L.; ALMEIDA, R.G. (2002). 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.

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

QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L. Q.; MITTERER, M.L.; GOLDBECK, R.; PINTO, L.A.A.; Treptow, R.O. (2005). Avaliação da cor da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em diferentes condições de secagem. *Revista Vetor*, v. 15, p. 33-40.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. (2007). 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.

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

RENAUD, S.M.; ZHOU, H.C.; PARRY, D.L.; THINH, LUONG-VAN; WOO, K.C. (1995). Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology*, v. 7, p. 595-602.

- RENAUD, S.M.; THINH, LUONG-VAN; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D.L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, v. 211, p. 195-214.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. (1979). Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, p. 01-61.
- ROMÁN, R.B.; ALVÁREZ-PEZ, J.M.; FERNÁNDEZ, F.G.A.; GRIMA, E.M. (2002). Recovery of pure β -phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 73-85.
- ROMANO, I.; BELLITTIR, R.; NICOLAUS, B.; LAMA, N.; MANCA, C.; PAGNOTA, E.; GAMBACORTA, A. (2000). Lipid profile: a useful chematotoxic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. *Phytochemistry*, v. 50, p. 560-568.
- SAHA, S.K.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. (2003). Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 45, p. 263-272.
- SANTIAGO-SANTOS, M.C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. (2004). Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2047-2052.
- SANTOS, G.M.; MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R.M. (2003). Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 17-21.
- SARADA, R.; MANOJ, G.; PILLAI, G.; RAVINSHANKAR, A. (1998). 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.
- SHI, XIAN-MING; ZHANG, XUE-WU; CHEN, F. (2000). Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 312-318.
- SILVA, P. G.; SILVA, H. J. (2007). Effect of mineral nutrientes on cell growth and self-flocculation of *Tolypothrix tenuis* for the production of a biofertilizer. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 607-611.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p. 87-96.
- STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. (2005). As clorofilas. *Ciência Rural*, v. 35, p. 748-755.

- THOMPSON, P.A.; GUO, M.X.; HARRISON, P.J. (1992). Effects of variation in temperature: I. On the biochemical composition of 8 species of marine-phytoplankton. *Journal of Phycology*, v. 28, p. 481-488.
- TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M.K. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 1144-1148.
- TOMASELLI, L.; BOLDRINI, G.; MARGHERI, M.C. (1997). Physiological behavior of *Arthrospira (Spirulina) maxima* during acclimation to changes in irradiance. *Journal of Applied Phycology*, v. 9, p. 37-43.
- UTTING, S.D. (1985). Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture Engineering*, v. 4, p. 173-190.
- VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVES, M.; SOTO, L.P. (1998). Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 265-268.
- VON RÜCKERT, G.; GIANI, A. (2004). Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, p. 325-331.
- VONSHAK, A.; KANCHARAKSA, N.; BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M. (1996). Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacteria *Spirulina platensis* to salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, v. 8, p. 119-124.
- ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M.I. (2007). Efecto del procesamiento térmico en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Ciência y Tecnología Alimentaria*, v. 5, p. 368-371.
- ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. (2008). Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1311-1316.
- YANG, SHU-FANG; TAY, JOO-HWA; LIU, Y. (2004). Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules. *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, p. 41-48.

ARTIGO 4

**Influência da temperatura e do meio de cultivo em compostos nitrogenados na
cianobactéria *Aphanothece microscopia* Nägeli**

Influência da temperatura e do meio de cultivo em compostos nitrogenados na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli

M. O. Hornes; M. I. Queiroz

Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química – Laboratório de Biotecnologia. Rua Eng. Alfredo Huch 475, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil.
Telefone (53) 32338636 - FAX (53) 32338745 - biotecnofurg@yahoo.com.br

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar o teor de compostos nitrogenados na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli quando cultivada no efluente do processamento de pescado e em meio padrão (BG11) nas diferentes fases de crescimento e temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C. Foi avaliada ainda a influência dos compostos nitrogenados quando na determinação de proteína é utilizada a concentração de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl. As condições experimentais foram inóculo de 200 mg.L⁻¹, pH 7,6 e razão C/N 20. Os experimentos utilizando o efluente foram realizados na ausência de luz e em meio padrão a 2 klux com fotoperíodo de 12 h. As amostras foram tomadas no início, meio e fim da fase logarítmica. Os parâmetros considerados foram nitrogênio total Kjeldahl (NTK) e nitrogênio não protéico (NNP), bem como as frações não protéicas: ácidos nucleicos e íons intracelulares nitrito (NO₂⁻), nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺). Os resultados demonstram que o íon amônio juntamente com os ácidos nucleicos representam uma importante fração do nitrogênio não protéico. Ficou demonstrada a influência do meio de cultivo e da temperatura na concentração de nitrogênio na biomassa gerada, bem como que a determinação de proteína mediante a determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl e uso do fator 6,25 superestima a concentração protéica.

Palavras-chave: cianobactéria, efluente, fases de crescimento, nitrogenados, pescado, temperatura

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the nitrogen compounds of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli biomass when it was cultivated in fish effluent and BG11 medium in the different growth phases and temperatures of 10°C, 20°C and 30°C. The influence of the nitrogen compounds was evaluated when they are used for determination of total nitrogen using the Kjeldhal method. The experimental conditions were 200 mg.L⁻¹ inoculum, pH 7,6 and C/N ration 20. The experiments in the effluent were run in darkness and in BG11 medium at 2 klux and 12 h photoperiod. Each culture was sampled for total and non protein nitrogen, as well as the no protein fraction: nucleic acids and the ions nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻) and ammonium (NH₄⁺) at beginning, mid-logarithmic and late logarithmic growth phase. The results indicated that ammonium nitrogen and nucleic acids are the main constituents of the non protein nitrogen. It was demonstrated the influence of the culture media and temperature on biomass nitrogen content. The Kjeldahl method and the conversion factor (6,25) overestimates the real protein concentration.

Keywords: cyanobacterium, effluent, growth phases, nitrogen compounds, fish, temperature

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias ou algas verdes-azuis são microrganismos procariontes gram-negativos largamente distribuídos na natureza que possuem a capacidade de realizar fotossíntese como as plantas superiores (LEM & GLICK, 1985; ARDELEAN & ZARNEA, 1998; SÁNCHEZ-LUNA et al., 2004). Apesar de sua natureza fotossintética, algumas espécies podem crescer no escuro utilizando substratos orgânicos (FAY, 1983; TAM & WONG, 1996; STAL & MOEZELAAR, 1997; ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; QUEIROZ et al., 2007). As cianobactérias além de várias espécies de microalgas têm sido consideradas organismos promissores para várias aplicações biotecnológicas, e são alvo de estudos devido ao seu potencial para diversas formas renováveis de compostos químicos úteis tanto para alimentação humana como animal, além de produtos farmacêuticos, biofertilizantes entre outras aplicações (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998; SHI et al., 2000; BURJA et al., 2001; MOLINA-GRIMA et al., 2002; PATEL et al., 2005; BECKER, 2007; ZEPKA et al., 2008).

O efeito de mudanças nas condições ambientais em culturas de muitas espécies de cianobactérias e microalgas tem sido estudado para melhor entendimento da sua fisiologia e para responder questões específicas no que se refere ao crescimento das culturas. Dentre essas condições está a temperatura, que exerce influência significativa na performance dos processos biológicos, tanto no que se refere ao tratamento de efluentes como na conversão dos componentes presentes no meio e desenvolvimento da biomassa obtida. A ação de alguns nutrientes, especialmente o nitrogênio, permite obter resultados sobre algumas tendências gerais de culturas em batelada (WITJITRA et al., 1996; LOURENÇO et al., 1997; SHI et al., 2000). O nitrogênio é um nutriente que pode limitar o crescimento microbiológico em ambientes naturais ou artificiais. O íon nitrato, nitrito e amônio e muitos compostos nitrogenados orgânicos dissolvidos (uréia, aminoácidos e peptídeos) são as principais fontes de nitrogênio, utilizadas principalmente na síntese de aminoácidos e proteínas (REYNOLDS, 1984; LUQUE et al., 1994; MURO-PASTOR & FLORÊNCIO, 2003).

A disponibilidade do íon amônio interfere diretamente na assimilação de outras fontes de nitrogênio. Assim, em um meio em que há várias fontes nitrogenadas inicialmente são selecionadas as formas mais reduzidas como aminoácidos, uréia e amônio (HERRERO et al., 2001; MURO-PASTOR & FLORÊNCIO, 2003; VON RÜCKERT & GIANI, 2004). A maioria das cianobactérias desenvolveram um sistema para detecção quando o nitrogênio na

forma reduzida estiver disponível. Na presença do íon amônio todas as enzimas e transportadores envolvidos na assimilação de nitrogênio inorgânico são inibidos pelo NtcA, uma proteína transcricional repressora (HERRERO et al., 2001; LUQUE et al., 2004). VON RÜCKERT & GIANI (2004) realizaram experimentos utilizando meio tendo como fonte de nitrogênio amônio e nitrato nas concentrações de 3450 e 3500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados demonstraram que o íon amônio foi removido completamente no 10º dia, enquanto que o íon nitrato permanecia ainda disponível. A utilização de fontes de nitrogênio com concentração e composição variadas pode acarretar em mudanças na composição química de cianobactéria e microalgas (LOURENÇO et al., 1997; FIDALGO et al., 1998; SANTOS et al., 2003; VON RÜCKERT & GIANI, 2004; RAJOKA et al., 2006). LOURENÇO et al. (1997) verificaram maiores concentrações de proteína na biomassa da microalga *Tetraselmis gracilis* quando utilizado amônio ao invés de nitrato como fonte de nitrogênio.

Outra questão que tem sido considerada quanto aos nitrogenados é o fato que as cianobactérias e microalgas podem acumular significativas concentrações de nitrogênio inorgânico antes de sua assimilação em decorrência de alta disponibilidade de nitrogênio no meio (DORTCH et al., 1984; LOURENÇO, 1997). Isso poderá contribuir significativamente na determinação dos teores de proteína quando é utilizado o fator 6,25 convencional para converter nitrogênio total em proteína, uma vez que a maioria dos trabalhos disponíveis utiliza esse fator para obter o teor de proteína em microalgas, induzindo a uma superestimação do valor real da fração protéica (ESQUIVEL, VOLTOLINA & SANDOVAL, 1993; LOURENÇO et al., 1997; RENAUD et al., 2002; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007; ZEPKA et al., 2008).

A *Aphanothece microscopica* Nägeli é uma cianobactéria de ocorrência natural nos corpos hídricos adjacentes à cidade do Rio Grande e sua utilização em tratamento de efluentes de indústria de alimentos vem sendo estudada pela Universidade Federal do Rio Grande, obtendo importantes resultados na remoção de matéria orgânica e nutrientes (QUEIROZ et al., 2002; HORNES & QUEIROZ, 2004; QUEIROZ et al., 2004; QUEIROZ et al., 2007). No entanto, no que tange a influência de parâmetros como temperatura e meio de cultivo nos compostos nitrogenados de cianobactérias pouca informação até o momento está disponível. Em face disso, o trabalho teve como objetivo avaliar os compostos nitrogenados presentes na biomassa quando desenvolvida no efluente da indústria da pesca e em meio padrão BG11 em função da temperatura e meio de cultivo, bem como a influência destes compostos quando é

utilizado o método de Kjeldahl na determinação de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

2.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSMAN92, 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 BG11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por RIPPKA et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 30°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 mediante uso de luxímetro tipo LX-101 Digital e termômetros dispostos no interior do reator. A temperatura e intensidade luminosa foram otimizadas em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG11 é composto por $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g.L⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (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), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81 g.L⁻¹), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222 g.L⁻¹), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,39 g.L⁻¹), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079 g.L⁻¹), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,040 g.L⁻¹), ácido cítrico (0,006 g.L⁻¹) e citrato férrico de amônio (0,006 g.L⁻¹) (RIPPKA et al., 1979).

A concentração celular na fase exponencial para tomada do inóculo foi determinada gravimetricamente mediante filtração de volume conhecido de meio de cultura BG11 contendo as células do microrganismo 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 Meios de cultivo

Os meios de cultivos utilizados foram o efluente do processamento do pescado e meio padrão BG11 (RIPKA et al., 1979). O efluente foi coletado no tanque de equalização do

sistema de tratamento de efluente de uma empresa processadora de pescado do setor industrial da cidade de Rio Grande, RS, Brasil. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e então esterilizadas a $1,1 \text{ kgf.cm}^{-2}$ (120°C) por 15 minutos. O efluente foi caracterizado quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) e fósforo (P-PO_4^{-3}). As análises foram realizadas segundo os procedimentos descritos em Standard Methods para análise de águas e efluentes (APHA, 2005).

2.3 Desenvolvimento dos experimentos

Experimentos em duplicada na ausência de luz e temperaturas de 10°C , 20°C e 30°C em efluente e em meio BG11 com luz a 30°C foram conduzidos em reator de mistura completa com capacidade de 4,5 L em sistema descontínuo. Para os experimentos desenvolvidos no efluente o reator foi constituído de uma extensão cilíndrica de PVC com dimensões de 80 cm de altura e 10 cm de diâmetro, tendo sua parte inferior acoplada a um sistema para promover a aeração de 1 VVM e agitação do meio. O efluente foi previamente ajustado a pH 7,6, razão C/N 20 e razão N/P 10, aferido com glicose, sulfato de amônio ou fosfato de potássio em função das concentrações de DQO, NTK e P-PO_4^{-3} presentes no efluente, conforme indicado por HORNES & QUEIROZ (2004). Os experimentos em meio BG11 foram realizados em reatores de vidro a 2 klux de luminosidade e fotoperíodo de 12 h, com sistema de agitação e aeração conforme descrito acima.

O sistema contendo efluente de pescado ou meio BG11 foi inoculado com em média 200 mg.L^{-1} de células de *Aphanothece microscopica* Nägeli obtidas a partir de um volume equivalente ao requerido para obter esta concentração de cultura desenvolvida em meio BG11, conforme descrito no item 2.1.1. Os experimentos foram conduzidos em câmara com controle de temperatura.

2.4 Determinação de nitrogenados

As amostras das culturas no início, meio e fim da fase logarítmica foram separadas do meio de cultivo por centrifugação a 4000 rpm por 15 min e filtradas em filtro Millipore (porosidade de $0,45 \mu\text{m}$).

Para a determinação de nitrito, nitrato e amônio o filtro Milipore com porosidade de 0,45 μm contendo a biomassa foi imerso em água destilada por 15 h. Após esse período o material foi filtrado por sistema a vácuo e lavado com água a 80°C até atingir um volume aproximado de 50 mL. Os íons amônio foram determinados após adição de solução de fenol e nitroprussiato de sódio na presença de excesso de hipoclorito de sódio em meio alcalino, formando azul de indofenol absorvido em $\lambda = 640 \text{ nm}$ (APHA, 2005). A determinação dos íons nitrito foi realizada pela reação com a sulfanilamida em meio ácido, formando um íon diazótico, o qual reage com N-naftil etilenodiamina, resultando em coloração rósea, cuja densidade ótica foi medida em 543 nm (APHA, 2005). Os íons nitrato foram determinados pela reação com o ácido fenoldisulfônico, resultando em um complexo colorido avaliado por espectrofotometria ($\lambda = 410 \text{ nm}$) (APHA, 2005).

Os ácidos nucleicos presentes na biomassa da cianobactéria *Aphanothece* foram extraídos através do método da Extração DNA/RNA com Fenol/Clorofórmio, e quantificado por espectrofotometria com absorção no comprimento de onda de 260 nm (SAMBROC, 1989).

O nitrogênio total e não protéico foram determinados pelo método micro Kjeldahl, sendo o NNP avaliado no sobrenadante após precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (TCA) 5% p/v, segundo metodologia indicada em AOAC (2000). A quantificação de proteína foi realizada mediante conversão do nitrogênio total pelo fator 6,25 (AOAC, 2000).

2.5. Avaliação da influência do nitrogênio não protéico (NNP) na quantificação de proteína

A influência do nitrogênio não protéico (NNP) na quantificação de proteína foi calculada pela subtração do teor desta forma nitrogenada da concentração de nitrogênio total Kjeldahl (NTK) e posterior multiplicação do fator de conversão 6,25.

2.6 Cinética

As variáveis cinéticas velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (tg) e fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) foram determinadas conforme

indicado por LEVENSPIEL (2000). O procedimento de avaliação teve como base as equações 1, 2, 3 e 4.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \quad (1)$$

Integrando-se a equação 1 obtém-se:

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} (\Delta t)} \quad (2)$$

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (3)$$

Onde: tg = tempo de geração (h)

O fator de conversão substrato-microrganismo foi obtido através da equação 4.

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (4)$$

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

A produtividade foi calculada de acordo com a equação 5:

$$P_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (5)$$

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 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1 e 2 apresentam as curvas de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli submetida às diferentes temperaturas de cultivo no efluente do processamento de pescado e em meio padrão BG11. Avaliando-se o comportamento gráfico observa-se que as curvas de crescimento não apresentaram fase lag quando cultivadas no meio BG11 e no efluente a 20°C e 30°C, região em que a velocidade de crescimento é praticamente nula. A ausência desta fase é elucidada pelos dados das tabelas 1 e 3, em que se pode verificar aumento significativo ($p \leq 0,05$) da concentração celular com o tempo para o microrganismo crescendo nas condições consideradas. Isso é característico em curvas de crescimento de cianobactérias quando o inóculo é retirado de culturas crescendo exponencialmente (MEEKES & CASTENHOLZ, 1971; ALTERTHUMM et al., 2001), tais como os inóculos utilizados nestes experimentos. A ausência da fase lag no crescimento da cianobactéria *Aphanothece* a 30°C tem sido constatada em experimentos com ou sem a presença de luz quando se utiliza como meio de cultivo efluentes industriais (QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; HORNES & QUEIROZ, 2004; ZEPKA et al., 2008).

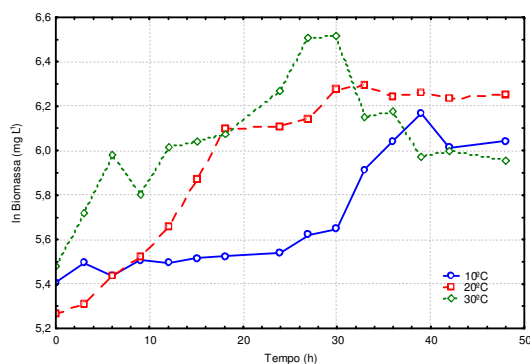


Figura 1. Curvas de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado (○) 10°C (□) 20°C (◇) 30°C

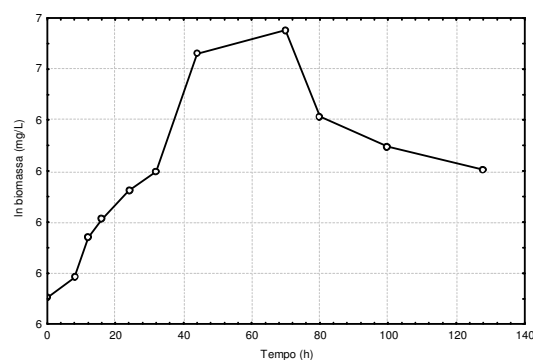


Figura 2. Curva de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no meio padrão BG11

No experimento a 10°C a presença desta etapa pode ser atribuída ao efeito da temperatura. Observa-se na figura 1 a delimitação das três fases iniciais de crescimento no período de cultivo considerado. A fase lag é explicada uma vez que se faz necessário um período de adaptação, no decorrer do qual as células sintetizam as enzimas que lhe forem necessárias para metabolizar os substratos presentes no meio. Neste contexto, observa-se o

aumento significativo da concentração celular ($p \leq 0,05$) somente após 27 h de cultivo, seguido de rápida duplicação celular, com máximo em 39 horas de cultivo (tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de produção de biomassa em função do tempo e da temperatura para os cultivos no efluente do processamento de pescado

Tratamento	Concentração celular (mg.L ⁻¹)												
Efluente	*0	6	9	12	18	24	27	30	33	36	39	42	48
10°C	223 ^{aA}	243 ^{bA}	247 ^{bA}	243 ^{bA}	251 ^{bA}	255 ^{bA}	276 ^{cA}	283 ^{cA}	371 ^{dA}	421 ^{eA}	477 ^{fA}	408 ^{gA}	421 ^{gA}
20°C	194 ^{aA}	229 ^{bA}	251 ^{cA}	286 ^{dB}	447 ^{cB}	449 ^{cB}	466 ^{fB}	532 ^{gB}	544 ^{gB}	517 ^{hB}	524 ^{hB}	511 ^{hB}	518 ^{hB}
30°C	240 ^{aA}	396 ^{bB}	330 ^{cB}	411 ^{dC}	433 ^{cB}	527 ^{fC}	670 ^{gC}	673 ^{gC}	467 ^{hC}	482 ^{iC}	393 ^{iC}	401 ^{jA}	387 ^{jC}

*Número de repetições: 6; Tempo de cultivo (h)

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tempos

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as temperaturas

Quando os experimentos foram realizados a 20°C e 30°C as maiores concentrações foram constatadas em 30 h, com maiores valores absolutos registrados a 30°C (tabela 1) e fase estacionária delimitada por pequeno intervalo (27-30 h) seguido de rápido declínio celular, comportamento este não identificado a 20°C indicando a permanência da fase estacionária. O efeito da temperatura no crescimento de cianobactérias e microalgas em geral tem sido observado em outras espécies (RENAUD et al., 2002, SANTOS et al., 2003), sendo atribuído a este parâmetro as diferenças nas velocidades de crescimento. Esta constatação se reflete nos dados cinéticos registrados na tabela 2, em que as maiores velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) são verificadas a medida que aumenta a temperatura. No entanto é notório que outros fatores, como o meio de cultivo, são de importância tanto no crescimento como na produção celular, fato este verificado quando são avaliados os valores de $\mu_{\text{máx}}$, uma vez que é registrado maior velocidade para a cianobactéria desenvolvida no efluente em relação ao meio BG11 a igual temperatura de cultivo (30°C). A velocidade específica de crescimento máxima registrada para o microrganismo desenvolvido no efluente é quase duas vezes maior do que a verificada quando se utiliza o meio BG11. Este rápido crescimento é típico de cianobactérias cultivadas no efluente de indústrias de alimentos, o que demonstra a capacidade destes microrganismos em removerem e assimilarem heterotroficamente compostos orgânicos e inorgânicos de efluente (GUERRERO et al., 1999; OGBONNA & TANAKA, 2000; BASTOS et al., 2004; QUEIROZ et al., 2004; HORNES & QUEIROZ, 2004; QUEIROZ et al., 2007).

As diferenças nas taxas de crescimento (tabela 2) podem ser atribuídas entre outros fatores à fonte de nitrogênio disponível, uma vez que para o meio BG11 este se encontra essencialmente na forma de nitrato de sódio e no efluente como compostos orgânicos e

derivados inorgânicos como íon amônio (HORNES & QUEIROZ, 2004). O íon amônio é considerado a forma nitrogenada mais facilmente assimilada por estes microrganismos, uma vez que não é requerida redução enzimática para assimilação da amônia (HERRERO et al., 1981; DORTCH & POSTEL, 1989; MURO-PASTOR & FLORENCIO, 2003; GARCÍA-FERNÁNDEZ & DIEZ, 2004).

De acordo com Von Rückert & Giani (2004) o crescimento de microalgas pode ser mais lento em meio nitrato. Estes autores encontraram altas taxas de crescimento ($\mu_{\max} = 0,393$ d) para *Microcystis viridis* Lemmermann quando desenvolvida em meio amoniaco e de 0,263 d quando cultivada em meio nitrato, atribuindo a diferença à alta taxa de absorção e assimilação do amônio em relação ao nitrato, comportamento este similar ao registrado neste trabalho, quando se utiliza o meio BG11 e o efluente do processamento de pescado.

Tabela 2. Variáveis cinéticas obtidas para os experimentos

Parâmetro	Meio BG11		Efluente	
	(30°C)	10°C	20°C	30°C
X_0 (mg.L ⁻¹)	276	223	194	240
P_x (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	7,93 ^a	6,51 ^a	10,6 ^b	15,9 ^c
$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	0,017	0,018	0,033	0,038
tg (h)	41	37,0	20,7	18,2

X_0 : concentração celular inicial; $\mu_{\max}$: velocidade específica de crescimento máxima; tg: tempo de geração; P_x : produtividade

* Número de repetições: 6

Em meio BG11 a máxima concentração celular foi atingida somente em 70 h de cultivo, com valor superior (855 mg.L⁻¹) e significativamente diferente ($p \leq 0,05$) em relação ao máximo produzido (527 mg.L⁻¹) na biomassa gerada no efluente na mesma temperatura em 24 h (tabela 3). Esses resultados sugerem a viabilidade de produção de biomassa como fontes de constituintes de valor comercial, uma vez que embora a maior concentração de biomassa possa ser obtida quando se utilizada o meio BG11 a produtividade quando a cianobactéria *Aphanothece* é desenvolvida no efluente apresenta valor notadamente superior quando comparado ao meio padrão, em torno de sete vezes maior (HORNES & QUEIROZ, 2008).

Tabela 3. Valores médios de produção de biomassa em função do tempo para os cultivos no efluente e meio BG11 a 30°C

Tratamento	Concentração celular (mg.L ⁻¹)										
	*0	6	12	18	24	33	36	42	60	70	80
Efluente	240 ^{aA}	396 ^{bA}	411 ^{cA}	433 ^{dA}	527 ^{eA}	467 ^{fA}	482 ^{gA}	401 ^{hA}			
BG11	300 ^{aB}	324 ^{bB}	380 ^{cB}	408 ^{dA}	456 ^{eB}	492 ^{fB}	500 ^{fB}	780 ^{gB}	726 ^h	855 ⁱ	610 ^j

* Número de repetições: 6; Tempo de cultivo (h)

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tempos

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as temperaturas

As tabelas 4, 5 e 6 apresentam o efeito dos diferentes meios de cultura e temperaturas refletidos nas biomassas geradas no efluente e meio BG11, resultando em perfis distintos quanto aos compostos nitrogenados. Segundo Dortch et al. (1984) as microalgas acumulam nitrogênio intracelular na forma de várias substâncias, como nitrato, amônia, aminoácidos, proteínas e pigmentos.

Avaliando a tabela 4 verifica-se que as maiores concentrações de nitrogênio total Kjeldahl (NTK) na biomassa cultivada no efluente do processamento do pescado são registradas no final da fase exponencial, independente da temperatura. No meio BG11 o comportamento descrito foi diferenciado em relação à biomassa cultivada no efluente, sendo observadas reduções ($p \leq 0,05$) do início para o final da fase logarítmica de crescimento. No entanto, independente do meio de cultivo é possível verificar a influência do nitrogênio não protéico no nitrogênio total. Os valores de NNP foram significativamente superiores ($p \leq 0,05$) na biomassa cultivada no efluente a 10°C em relação aos demais tratamentos, com exceção do início da fase log. Este comportamento se reflete em todas as fases de crescimento com relação ao parâmetro nitrogênio amoniacal (tabela 5).

Tabela 4. Concentração de nitrogênio total Kjeldahl e nitrogênio não protéico na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado e em meio padrão

Nitrogenado	Meio de Cultivo	T (°C)	Início da fase log	Meio da fase log	Final da fase log
NTK (g.100g ⁻¹)	Efluente	10	7,92 ^{aA} ±0,30	7,14 ^{aA} ±0,16	9,08 ^{bA} ±0,48
		20	8,07 ^{aAB} ±0,26	8,05 ^{aA} ±0,68	9,31 ^{bAB} ±0,22
		30	8,56 ^{aAB} ±0,24	7,71 ^{aA} ±0,00	10,57 ^{bB} ±0,16
	Meio Padrão	30	9,79 ^{aB} ±0,41	9,53 ^{bB} ±0,15	9,65 ^{bAB} ±0,81
		10	5,56 ^{aA} ±0,07	6,05 ^{aA} ±0,21	6,67 ^{aA} ±0,18
		20	4,52 ^{aB} ±0,12	3,68 ^{bB} ±0,31	3,38 ^{bB} ±0,15
NNP (g.100g ⁻¹)	Efluente	30	4,34 ^{aB} ±0,04	3,42 ^{bB} ±0,33	4,20 ^{aCB} ±0,22
	Meio Padrão	30	5,94 ^{aA} ±0,36	3,71 ^{bB} ±0,65	4,45 ^{bB} ±0,81
		10	70,2 ^{aA}	84,7 ^{BA}	73,6 ^{aA}
	Efluente	20	56,0 ^{aB}	45,8 ^{aB}	36,4 ^{bB}
	Meio Padrão	30	50,7 ^{aB}	44,4 ^{bB}	39,4 ^{bA}
		30	52,2 ^{aB}	38,9 ^{bB}	46,1 ^{aB}

*NTK: Nitrogênio total Kjeldahl; NNP: Nitrogênio não protéico; média de seis repetições

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as fases de crescimento

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as temperaturas

O aumento significativo do NNP na biomassa gerada no efluente entre o meio e fim da fase logarítmica ($p \leq 0,05$) sugere a conversão do nitrogênio absorvido em importante fração de ácidos nucléicos. Isto é corroborado pelos dados registrados na tabela 6 em que são indicadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de ácidos nucléicos entre início da fase log e o meio e fim da fase log, com maiores valores absolutos registrados no final da fase log. Esta constatação

se justifica uma vez que ao longo da curva de crescimento de uma população de microalgas a composição química é alterada em função das limitações de luz e nutrientes a que as células são submetidas. De acordo com Fogg & Thake (1987), em geral as microalgas em plena atividade fotossintética na fase exponencial apresentam maior proporção de proteínas e ácidos nucleicos por predominarem os processos de divisão e síntese de estruturas celulares.

Quando se avalia os percentuais de NNP em relação ao NTK, observa-se grande variabilidade dos dados com a temperatura, com teores significativamente superiores ($p \leq 0,05$) para as biomassas cultivadas a 10°C, independente da fase de crescimento. Esta constatação se justifica, uma vez que as cianobactérias são capazes de acumular compostos intracelularmente em condições de estresse, conforme reportado por diferentes autores (DORTCH et al., 1984; LOURENÇO et al., 1997; VON RÜCKER & GIANI, 2004). Isso é corroborado pelos altos valores de N-NH_4^+ intersticial (tabela 5) registrados para a biomassa quando o microrganismo é desenvolvido a 10°C, diferindo-se significativamente ($p \leq 0,05$) das demais condições.

Na tabela 5 está registrado o comportamento das concentrações dos íons nitrato, nitrito e nitrogênio amoniacal intracelular para as condições experimentais avaliadas. Observa-se que as maiores concentrações de N-NH_4^+ para a biomassa desenvolvida no efluente são registradas no início da fase logarítmica de crescimento, independente da temperatura, fato este não verificado quando o microrganismo se desenvolve no meio BG11, em que a concentração de N-NH_4^+ perfaz aproximadamente um quinto do nitrogênio não protéico presente na biomassa no final da fase logarítmica. O efeito da temperatura se faz notar na biomassa resultante do cultivo a 10°C, em que as concentrações de amônia diferem significativamente ($p \leq 0,05$) das registradas nos demais tratamentos. Isso sugere que o maior tempo de geração (37,0 h) registrado para o microrganismo gerado a 10°C em relação ao desenvolvido a 20°C (20,7 h) e 30°C (18,2 h) (tabela 2), possa ser justificado pelo efeito da temperatura e conseqüente acúmulo de nitrogênio amoniacal intracelular.

Avaliando comparativamente os valores de nitrato, nitrito e amônia intracelular (tabela 5) constata-se que na biomassa gerada a 10°C são registradas maiores concentrações de N-NH_4^+ no início e meio da fase exponencial, seguido de depleção deste componente e aumento de N-NO_3^- . Nas cianobactérias a presença do íon amônio no meio de cultivo estimula a ação da proteína NtcA, reprimindo o sistema de assimilação de nitrato, o que inclui o transporte deste e a posterior redução a amônio. Assim, o comportamento dos nitrogenados descrito pode ser atribuído à inibição da proteína NtcA e conseqüentemente à absorção de outras formas nitrogenadas (HERRERO et al., 2001; LUQUE et al., 2004).

Tabela 5. Concentração de íon amônio, nitrito e nitrato intracelular na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado e em meio padrão

	Meio de Cultivo	T (°C)	Início da fase log	Meio da fase log	Final da fase log
N-NO ₂ ⁻ (g.100g ⁻¹)	Efluente	10	0,014 ^{aA} ±0,006	0,0016 ^{bA} ±0,002	0,0063 ^{abA} ±0,00
		20	0,092 ^{aB} ±0,000	0,045 ^{bB} ±0,016	0,034 ^{bB} ±0,002
		30	0,268 ^{aC} ±0,050	0,267 ^{aC} ±0,041	0,277 ^{aC} ±0,053
	Meio Padrão	30	0,046 ^{aB} ±0,012	0,016 ^{bB} ±0,002	0,008 ^{aA} ±0,002
		10	0,073 ^{aA} ±0,106	0,208 ^{aA} ±0,198	0,284 ^{bA} ±0,315
		20	0,011 ^{aB} ±0,000	0,009 ^{aB} ±0,002	0,004 ^{bB} ±0,001
N-NO ₃ ⁻ (g.100g ⁻¹)	Efluente	20	0,018 ^{aB} ±0,005	0,003 ^{bB} ±0,000	0,004 ^{bB} ±0,000
		30	0,324 ^{aC} ±0,011	0,123 ^{aC} ±0,005	1,58 ^{bC} ±0,171
		10	4,88 ^{aA} ±0,194	4,51 ^{aA} ±0,526	4,29 ^{aA} ±0,823
	Meio Padrão	20	2,55 ^{aB} ±0,083	2,24 ^{aB} ±0,077	1,88 ^{bB} ±0,089
		30	2,14 ^{aC} ±0,080	1,71 ^{bB} ±0,096	1,23 ^{bB} ±0,282
		30	0,30 ^{aD} ±0,022	0,40 ^{bC} ±0,067	0,85 ^{cB} ±0,144

*N-NH₄⁺: Nitrogênio amoniacal; N-NO₂⁻: Nitrogênio nitrito; N-NO₃⁻: Nitrogênio nitrato; média de seis repetições

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (p≤0,05) entre as fases de crescimento

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (p≤0,05) entre as temperaturas

Fuentes et al. (2000) encontraram de 0,05 g.100 g⁻¹ a 0,2 g.100 g⁻¹ de N-NO₃⁻ na biomassa da microalga *Porphyridium cruentum* cultivada a 20°C em diferentes condições de luminosidade e tempos de residência, intervalo este de concentração registrado no presente trabalho para a biomassa cultivada a 10°C. As maiores concentrações de N-NO₃⁻ foram observadas nos menores tempos de residência (1,03 d - 1,43 d), cujos resultados estão de acordo com os dados da tabela 5, em que a concentração de N-NO₃⁻ no cultivo a 10°C (maior tempo de residência) diferiu significativamente em relação aos demais. Comportamento inverso é registrado para N-NO₂⁻ quando a biomassa é cultivada a 30°C. Nesta condição são registradas menores concentrações de N-NH₄⁺ intracelular. No entanto, não são registradas diferenças significativas para N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ intracelular (p≤0,05) na biomassa gerada a 20°C e 30°C, independente da fase de crescimento. Esses dados sugerem uma possível assimilação celular de formas nitrogenadas mais reduzidas além do acúmulo intersticial, conforme descrito por Lourenço et al. (1997) e Von Rückert & Giani (2004) para outras espécies. Concentrações significativamente maiores (p≤0,05) de N-NO₃⁻ na biomassa desenvolvida em meio BG11 em comparação a cultivada no efluente podem ser atribuídas à fonte nitrogenada do meio padrão ser essencialmente nitrato (RIPPKA et al., 1979).

Na tabela 6 podem ser avaliados os resultados obtidos para os teores de ácidos nucleicos para as diferentes fases de crescimento, de proteína quando calculados mediante a conversão do NTK pelo fator 6,25 e quando deste parâmetro é descontado o NNP, bem como

as razões proteína/ácidos nucléicos. As razões proteína/ácidos nucléicos foram calculadas a partir do teor de proteína sem correção.

Tabela 6. Concentração de proteína e ácidos nucléicos na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado e em meio padrão

	Meio de Cultivo	T (°C)	Início da fase log	Meio da fase log	Final da fase log
Ac. Nucléicos (g.100 g ⁻¹)	Efluente	10	3,81 ^{aA} ±0,19	4,14 ^{abA} ±0,03	4,22 ^{aA} ±0,34
		20	3,05 ^{aB} ±0,07	6,29 ^{bB} ±0,13	6,34 ^{bB} ±0,55
		30	3,34 ^{aC} ±0,18	7,34 ^{bC} ±0,18	7,86 ^{cAB} ±0,05
	Meio Padrão	30	4,3 ^{aA} ±16,8	4,7 ^{aD} ±3,10	5,7 ^{aAB} ±18,2
		10	49,52 ^{aA} ±1,87	44,5 ^{aA} ±0,68	56,69 ^{aA} ±3,02
		20	54,49 ^{abA} ±5,31	50,23 ^{aB} ±4,25	58,07 ^{bA} ±1,37
% Proteína (NTK x 6,25)	Efluente	30	53,47 ^{aA} ±1,50	48,11 ^{aAB} ±0,87	60,29 ^{bA} ±1,05
	Meio Padrão	30	61,17 ^{aA} ±2,50	59,56 ^{aB} ±0,31	66,62 ^{aA} ±5,56
		10	14,8	9,37	14,9
	Efluente	20	22,2	27,2	36,9
		30	26,4	26,7	38,7
	Meio Padrão	30	34,01	36,39	40,42
Proteína/Ácidos Nucléicos	Efluente	10	12,9	10,7	13,4
		20	17,9	7,97	9,61
		30	16,0	6,55	10,5
	Meio Padrão	30	14,2	12,6	8,47

*NNP: Nitrogênio não protéico; NTK: Nitrogênio total Kjeldahl; média de seis repetições

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as fases de crescimento

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as temperaturas

A avaliação estatística dos dados registrados para ácidos nucléicos indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em função da temperatura e fases de crescimento, observando-se de uma forma geral um acréscimo com a fase de crescimento. Os valores obtidos para a biomassa tanto desenvolvida no efluente como no meio BG11 se encontram no intervalo de concentração registrado para outras cianobactérias e microalgas, independente da temperatura e fase de crescimento (FAY, 1983; ORTEGA et al., 1993; CRUEGER & CRUEGER, 1994; SGARBIERI, 1996).

O nível de ácidos nucléicos nas algas é baixo em relação a outras fontes alimentares de organismos unicelulares (FAY, 1983; CRUEGER & CRUEGER, 1994). CRUEGER & CRUEGER (1994) citam as bactérias como sendo os microrganismos de maior conteúdo de ácidos nucléicos (10-16%), seguindo as leveduras (6-10%), algas (4-6) e fungos (2,5-6%). Ortega et al. (1993) avaliando o perfil bioquímico da cianobactéria *Spirulina*, registraram concentrações de 4-6% de ácidos nucléicos, valores muito próximos aos encontrados neste trabalho.

As concentrações registradas mostram a possível aplicabilidade deste microrganismo na dieta alimentar, uma vez que a composição em ácidos nucléicos é um dos indicativos da inocuidade em relação a compostos tóxicos (MORIST et al., 2001, FUENTES et al., 2000; FUENTES et al., 2001; SPOLAORE et al., 2006). De acordo com a FAO (1985), o limite diário de ácidos nucléicos provenientes de microrganismos é de 2 g.d⁻¹ (SGARBIERI, 1996). Este limite está associado à formação de ácido úrico, produto final do catabolismo dos ácidos nucléicos, que pelo fato de ser pouco solúvel em fluidos biológicos pode se acumular em excesso. Esse componente pode precipitar na forma de cristais nas articulações ou em outros tecidos e formar cálculos no trato urinário, trazendo problemas de ordem orgânica (LEHNINGER, 1989; SGARBIERI, 1996). Assim, considerando a maior concentração de ácidos nucléicos registrada para o meio da fase log (7,86 g.100 g⁻¹) quando o microrganismo é desenvolvido no efluente a 30°C, seria possível ingerir aproximadamente 35,2 g de *Aphanothece* diariamente. A viabilidade da utilização deste microrganismo gerado no efluente pode ser considerada tomando como base os resultados obtidos por Queiroz et al. (1996) que elaboraram formulações de macarrão utilizando como ingrediente o microrganismo em análise. A formulação de maior índice de aceitação pelo consumidor correspondeu a uma concentração de 8% de *Aphanothece*. Isso significa que poderia ser ingerido diariamente em torno de 440 g de macarrão cru, quantidade essa superestimada quando se considera a refeição para uma só pessoa. Por outro lado, o efeito gerador de níveis de uréia e ácido úrico está associado à baixa relação proteína/ácidos nucléicos (SGARBIERI, 1996). Bastos et al. (1999) determinaram o conteúdo de ácido nucléico na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli obtendo um valor de 4,37 g.100 g⁻¹, correspondendo a uma relação proteína/ácido nucléico de 12,5. Este valor é equivalente ao obtido no presente trabalho para a biomassa gerada em meio BG11 e similar ao relatado na literatura para cianobactérias convencionalmente utilizadas para consumo humano (SGARBIERI, 1996). As razões proteína/ácidos nucléicos obtidas para o microrganismo em estudo quando desenvolvido no efluente no final da fase log são maiores em comparação com os valores encontrados na biomassa gerada em meio BG11, na presença de luz e utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, o que demonstra a influência do meio de cultivo nas concentrações de ácidos nucléicos. No entanto, essas razões podem ser permissíveis na utilização na dieta alimentar, uma vez que o possível consumo diário é aquém aos teores de ácidos nucléicos permitidos pela FAO (SGARBIERI, 1996).

A influência do meio de cultivo se faz sentir também no comportamento dos valores de proteína registrados. Observa-se que independente da temperatura, maiores concentrações de proteína ($p \leq 0,05$) são registradas do início para o fim da fase logarítmica quando o microrganismo é desenvolvido no efluente. Isso também é observado ao se avaliar a biomassa gerada no meio BG11. Esta constatação é elucidada no trabalho de Lourenço et al. (1997) que encontraram concentrações de proteínas significativamente maiores ($p < 0,01$) na microalga *Tetraselmis gracilis* quando cultivada a 20°C no meio em que predominava como fonte de nitrogênio amônio ao invés de nitrato. Essas concentrações foram verificadas no final da fase logarítmica, da mesma forma que foi constatado neste trabalho para a biomassa gerada no efluente a 20°C. Esse fato pode ser resultante da adaptação prévia dos microrganismos ao meio, considerando que para o meio BG11 o inóculo utilizado foi desenvolvido nas mesmas condições de cultivo. Isso poderia explicar o porquê da maior concentração de proteína na biomassa desenvolvida no efluente no início da fase exponencial e o subsequente decréscimo da mesma no meio da fase log, logo após a fase de adaptação, o que corresponde a aproximadamente 12 h de cultivo (tabela 1).

Von Rückert & Giani (2004) estimaram a composição protéica em tratamentos contendo diferentes composições de nitrogênio ($\text{NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$, N-NH_4^+ e NO_3^-) pela cianobactéria *Microcystis viridis* Lemmerman a 20°C e ciclo de 12 h claro/escuro. Para o experimento que utilizou somente nitrato, a concentração final de proteína foi sempre maior do que nos experimentos que utilizaram apenas amônio e amônio mais nitrato. No presente trabalho a concentração de proteína não apresentou diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre a biomassa desenvolvida no efluente, independente da temperatura utilizada, e no meio padrão BG11. Isso mostra que a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli pode se desenvolver em meios contendo diferentes fontes de nitrogênio, apresentando uma composição protéica equivalente. Para todas condições avaliadas a biomassa apresentou concentrações de proteína maior do que 40% em peso seco. Esse resultado está em concordância com estudos realizados em outras cianobactérias, como na *Cyanothece* sp. (SCHNEEGURT et al., 1995), *Spirulina platensis* (TOKUSOGLU & ÜNAL, 2003) e *Aphanothece microscopica* Nägeli (ZEPKA et al., 2008).

Para o microrganismo desenvolvido no meio BG11, é registrada uma concentração de proteína no final da fase logarítmica de 66,62%, valor este superior que o encontrado por Schneegurt et al. (1995) para a cianobactéria *Cyanothece* sp. (51,7%), em cultivo com ciclo claro e escuro a 30°C e meio contendo NaNO_3 . No entanto, é registrada para o microrganismo

desenvolvido no efluente a concentração de 60,29%. Isso pode ser atribuído ao fato que diferentes variáveis poderão atuar no aumento de produção celular e na composição química do microrganismo, obtendo a energia para a sua manutenção e crescimento de diferentes formas utilizando caminhos metabólicos alternativos (DORTCH et al., 1984; OLGUÍN et al., 2001).

No que se refere ao teor de proteína esta variável pode ser significativamente influenciada em função dos teores de nitrogênio não protéico constituintes de sua estrutura intracelular. Devi et al. (1981) e Dortch et al. (1984) reportam que as substâncias nitrogenadas como ácidos nucleicos e nitrogênio amoniacal perfazem importante fração do NNP. Esta constatação pode ser verificada nos dados descritos neste trabalho. Desta forma, quando é considerado na quantificação da proteína o nitrogênio não protéico observa-se grande contribuição deste componente para todas as fases de crescimento, tanto para a cianobactéria cultivada no efluente como no meio BG11. Os valores de compostos nitrogenados não protéicos refletiram na fração protéica calculada em função do NTK e quando não se considera a fração NNP.

Os resultados demonstram que o fator tradicional de conversão de NTK em proteína (6,25) é inadequado, pois estima exagerada e erroneamente as concentrações de proteína presentes na biomassa de cianobactérias.

4 CONCLUSÃO

Os teores de nitrogênio total aumentam com a fase de crescimento na biomassa gerada no efluente, no entanto demonstram comportamento inverso no microrganismo desenvolvido em meio BG11.

O nitrogênio amoniacal intracelular representa importante fração do nitrogênio total.

Os ácidos nucleicos aumentam com a fase de crescimento, independente do meio de cultivo.

As maiores concentrações de proteína são registradas no final da fase logarítmica.

O nitrogênio não protéico exerce influência na concentração de proteína, quando esta é calculada por conversão do nitrogênio total utilizando o fator 6,25.

A temperatura e o meio de cultivo exercem importante efeito nas concentrações de compostos nitrogenados na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli.

5 REFERÊNCIAS

- ALTERTHUMM, F. Elementos de Microbiologia. In: Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. *Biotecnologia Industrial*. v. 1. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2005), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. Washington.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. (2000). Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 459-479.
- 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.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 2000. Official Methods of Analysis, 15th edn. Washington, DC.
- BASTOS, R.G.; BENERI, R.L.; PADILHA, M.E.S. Avaliação do cultivo da *Aphanethece microscopica* Nägeli no efluente da parboilização do arroz sob diferentes condições de luminosidade. Projeto (*Graduação em Engenharia de Alimentos*). FURG. 87 p. 1999.
- BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I.; ALMEIDA, T.L.; BENERI, R.L.; ALMEIDA, R.V.; PADILHA, M. (2004). Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanethece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 9, p. 112-116.
- BECKER, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 207-210.
- BURJA, A.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, R.; BURGESS, J.; WRITGHT, P. (2001). Marine cyanobacteria – a profile source of natural products. *Tetrahedron*, v. 590, p. 9347-9377.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. *Biotecnologia, Manual de Microbiologia Industrial*. Zaragoza: Editora Acribia, 1994.
- DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Review*, v. 22, p. 151-175.
- DEVI, M.A.; SUBBULAKSHMI, G.; DEVI, K.M.; VENKATARAMAN, L.V. (1981). Studies on the proteins of mass-cultivated, blue-green alga (*Spirulina platensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, p. 522-525.
- DORTCH, Q.; CLAYTON JUNIOR, J.R.; THORESEN, S.S; AHMED, S.I. (1984). Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Marine Biology*, v. 81, p. 237-250.

DORTCH, Q.; POSTEL, J.R. (1989). Biochemical indicators for N utilization by phytoplankton during upwelling off the Washington coast. *Limnology and Oceanography*, v. 34, p. 758-773.

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

FAO/WHO. *Report of ad Hoc Expert Committee on Energy and Protein Requirements*. Tech. Report. Series 522. Roma, 1985.

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. (1998). 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.

FUENTES, M.M.R.; FERNÁNDEZ, G.G.A.; PÉREZ, J.A.S.; GUERRERO, J.L.G. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, v. 70, p. 345-353.

FUENTES, M.M.R.; PÉREZ, A.N.; CAMACHO, F.G.; MIRAS, J.J.R.; GUERRERO, J.L.G. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 2966-2972.

FOGG, G.E.; THAKE, B. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Madison: The University of Wisconsin Press, 1987, 269 p.

GARCÍA-FERNANDEZ, J.M.; DIEZ, J. (2004). Recent developments in solid state fermentation. *Research in Microbiology*, v. 155, p. 795-802.

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

HERRERO, A.; FLORES, E.; GUERRERO, M.G. (1981). Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. Strain 7119, and *Nostoc* sp. Strain 6719. *Journal of Bacteriology*, v. 145, p. 175-180.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A.M.; FLORES, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 411-425.

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

HORNES, M.I.; QUEIROZ, M.I. Efeito da temperatura na composição química, clorofila *a* e ficocianina da cianobactéria *Aphanotece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da

indústria processadora de pescado. In: Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Furg, Rio Grande, 2008. 29 p.

LEHNINGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1989.

LEM, N; GLINCK, B. (1985). Biotechnological uses of cyanobacteria. *Biotechnology Advances*, v. 3, p. 195-208.

LEVENSPIEL, O. *Engenharia das Reações Químicas*. São Paulo: Edgard Blücher, 2000.

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

LUQUE, I.; FLORES, E.; HERRERO, A. (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO Journal*, v. 13, p. 2862-2869.

LUQUE, I.; VÁZQUEZ-BERMÚDEZ, M.F.; PAZ-YEPES, J.; FLORES, E.; HERRERO, A. (2004). In vivo activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiology Letters*, v. 236, p. 47-52.

MEEKS, J.C.; CASTENHOLZ, R.W. (1971). Growth and photosynthesis in thermophile *Synechococcus lividus* (cyanophyta). *Archives of Microbiology*, v. 78, p. 25-41.

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

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

MURO-PASTOR, M.I.; FLORENCIO, F.J. (2003). Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 41, p. 595-603.

OGBONNA, J.C.; TANAKA, H. (2000). Production of pure photosynthetic cell biomass for environmental biosensors. *Materials Science and Engineering C*, v. 12, p. 9-15.

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. (2001). 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.

ORTEGA, J.J.; MAZUELOS, C.; HERMOSIN, B.; SAIZ, C. (1993). Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. *Journal of Applied Phycology*, v. 4, p. 425-435.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P.K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, v. 40, p. 248-255.

QUEIROZ, M.I.; TEIXEIRA, R.M.; TREPTOW, R.O. Composição química e perspectiva de utilização da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli na formulação de macarrão. In: *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*; Minas Gerais, Poços de Caldas; SBCTA, 1996.

QUEIROZ, M.I.; KOETZ, P.R.; TREPTOW, R.O. (2001). The Nägeli *microscopical Aphanothece* potential in the production of the single-cell protein from the remaining water. In: Chames, S.W., Cánovas-Barbosa, G.V.; Aguilera, J.M. (Ed.), *Proceeding of the Eighth International Congress on Engineering and Food* (Icef 8), Pennsylvania, USA, pp. 2027-2031.

QUEIROZ, M.I.; BASTOS, R.G.; BENERI, R.L.; ALMEIDA, R.G. (2002). 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.

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

QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L.Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. (2007). 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.

RAJOKA, M.I.; KHAN, S.H.; JABBAR, M.A.; AWAN, M.S.; HASHMI, A.S. (2006). Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1934-1941.

RENAUD, S.M.; THINH, LUONG-VAN; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D.L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, v. 211, p. 195-214.

REYNOLDS, C.S. *The ecology of freshwater phytoplankton – Cambridge studies in ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1984.

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

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor, 1989.

SÁNCHEZ-LUNA, L.D.; CONVERTI, A., TONINI, G.C., SATO, S., CARVALHO, J.C.M. (2004). Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. *Aquacultural Engineering*, v. 31, p. 237-245.

- SANTOS, G.M.; MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R.M. (2003). Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 17-21.
- SCHNEEGURT, M.A.; ARIELI, B.; MCKEEHEN, J.D.; STEPHENS, S.D.; NIELSEN, S.S.; SAHA, P.R.; TRUMBO, P.R.; SHERMAN, L.A. (1995). Compositional and toxicological evaluation of the diazotrophic cyanobacterium, *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142. *Aquaculture*. v. 134, p. 339-349.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades-Degradações-Modificações*. São Paulo: Ed. UNICAMP, 1996, 386p.
- SHI, XIAN-MING; ZHANG, XUE-WU; CHEN, F. (2000). Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 27, p. 312-318.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p. 87-96.
- STAL, L.J.; MOEZELAAR, R. (1997). Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Review*, v. 21, p. 179-211.
- TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. (1996). Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 45-50.
- TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M.K. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 1144-1148.
- VON RÜCKERT, G.; GIANI, A. (2004). Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, p. 325-331.
- WITJITRA, K.; SHAH, M.M.; CHERYAN, M. (1996). Effect of nutrient sources on growth and acetate production by *Clostridium thermoaceticum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 322-327.
- ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. (2008). Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanethece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*. v. 47, p. 1311-1316.

ARTIGO 5

**Produção de proteína unicelular a partir do efluente do processamento de pescado:
modelagem preditiva e simulação**

**Produção de proteína unicelular a partir do efluente do processamento do pescado:
modelagem preditiva e simulação**

Marcio Oliveira Hornes; Maria Isabel Queiroz

Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química –
Laboratório de Biotecnologia. Rua Eng. Alfredo Huch 475, CEP 96201-900, Rio
Grande - RS, Brasil. Telefone (53) 32338636 - FAX (53) 32338745 -
biotecnofurg@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de proteína unicelular através do cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da indústria da pesca. Os dados cinéticos de crescimento celular foram ajustados a quatro modelos matemáticos (Logístico, Gompertz, Gompertz Modificado e Baranyi), visando definir uma expressão matemática para descrever o crescimento celular e estimar a produtividade em um processo contínuo. Os resultados demonstraram que o modelo Logístico foi considerado o mais adequado para descrever a formação de biomassa. A análise preditiva mostrou a possibilidade da obtenção de $1,66 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, $18,96 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e $57,36 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ de biomassa em 1000 h de processo contínuo, para as temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C, respectivamente.

Palavras-chave: cianobactéria, cinética de crescimento, efluente, modelagem, produtividade

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the single cell protein production through the cultivation of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli in the fish processing effluent. The growth data were fitted into four mathematic models (Logistic, Gompertz, modified Gompertz and Baranyi model), to define a mathematical expression to describe the cell growth and estimate the productivity in a continuous process. The results showed that Logistic model described growth data the best. The predictive analysis showed the possibility to obtain $1,66 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, $18,96 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e $57,36 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ of biomass in 1000 h continuous process for 10°C, 20°C and 30°C, respectively.

Keywords: cyanobacterium, growth kinetic, effluent, modeling, productivity

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são reconhecidas pelas suas habilidades na purificação de corpos hídricos poluídos, uma vez que estes microrganismos usam a energia solar para fornecer oxigênio necessário à degradação aeróbica, além de reciclar nutrientes responsáveis pela eutrofização, incorporando-os a uma biomassa potencialmente reutilizável (GRIMA et al., 2003; MUÑOZ & GUIEYSSE, 2006; QUEIROZ et al., 2007).

O uso de cianobactérias no tratamento de efluentes foi sugerido inicialmente há anos atrás (CALDWELL, 1946; OSWALD & GOTAAS, 1957). Esta tecnologia é considerada uma alternativa de baixo custo quando comparada às formas convencionais de tratamento terciário de águas residuárias. Inúmeras vantagens do uso de organismos fotossintéticos para a melhoria da qualidade de efluentes está estabelecida, já que a fotossíntese produz oxigênio que é efetivo na remoção de DBO e compostos orgânicos recalcitrantes. O elevado pH obtido em cultivos densos de cianobactérias é outro critério importante, já que favorece a precipitação de fosfato e de metais pesados (VOLTOLINA et al., 1998). Adicionalmente, a possibilidade de conduzir o processo em metabolismo heterotrófico tem sido relatada como um mecanismo potencial de uso destes microrganismos no tratamento de efluentes (ZEPKA et al., 2008).

A adaptação de cianobactérias em efluentes industriais é uma alternativa sob o ponto de vista econômico, uma vez que as águas residuárias contêm consideráveis quantidades de nitrogênio, fósforo, carbono e micronutrientes que podem ser reaproveitados para o crescimento microbiano (CHOJNACKA et al., 2004).

Modelos matemáticos e cinéticos podem ser usados na otimização de meios de cultivo, além de resolver problemas relacionados ao dimensionamento, a otimização econômica e ao controle do processo (BAQUERISSE et al., 1999).

Para comparar modelos preditivos é necessário considerar cinco critérios básicos: (a) qualidade de ajuste aos dados experimentais; (b) complexidade relativa (parcimônia); (c) facilidade de uso; (d) significância fisiológica e (e) interpretação dos parâmetros do modelo. Estas são importantes considerações para evitar que a modelagem esteja baseada apenas em um exercício de ajustes de curvas (PHUA & DAVEY, 2007).

A maximização da produtividade em biomassa nos reatores é outra importante etapa no desenvolvimento da biotecnologia de cianobactérias a nível industrial, o que implica no melhoramento dos parâmetros de cultivo e no conhecimento das características do

microrganismo. Diversos modelos têm sido desenvolvidos para prever o crescimento e a produtividade volumétrica em reatores usados no cultivo de cianobactérias. Tais modelos auxiliam na elucidação da dependência da produtividade mássica em relação a determinados parâmetros do processo. Entretanto, estes modelos geram somente informações qualitativas, e não podem ser extrapolados para outras configurações de reatores, outras espécies ou diferentes condições de cultivo. Cultivos de microrganismos em estado estacionário são normalmente usados para a otimização da produtividade e para estudos fisiológicos em cultivos contínuos, sendo normalmente conduzidos em quimiostatos (BARBOSA et al., 2003). De acordo com Prat et al. (2006), o estudo teórico da transposição de processos em batelada para contínuo é uma importante etapa no acoplamento da otimização tecnológica com o planejamento experimental. Estes autores reportam a possibilidade do desenvolvimento inicial do processo contínuo baseado em análises do regime transiente.

Em face disto, o trabalho teve por objetivo avaliar a produção de proteína unicelular pela cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria da pesca. O foco do trabalho é a modelagem matemática do crescimento e a predição da produtividade celular em processos contínuos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

2.1.1 Preparo do inóculo

Suspensões de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSM92, 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 BG11 (Braun-Grunow medium) conforme indicado por Rippka et al. (1979). As culturas foram mantidas a 2 klux com fotoperíodo de 12 h, 30°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 mediante uso de luxímetro tipo LX-101 Digital e termômetros dispostos no interior do reator. A temperatura e intensidade luminosa foram otimizadas em função do número de lâmpadas que eram mantidas acesas.

O meio BG11 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 ($2,86 \text{ g.L}^{-1}$), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ($1,81 \text{ g.L}^{-1}$), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,222 \text{ g.L}^{-1}$), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ($0,39 \text{ g.L}^{-1}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($0,079 \text{ g.L}^{-1}$), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0,040 \text{ g.L}^{-1}$), ácido cítrico ($0,006 \text{ g.L}^{-1}$) e citrato férrico de amônio ($0,006 \text{ g.L}^{-1}$) (RIPPKA et al., 1979).

A concentração celular na fase exponencial para tomada do inóculo foi determinada gravimetricamente mediante filtração de volume conhecido de meio de cultura BG11 contendo as células do microrganismo em filtro Millipore de porosidade $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, previamente seco a 60°C por 24 h. Os filtros foram secos até peso constante e a biomassa quantificada.

2.2 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi o efluente do processamento do pescado, coletado no tanque de equalização do sistema de tratamento de efluente de uma empresa processadora de pescado do setor industrial da cidade de Rio Grande, RS, Brasil. As amostras foram transportadas em garrafas de polietileno para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande e então esterilizadas a $1,1 \text{ kgf.cm}^{-2}$ (120°C) por 15 minutos. O efluente foi caracterizado quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$), fósforo ($P-PO_4^{-3}$) e sólidos suspensos (SS). As análises foram realizadas segundo os procedimentos descritos em Standard Methods para análise de águas e efluentes (APHA, 2005).

2.3 Desenvolvimentos dos experimentos

Experimentos em duplicata na ausência de luz e temperaturas de 10°C , 20°C e 30°C , utilizando como meio de cultivo o efluente do processamento de pescado, foram conduzidos em reator de mistura completa com capacidade de 4,5 L em sistema descontínuo. O reator foi constituído de uma extensão cilíndrica de PVC com dimensões de 80 cm de altura e 10 cm de diâmetro, tendo sua parte inferior acoplada a um sistema para promover a aeração de 1 VVM e agitação do meio. O efluente foi ajustado a pH 7,6, razão C/N 20 e razão N/P 10, aferida com glicose, sulfato de amônio ou fosfato de potássio em função das concentrações de DQO, NTK e $P-PO_4^{-3}$ registradas no efluente, conforme indicado por Hornes & Queiroz

(2004). O sistema foi inoculado com em média 200 mg.L⁻¹ de células de *Aphanothece microscopica* Nägeli, obtida a partir de um volume equivalente ao requerido para obter esta concentração de cultura desenvolvida em meio BG11. Os experimentos foram conduzidos em câmara com controle de temperatura.

2.3.1 Obtenção dos dados de crescimento celular

Os experimentos nas diferentes temperaturas propostas foram monitorados mediante tomada de amostras a intervalos regulares, filtradas em filtro Millipore de 0,45 µm de porosidade e a biomassa determinada segundo o item 2.1.1.

2.4 Modelagem matemática e validação estatística

Os ajustes dos dados cinéticos foram avaliados mediante quatro modelos matemáticos (Logístico, Gompertz, Gompertz Modificado e Baranyi).

O modelo Logístico descreve o crescimento de uma população microbiana como uma função da densidade da população, tempo, taxa de crescimento e densidade final da população. A função Logística original, equação 1, foi desenvolvida por Pearl & Reed (1920), baseada nas considerações iniciais de Verhulst (1838):

$$y = \frac{A+C}{1 + e^{-B(t_r-M)}} \quad (1)$$

Onde: A = Logaritmo neperiano assintótico da concentração celular quando t decresce indefinidamente

B = Taxa de crescimento relativa no tempo M (h⁻¹)

C = Logaritmo neperiano assintótico da concentração celular quando t aumenta indefinidamente

M = Tempo em que a taxa de crescimento é máxima (h)

t_r = Tempo de residência (h)

y = ln (X_t/X₀)

Um grande número de funções tem sido derivada a partir do modelo clássico de Gompertz (1825). A expressão original é representada pela equação 2 na qual a fase de

adaptação da cultura não é considerada. A expressão de Gompertz foi re-parametrizada por Zwietering et al (1990) e pode ser representada pela equação 3.

$$y = A + Ce^{-\exp[B(t_r - M)]} \quad (2)$$

$$y = A \cdot e^{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A}(\Psi - t_r) + 1\right]} \quad (3)$$

Onde:

Ψ = Duração da fase lag (h^{-1})

$\mu_{\max}$ = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1})

O modelo de Baranyi (BARANYI, 1997) foi aplicado mediante a utilização das equações 4 e 5.

$$y = \mu_{\max} A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} \cdot A(t)} - 1}{e^A}\right) \quad (4)$$

Onde:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln\left(e^{-\mu_{\max} \cdot t_r} + e^{-\mu_{\max} \cdot \Psi} - e^{-\mu_{\max} \cdot (t_r + \Psi)}\right) \quad (5)$$

Os modelos foram resolvidos através de um procedimento iterativo usando o software Microsoft Excel[®] XP, determinando o valor mínimo da soma do quadrado do erro entre os valores empíricos e preditos.

Os índices de desempenho dos modelos foram calculados pelas expressões matemáticas e estatísticas apresentadas nas equações 6, 7, 8 e 9 (ROSS, 1996).

Raiz quadrada do erro médio (RMSE):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (obs - pred)^2}{n}} \quad (6)$$

Erro padrão de predição (%SEP):

$$\%SEP = \frac{100}{X_{(obs)}} \sqrt{\frac{\sum (obs - pred)^2}{n}} \quad (7)$$

Fator Bias (B_f):

$$B_f = 10^{\frac{\sum \log(pred/obs)}{n}} \quad (8)$$

Fator de acuracidade (A_f):

$$A_f = 10^{\frac{\sum |\log(pred/obs)|}{n}} \quad (9)$$

Onde: obs = são os valores observados dos parâmetros de crescimento

pred = são os valores preditos dos parâmetros de crescimento

x_{obs} = são as médias dos valores observados

n = número de observações

2.5 Otimização da produção de biomassa

A operação em batelada foi avaliada para todos os intervalos da fase exponencial de crescimento, testando-se todas as possibilidades de conduzir o processo em batelada até o final da fase log, fazendo com que o início da diluição coincidisse com um período de máxima concentração celular e crescimento exponencial o que segundo o gráfico da simulação fornece altos valores de produtividade em tal circunstância. Para o efeito de apresentação dos resultados foram estipulados na tabelas apenas os intervalos que coincidiram com os pontos de tomada experimental (6, 12, 18, 24 e 30 h) para 20°C e 30°C. A 10°C foi verificada uma fase lag, o que restringiu o período a ser simulado. Para as temperaturas de 20°C e 30°C a fase logarítmica de crescimento registrada foi de 6 h a 30 h de cultivo. No entanto, como o modelo Logístico fornece o perfil de crescimento celular a qualquer momento, pôde-se estimar a concentração celular em qualquer outro tempo de residência. As fases lag e log foram definidas pelo método gráfico ($\ln X \times t$) e pelos modelos matemáticos, que fornecem a duração da fase lag.

Em reatores contínuos, a operação pode iniciar através de um curto período em batelada destinado a aumentar a concentração celular antes da diluição. A duração deste

período preliminar descontínuo é um parâmetro determinante do desempenho do sistema. Assim, o modelo matemático previamente definido e o balanço de massa para o reator CSTR foram utilizados para determinar a otimização da produção de biomassa no processo contínuo, considerando diferentes tempos de residência para o início do processo contínuo. O balanço de material não estacionário para formação de biomassa em cultivo contínuo foi obtido mediante uso da equação 10 conforme proposto por Muller-Feuga et al. (2003).

$$X_t = X_0 e^{(\mu-D)t_r} \quad (10)$$

Onde: D = Taxa de diluição (h^{-1})

t_r = Tempo de residência (h)

X_0 = Concentração celular inicial (mg.L^{-1})

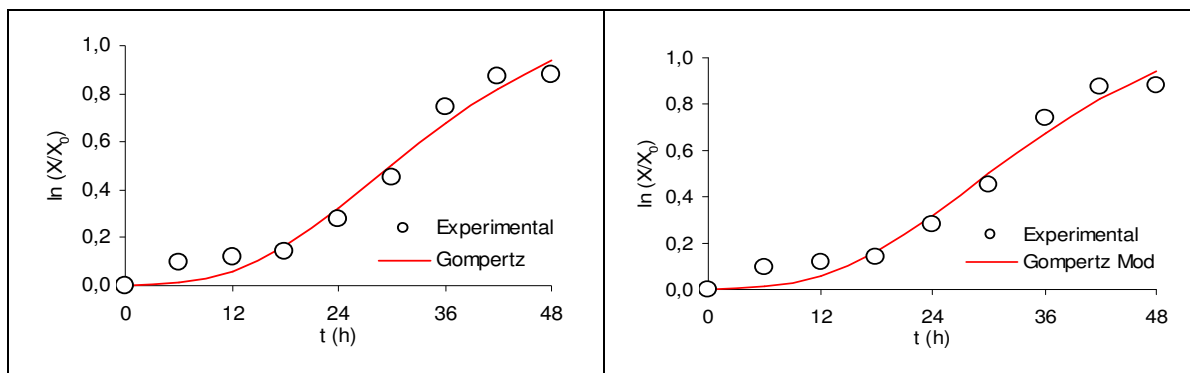
X_t = Concentração celular no tempo t (mg.L^{-1})

μ = Velocidade específica de crescimento (h^{-1})

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A modelagem matemática tem sido extensivamente usada para prever o crescimento microbiano através da estimativa da velocidade máxima específica de crescimento, máxima densidade celular e duração da fase de adaptação, que são importantes parâmetros de projeto da microbiologia industrial (ZWIETERING et al. 1990; BARANYI et al., 1993; BARANYI & ROBERTS, 1994; BARANYI, 1997).

As figuras 1, 2 e 3 apresentam o ajuste dos modelos matemáticos propostos para o cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente do processamento de pescado em diferentes condições de temperatura.



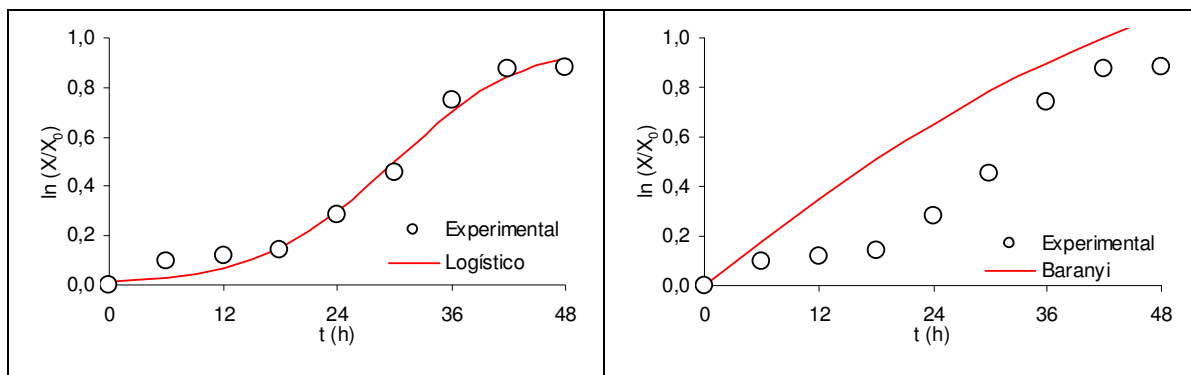


Figura 1: Ajuste dos modelos aos dados experimentais (10°C)

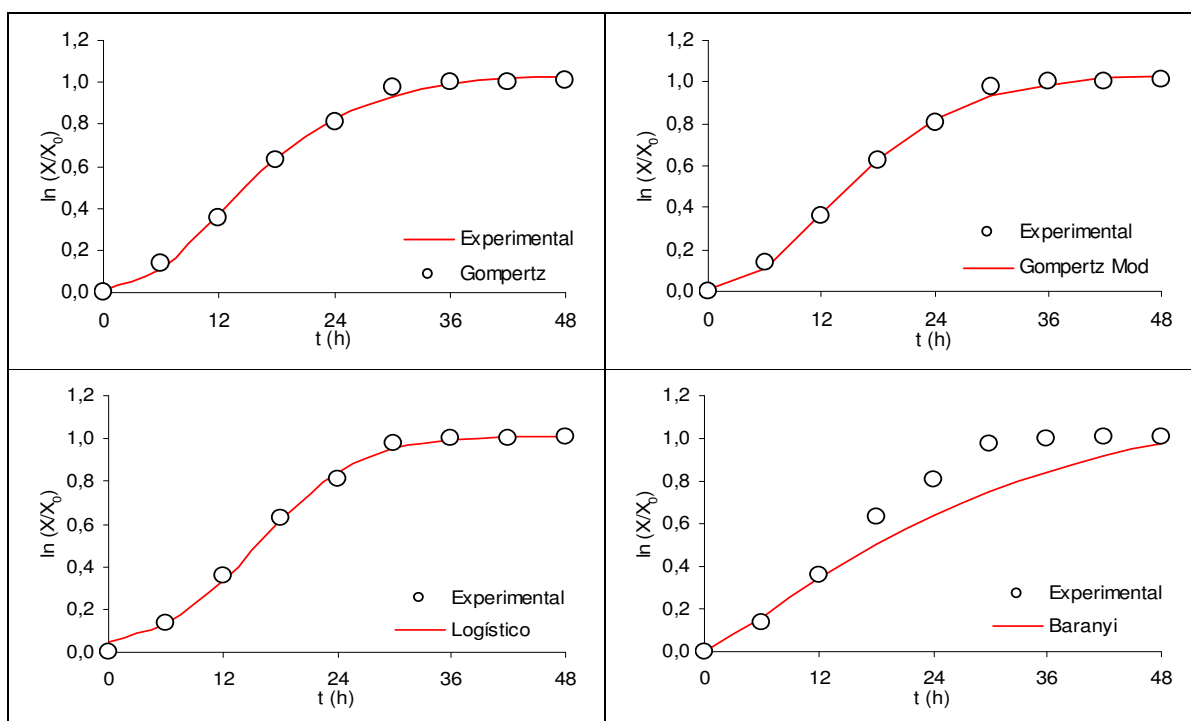
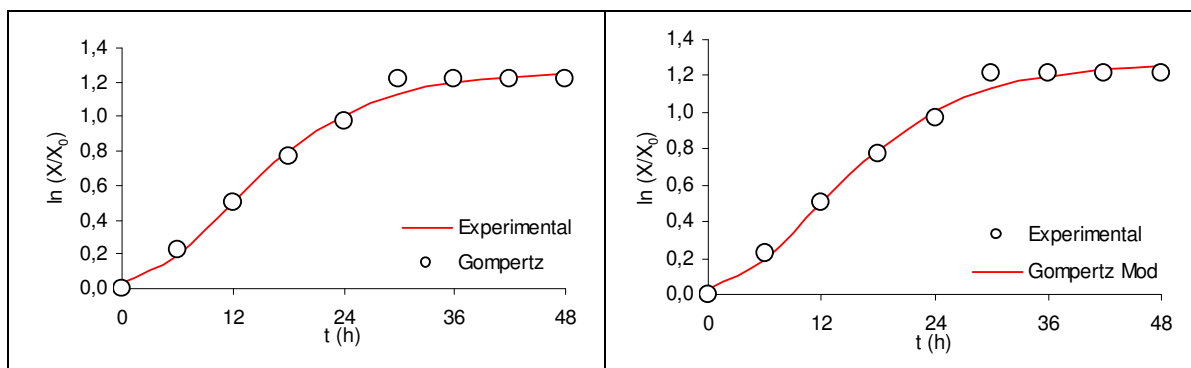


Figura 2: Ajuste dos modelos aos dados experimentais (20°C)



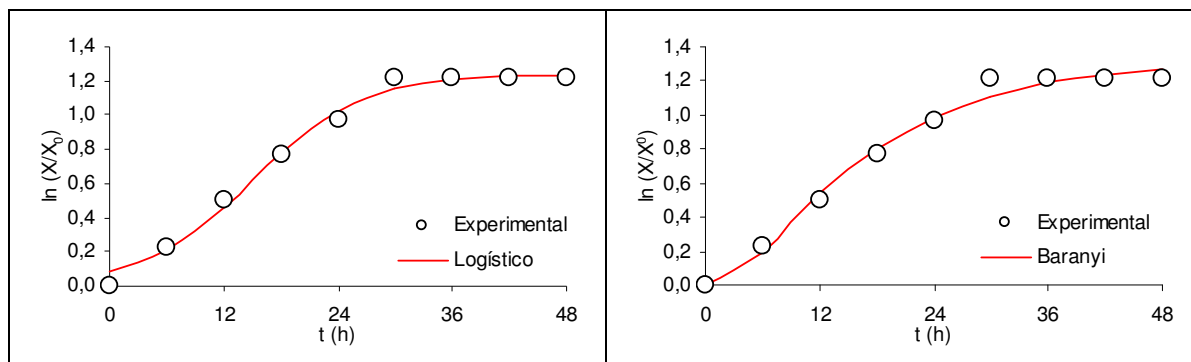


Figura 3: Ajuste dos modelos aos dados experimentais (30°C)

O comportamento gráfico demonstra que os modelos Logístico, Gompertz e Gompertz Modificado descrevem adequadamente o perfil de produção de biomassa nas condições consideradas, embora haja a necessidade da avaliação estatística antes da aplicação em termos práticos (DONG et al., 2007), o que pode ser verificado na tabela 1 para as três temperaturas estudadas. No entanto, exclui previamente o modelo de Baranyi como descriptor do crescimento *Aphanthece microscopica* Nägeli, principalmente nas condições de 10°C e 20°C. De fato, a literatura cita que não há diferença entre os modelos de Baranyi e Gompertz quando aplicados em culturas que se desenvolvem a altas taxas de crescimento (BARANYI et al., 1993).

De acordo com Bovill et al. (2000) a adaptação a uma mudança de temperatura ocorre praticamente no mesmo instante em que o microrganismo é inoculado em um determinado meio de cultivo, quando considerada a velocidade específica de crescimento. A exceção pode acontecer em casos extremos, em que a mudança de temperatura é abrupta e próxima do limite de crescimento. Uma vez que a manutenção e propagação das culturas de *Aphanthece* ocorreram a 30°C, e que após a separação do meio de cultivo padrão foram inoculadas no efluente a diferentes temperaturas, isso poderia explicar os índices de desempenho inferiores dos modelos a 10°C, independente do ajuste utilizado.

A relação entre $\ln(N)$ com o tempo segue um padrão sigmoidal que pode ser descrito utilizando diferentes funções de crescimento (LÓPEZ et al., 2004). Chowdhury, Chakraborty & Chaudhuri (2007) aplicaram as funções de Gompertz e Logístico para ajustar os dados de crescimento com um ajuste aceitável para os dois modelos, permitindo a estimação dos parâmetros de crescimento descritivos (velocidade de crescimento específica máxima e tempo de geração).

De acordo com McMeekin & Ross (2002) a equação de Gompertz não considera a fase lag, como é o caso de sua forma modificada, mas apenas o aumento da densidade de

células, uma vez iniciado o crescimento exponencial. Nesse sentido, a presença da fase lag no cultivo a 10°C pode contribuir para o baixo ajuste deste modelo aos valores experimentais em relação aos experimentos a 20°C e 30°C para o crescimento da cianobactéria *Aphanothece* no efluente do processamento de pescado.

A validação dos modelos para os diferentes tratamentos foi realizada através dos valores de RMSE, %SEP, A_f e B_f , conforme expresso na tabela 1. A raiz quadrada do erro médio (RMSE) indica a medida da concordância entre os dados experimentais e os resultados preditos pelo modelo. O melhor ajuste segundo este critério está relacionado a um reduzido valor da RMSE. Os menores valores foram observados para o modelo Logístico, porém iguais quando são consideradas as temperaturas de 20°C e 30°C e muito próximo para o crescimento a 10°C. Resultados similares foram encontrados por Juneja et al. (2007), os quais estudaram o crescimento de *Salmonella* em frangos em condições de temperatura que variaram de 10°C a 45°C. Os autores verificaram que a raiz quadrada do erro médio para os modelos Logístico e Gompertz modificado foram 0,0008 e 0,0009, respectivamente. Outros trabalhos descrevem a aplicação do modelo Logístico no crescimento em batelada de diferentes microrganismos e condições de cultivo diversas, em que se pode observar o ajuste adequado desta função aos valores experimentais (WACHENHEIM et al., 2003; TRAVIESO et al., 2006).

Tabela 1. Validação estatística dos modelos matemáticos para as três condições avaliadas

Parâmetro	Gompertz	Gompertz Modificado	Logístico	Baranyi
10°C				
RMSE	0,05	0,05	0,04	0,24
%SEP	13,36	13,36	9,84	60,66
Bf	0,76	0,76	0,85	1,73
Af	1,45	1,45	1,25	1,73
20°C				
RMSE	0,02	0,02	0,02	0,12
%SEP	3,04	3,04	3,49	18,33
Bf	0,99	0,99	1,00	0,90
Af	1,04	1,04	1,02	1,15
30°C				
RMSE	0,04	0,04	0,04	0,05
%SEP	4,52	4,52	5,16	5,55
Bf	0,99	0,99	0,99	0,99
Af	1,04	1,04	1,03	1,05

RMSE: raiz quadrada do erro médio; %SEP: erro padrão de predição; B_f: fator Biais; A_f: fator de acuracidade

O fator Bias (B_f) fornece uma indicação objetiva do desempenho do modelo. Ross (1996) sugere que um perfeito ajuste entre as observações e predições são representados por um B_f igual a 1. Valores afastados deste ponto indicam uma sistemática sobre ou subestimada dos valores observados. Fatores na faixa de 0,9-1,05 podem ser considerados bons, na faixa de 0,7-0,9 ou 1,06-1,15 são considerados aceitáveis e $<0,7$ ou $>1,15$ são considerados inaceitáveis. Novamente, o modelo Logístico foi o que apresentou melhor ajuste segundo este critério de validação. Os valores de 1,0 e 0,99 obtidos para os experimentos a 20°C e 30°C, respectivamente, indicam diferenças mínimas entre os valores observados e preditos pelo modelo, o que mostra que o modelo Logístico se ajusta perfeitamente aos dados obtidos. A 10°C o valor de $B_f = 0,85$ indica que os valores preditos são inferiores aos valores observados.

O fator de acuracidade (A_f) representa a diferença entre os valores médios observados e os valores preditos. A estimativa média tende a ser menos precisa com o aumento do valor de A_f , enquanto que um valor de 1,0 indica que há uma consistência perfeita entre todos os valores observados e preditos (LEBERT et al., 2000). O aumento deste parâmetro sugere uma reduzida confiabilidade entre o valor estimado e o valor real. Os valores apresentados pelo modelo Logístico indicam a qualidade do ajuste deste modelo.

López et al. (2004) observaram valores médios de $B_f = 1,104$ e $A_f = 1,53$ para o modelo Logístico aplicado ao crescimento de diferentes espécies de bactérias e fungos em diferentes condições de cultivo, a partir dos dados obtidos de 55 curvas utilizadas para a avaliação matemática. Em outro estudo conduzido por Chowdhury, Chakraborty & Chaudhuri (2007), foram observados valores muito próximos da unidade, B_f entre 0,995 e 1,072 para diferentes condições de pH (6,0, 6,5 e 7,0) e temperatura (37°C e 40°C), para o crescimento da bactéria *Pediococcus acidilactici* H na produção de bacteriocinas, demonstrando o ajuste e exatidão do modelo Logístico elaborado.

Finalmente, o erro padrão de predição (%SEP) confirma o baixo nível residual para o modelo Logístico. No presente trabalho o valor de SEP foi menor que 10%, independente da temperatura de cultivo, o que confirma a concordância entre os valores observados e preditos. Zurera-Cosano et al. (2006) avaliaram o crescimento da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* em condições aeróbicas e anaeróbicas, encontrando valores de SEP inferiores a 16% em ambas as condições. García-Gimeno et al. (2003) obtiveram valores entre 22% e 31% para a taxa específica de crescimento e tempo da fase lag, respectivamente, relativo ao crescimento da bactéria *Escherichia coli* O157:H7. Então, comparando os resultados obtidos nestes

estudos com os do presente trabalho, pode ser observado que o modelo Logístico produziu um melhor ajuste entre os dados experimentais e os valores estimados.

De acordo com Peleg et al. (2007), a maior deficiência da utilização da equação Logística como um modelo de crescimento microbiológico ocorre para descrever crescimentos com longas fases de adaptação, estando de acordo com os dados da tabela 1, em que o experimento a 10°C apresentou os piores ajustes, considerando os fatores A_f , B_f , %SEP e RMSE.

Desta forma, a análise estatística demonstrou que o modelo Logístico foi a expressão mais adequada para descrever o crescimento da *Aphanothece* no efluente do processamento de pescado nas condições testadas, podendo ser considerado estatisticamente adequado e robusto para prever o crescimento desta cianobactéria.

Na tabela 2 estão registrados os valores cinéticos de crescimento obtidos segundo o modelo Logístico. Observa-se o aumento da velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) e da concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$) com o aumento da temperatura, além da diminuição da fase lag. Vários autores citam o efeito da temperatura e utilização de faixas ideais no crescimento microbiológico (WEISSMAN et al., 1998; THÉBAULT & RABOUILLE, 2003). Segundo Zurera-Cosano et al. (2006) o acréscimo na temperatura resulta em decréscimo do estágio de adaptação. Por outro lado, a redução da temperatura resulta na diminuição das taxas de reações enzimáticas e produção de energia, que afeta a assimilação dos nutrientes através da membrana plasmática (SAKAMOTO et al., 1998), refletindo-se na redução da velocidade de crescimento e conseqüentemente na diminuição da concentração celular.

Considerando que as culturas são propagadas em meio padrão BG11 a 30°C, os resultados demonstram a capacidade de aclimação a diferentes temperaturas, uma vez que mesmo a 10°C e 20°C a cianobactéria *Aphanothece* foi capaz de se desenvolver, porém com o aumento da fase lag. De acordo com Thébault & Rabouille (2003) a temperatura influencia a taxa específica de crescimento, reduzindo-a sensivelmente quando são utilizados valores muito menores do que a faixa ótima. Isso se justifica, uma vez que as mudanças abruptas de temperaturas acarretam no aumento da fase de adaptação, e que no desenvolvimento a baixas temperaturas as células requerem energia adicional para estabelecer a aclimação fisiológica (SAKAMOTO et al., 1998; WEISSMAN et al., 1998; THÉBAULT & RABOUILLE, 2003).

Tabela 2 Parâmetros de crescimento obtidos para as diferentes condições de cultivo a partir do modelo Logístico

Temperatura (°C)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	ψ (h)	$X_{\max}$ (g.L ⁻¹)
10	0,036	16	501,5
20	0,049	5,2	550,5
30	0,055	3,7	685,3

ψ : duração da fase lag

Após a determinação do melhor modelo matemático para prever a produção de biomassa e os parâmetros de crescimento, simulações foram realizadas para avaliar a operação contínua dos reatores. Os quimiostatos são um sistema particular de sistemas biológicos que apresentam aplicações experimentais e industriais. Nestes reatores um dos mais importantes parâmetros operacionais é o período inicial conduzido descontinuamente. Assim, para considerar a melhor duração do período em batelada preliminar, usado com o propósito de elevar a concentração celular, o modelo Logístico previamente definido foi usado para prever o crescimento celular e a equação 10 para descrever a produção de biomassa em operação (MULLER-FEUGA et al., 2003).

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados simulados para a estimativa da produção de biomassa por *Aphanethece* cultivada a 10°C, 20°C e 30°C para sistema em operação contínua tomando como base a predição do crescimento celular, segundo o modelo Logístico (tabela 2) e o balanço de material para formação de biomassa expresso na equação 10. A concentração celular foi predita em função da taxa de diluição, do período total de operação (PTO) e do período de operação em batelada (POB). O propósito deste estudo é avaliar a magnitude do ganho de produtividade em biomassa em função destes parâmetros.

As simulações foram realizadas considerando uma taxa de diluição de $D = 0,85\mu_{\max}$ e diferentes períodos de operação em batelada, correspondentes ao intervalo de crescimento logarítmico do microrganismo, para cada condição de temperatura avaliada. Este período foi determinado corroborando os dados obtidos entre o modelo Logístico e a determinação gráfica de $\mu_{\max}$.

Tabela 3. Resultados da predição em 1000 h de operação contínua (10°C)

POB (h)	POB/PTO (%)	Biomassa (kg.L ⁻¹)	Aumento de biomassa (%)
18	37,5	0,048	0,0
24	50	0,056	15,7
30	62,5	0,069	41,7

POB: período de operação em batelada; PTO: período total de operação

Tabela 4. Resultados da predição em 1000 h de operação contínua (20°C)

POB (h)	POB/PTO (%)	Biomassa (kg.L ⁻¹)	Aumento de biomassa (%)
6	12,5	0,350	0
12	25	0,427	22,1
18	37,5	0,568	62,3
24	50	0,711	103
30	62,5	0,790	126

POB: período de operação em batelada; PTO: período total de operação

Tabela 5. Resultados da predição em 1000 h de operação contínua (30°C)

POB (h)	POB/PTO (%)	Biomassa (kg.L ⁻¹)	Aumento de biomassa (%)
6	12,5	0,92	0
12	25	1,19	28,4
18	37,5	1,64	77,2
24	50	2,11	127
30	62,5	2,39	158

POB: período de operação em batelada; PTO: período total de operação

A influência representativa do POB para a temperatura de 30°C é apresentada na figura 4. O gráfico mostra as concentrações teóricas para o cultivo em sistema contínuo, os quais diferem somente no intervalo entre a inoculação e o início da diluição. Podem ser verificadas concentrações maiores no início da diluição com o aumento do tempo de batelada. Esse padrão segue ao longo do tempo de residência, com o aumento da produção de biomassa em função do aumento do período de operação em batelada. Este mesmo comportamento não foi verificado no trabalho desenvolvido por Muller-Feuga et al. (2003) para a otimização do cultivo de *Porphyridium cruentum* em fotobioreator. Os autores verificaram uma relação antagônica entre o intervalo da inoculação e início da diluição com a produção celular, com uma produção dinâmica somente no início da diluição, sendo esta reduzida quando o cultivo atinge o regime contínuo.

Assim, estimando um PTO de 1000 h, é possível predizer a magnitude da produtividade em biomassa (tabelas 3, 4 e 5), para as temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C, respectivamente. Esta estimativa teórica demonstra a possibilidade de obter um aumento de 41,7%, 126% e 158% na produção de biomassa, iniciando o processo contínuo no final da fase logarítmica de crescimento. Para todos os casos, o POB representa 62,5% do PTO (tabelas 1, 2 e 3), em virtude da estabilidade celular.

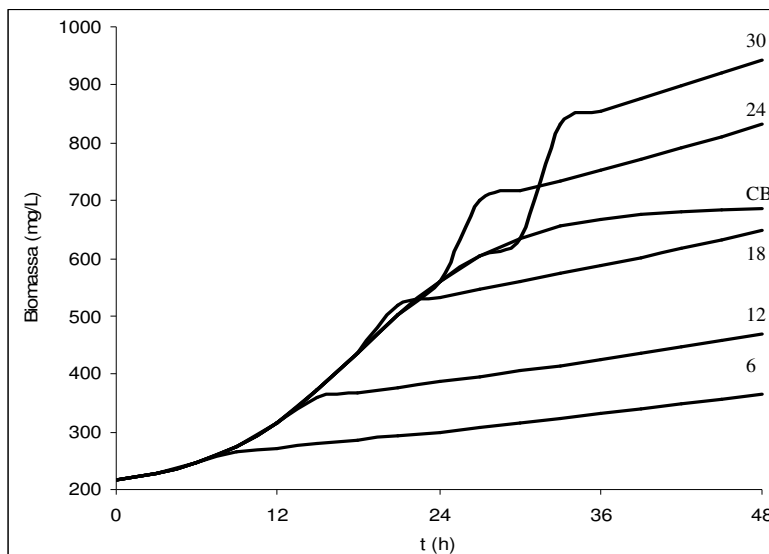


Figura 4. Diagrama representativo da influência teórica do período de operação em batelada na produção de biomassa para a temperatura de 30°C (CB):cultivo em batelada

A utilização de baixas temperaturas está relacionada com a redução da atividade enzimática (CONVERTI & DOMINGUEZ, 2001). Contudo, temperaturas elevadas podem causar a inativação das enzimas do caminho metabólico enquanto que temperaturas baixas podem não permitir o fluxo de nutrientes através da membrana celular, resultando em alta demanda para a energia de manutenção, o que se reflete na redução dos componentes celulares (LEHNINGER, 1991; VON SPERLING, 1997; CONVERTI & DOMINGUEZ, 2001). Isto pode ser corroborado pelos dados da tabela 6, em que o aumento da temperatura de cultivo de 10°C para 30°C resultou na produtividade de proteína de 0,828 kg.m⁻³.d⁻¹ para 36,59 kg.m⁻³.d⁻¹. Mesmo para os componentes que apresentam uma relação inversa com a temperatura, como os lipídios e carboidratos (HORNES & QUEIROZ, 2008a), pode ser observado um aumento substancial nas temperaturas mais elevadas, devido a maior produção de biomassa nestas condições.

O consumo diário de proteína recomendada para uma pessoa de 70 kg é de 96,6 g proteína.d⁻¹ (SCRIMSHAW, 1977, In: TACON et al., 2006), considerando que a biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli contém 38,7% de proteína (HORNES & QUEIROZ, 2008b), o consumo de 250 g de biomassa poderia suprir o requerimento diário deste componente de uma pessoa adulta. A fabricação de produtos contendo biomassa da cianobactéria *A. microscopica* Nägeli poderia contribuir na dieta alimentar de consumidores de baixa renda através da inclusão de tais produtos em programas do governo, refletindo-se no

aspecto sócio-econômico do país. Considerando ainda uma produção $0,70 \text{ t.d}^{-1}$, aproximadamente 2810 pessoas seriam assistidas pela produção desse microrganismo. Nesse sentido, os resultados indicam que a produção de produtos ricos em proteína tais como os suplementados por biomassa de cianobactéria poderiam ter um significativo impacto na segurança alimentar e, conseqüentemente, na redução da pobreza.

Tabela 6. Estimativa de produção de compostos celulares em função da temperatura tomando com base a biomassa obtida por simulação

Produtividade	10°C	20°C	30°C
proteína ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	0,828	9,95	36,59
lipídios ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	0,253	2,62	4,07
carboidratos ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	0,483	5,14	8,09
cinzas ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	0,094	1,23	8,49
clorofila <i>a</i> ($\text{g.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	1,05	15,54	64,81
ficocianina ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	0,088	1,35	4,73

4 CONCLUSÃO

O modelo Logístico foi considerado suficientemente robusto para descrever o crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da indústria da pesca, na faixa de temperatura testada, conforme evidenciado pela análise gráfica e critérios estatísticos.

O método proposto pode ser usado no auxílio da transposição do processo em batelada para contínuo. As simulações indicam a possibilidade de obter $1,66 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, $18,96 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e $57,36 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ de biomassa conduzindo o processo em temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C, respectivamente.

5 REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2005), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. Washington.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A.; MCCLURE, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, v. 10, p. 43–59.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, p. 277–294.

BARANYI, J. (1997). Simple is good as long as it is enough. *Food Microbiology*, v. 14, p. 189–192.

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

BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. (2000). Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*, v. 59, p. 157–165.

CALDWELL, D.H. (1946). Sewage oxidation ponds: performance, operation and design. *Sewage Works International*, v. 18, p. 433–458.

CHOWDHURY, B.R.; CHAKRABORTY, R.; CHAUDHURI, U.R. (2007). Validity of modified Gompertz and Logistic models in predicting cell growth of *Pediococcus acidilactici* H during the production of bacteriocin pediocin AcH. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 1171–1175.

CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J.M. (2001). Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 75, p. 39–45.

DONG, Q., TU, K., GUO, L., LI, H., ZHAO, Y. (2007). Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions. *Food Microbiology*, 24, 624–632.

GARCÍA-GIMENO, R.M.; HERVÁS-MARTÍNEZ, C.; BARCO-ALCALÁ, E.; ZURERA-COSANO, G.; SANZ-TAPIA, E. (2003). An artificial neural network approach to *Escherichia coli* O157-H7 growth estimation. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 639–645.

GOMPERTZ, B. (1825). On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 115, p. 513–585.

GRIMA, E.M.; BELARBI, E.H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; ROBLES, M.A.; CHISTI, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 491–515.

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

HORNES, M.I.; QUEIROZ, M.I. Efeito da temperatura na composição química, clorofila *a* e ficocianina da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da indústria processadora de pescado. In: Valoração do efluente da indústria processadora de

pescado por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Furg, Rio Grande, 2008a. 29 p.

HORNES, M.I.; QUEIROZ, M.I. Influência da temperatura e do meio de cultivo em compostos nitrogenados na cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. In: Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Furg, Rio Grande, 2008b. 26 p.

JUNEJA, V.K.; MELENDRES, M.V.; HUANG, L.; GUMUDAVELLI, V.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H. (2007). Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Microbiology*, v. 24, p. 328-335.

LEBERT, I.; ROBLES-OLVERA, V.; LEBERT, A. (2000). Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 27-39.

LEHNINGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1991. 725p.

LÓPEZ, S.; PRIETO, M.; DIJKSTRA, J.; DHANOA, M.S.; FRANCE, J. (2004). Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology*, v. 96, p. 289-300.

McMEEKIN, T.A.; ROSS, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, v. 78, p. 133-153.

MULLER-FEUGA, A., GUEDES, R., PRUVOST, J. (2003). Benefits and limitations of modeling for optimization of *Porphyridium cruentum* cultures in an annular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, v. 103, p. 153-163.

OSWALD, W.J., GOTAAS, H.B. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.* v. 122, p. 73-105.

PEARL, R.; REED, L.J. (1920). On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 6, p. 275-288.

PELEG, M.; CORRADINI, M.G.; NORMAND, M.D. (2007). The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Research International*, v. 40, p. 808-818.

PHUA, S.T.G.; DAVEY, K.R. (2007). Predictive modeling of high pressure (<700MPa)-cold pasteurization (<25°C) of *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in three liquid foods. *Chemical Engineering and Processing*, v. 46, p. 458-464.

PRAT, L.; WONGKITTIPONG, G.; ANGELOV, G.; GOURDON, C.; DAMRONGLERD, S. (2006). Fast batch to continuous transposition: application to the extraction of andrographolide from plants. *Chemical Engineering Technology*, v. 29, p. 401-407.

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

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. (2007). 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.

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

ROSS, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 81, p. 501-508.

SAKAMOTO, T.; SHEN, G.; HIGASHI, S.; MURATA, N.; BRYANT, D.A. (1998). Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. *Archives of Microbiology*, v. 169, p. 20-28.

THEBAULT, J.M. ; RABOUILLE, S. (2003). Comparison between two mathematical formulations of the phytoplankton specific growth rate as a function of light and temperature, in two simulation models (Aster & Yoyo). *Ecological Modelling*, v. 163, p. 145-151.

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

VERHULST, P. (1838). Notice sur la population suit dans son accroissement. Correspondent Mathematic Physical, v. 10, p. 113-121.

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

VON SPERLING, M. *Lagoas de estabilização. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, v. 3, 1997.

WACHENHEIM, D.E.; PATTERSON, J.A.; LADISCH, M.R. (2003). Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 157-164.

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

ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. (2008). Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1311-1316.

ZURERA-COSANO, G.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, R.; HERVAS-MARTÍNEZ, C. (2006). Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. *Food Control*, v. 17, p. 429-438.

ZWIETERING, M.H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN'T RIET, K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environment Microbiology*, v. 56, p. 1875-1881.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

A análise dos resultados demonstrou o potencial da utilização da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli na remoção de nutrientes no efluente do processamento de pescado, assim como a produção de compostos celulares de interesse comercial.

Os estudos quanto às frações nitrogenadas presentes na biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente do processamento de pescado e no meio padrão BG11 mostraram que o íon amônio juntamente com os ácidos nucleicos representam uma importante fração do nitrogênio não protéico presente na biomassa da cianobactéria. Ficou demonstrada ainda a influência do meio de cultivo na concentração de nitrogênio, bem como que a determinação de proteína pelo método de Kjeldahl superestima a concentração protéica em cianobactérias.

No que se refere à aplicação de coagulantes verificou-se maior eficácia do FeCl_3 em relação ao $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ como coagulante. O processo de lavagem da biomassa após tratamento com coagulante resultou em importante remoção do FeCl_3 residual, ficando demonstrada a possibilidade de separação da biomassa pelo uso de coagulantes.

O crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli no efluente da indústria da pesca em diferentes temperaturas pôde ser descrito pela modelagem matemática. O método proposto pode ser usado no auxílio da transposição do processo em batelada para contínuo.