

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**CRESCIMENTO DE *Rubrivivax gelatinosus* EM
EFLUENTE INDUSTRIAL DE ABATE E
PROCESSAMENTO DE TILÁPIAS**

Leandro Kanamaru Franco de Lima

Médico Veterinário

Araçatuba – SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**CRESCIMENTO DE *Rubrivivax gelatinosus* EM
EFLUENTE INDUSTRIAL DE ABATE E
PROCESSAMENTO DE TILÁPIAS**

Leandro Kanamaru Franco de Lima

Orientador: Profa. Dra Elisa Helena Giglio Ponsano

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba – SP

2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LEANDRO KANAMARU FRANCO DE LIMA - nascido em 23 de março de 1983 no município de São Paulo – SP. Coursou o ensino fundamental no Colégio São Judas Tadeu e o ensino médio no Colégio Anglo do município de Araçatuba – SP. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba – SP da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – FOA/UNESP em 2002 e formou-se no ano de 2006. Durante a graduação, foi membro suplente da representação discente no conselho do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, no período de 22/09/2002 a 21/09/2003. Foi bolsista Tortuga Cia. Zootécnica Agrária no convênio Fundunesp-Tortuga no período de 01/07/2004 a 30/06/2005. Realizou estágios de iniciação científica em Zootecnia I e II, Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais e Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Em 2007 iniciou o curso de pós-graduação em Ciência Animal na FOA/UNESP, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal. Atualmente, é bolsista FUNEP e atua como organizador do I Curso de Especialização em Gestão de Sistemas de Produção Animal na FOA/UNESP sob orientação do Prof. Dr. Marcos Franke Pinto, co-ordenador do curso.

DEDICATÓRIA

Deus,

*Meus pais José e Elena, minha irmã Milena,
minhas tias Juliana e Mitiko e minha
namorada Silmara, pelo apoio incondicional
e pelo respeito aos meus ideais e às minhas
conquistas.*

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo Nº 07/54732-1) pelo auxílio financeiro dado a esse projeto de dissertação de mestrado.

Indústria Tilápia do Brasil S/A por acreditar no nosso trabalho e nos fornecer a matéria prima utilizada nesse projeto de dissertação de mestrado. Em especial aos médicos veterinários Luis e Fábio.

Sanear – Saneamento de Araçatuba S/A pelo apoio e auxílio nas análises laboratoriais realizadas no efluente industrial. Em especial ao diretor da Sanear, Reinaldo Murakami e ao técnico do laboratório, Ricardo Fernandes.

Laboratório Instituto Adolfo Lutz – Araçatuba-SP pelo apoio e auxílio nas análises laboratoriais realizadas no efluente industrial. Em especial à Cidinha.

CETESB – Marília-SP pelo apoio e auxílio nas análises laboratoriais realizadas no efluente industrial.

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Curso de Medicina Veterinária. Em especial aos professores Dra. Márcia Marinho, Dra. Gisele Fabrino Machado, pela contribuição prestada no Exame Geral de Qualificação, e Dra Sílvia Helena Venturoli Perri pelo auxílio na análise estatística.

Biblioteca – UNESP – Araçatuba-SP. Em especial Fátima e Alexandra, sempre nos atendendo com carinho e profissionalismo e à Isabel pela revisão dos dados bibliográficos e pelas orientações técnicas.

Laboratório de Análises de Alimentos – UNESP – Araçatuba-SP. Em especial ao funcionário Alexandre Teixeira quem muito contribuiu para a minha prática laboratorial e ao desenvolvimento desse projeto.

Pós-graduandos: Karline, Sheila, Ane, Edson e Diego pelo companheirismo e apoio.

Estagiários: Saulo, Dênys, Rubens, Hilka, Monisa, Rafael e Fernanda pela ajuda durante a execução desse projeto.

Amigos: Alex Nakamura, Fábio Ishida, Márcio Tsugao e Shiguelo Yoshida, por representarem a verdadeira amizade.

Agradecimento especial:

Profa. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano, pela incomparável orientação e pelo exemplo de responsabilidade e profissionalismo.

Prof. Dr. Marcos Franke Pinto, pessoa quem guardo profunda admiração para seguir meus passos dentro da vida acadêmica.

SUMÁRIO

	Pág.
SUMÁRIO.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE FOTOS.....	
RESUMO.....	
SUMARY.....	
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Tilapicultura	15
2.2 Os resíduos industriais	16
2.3 Efluente da indústria de pescado.....	18
2.4 Desenvolvimento sustentável e biotecnologia.....	20
2.5 Bactérias fotossintetizantes.....	23

2.6 Bactéria fotossintetizante <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	25
2.7 Potencial biotecnológico de <i>Rubrivivax gelatinosus</i> : Tratamento de efluentes industriais.....	27
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 2 – Artigo Científico.....	40
1 Introdução.....	43
2 Material e método.....	46
3 Resultado e discussão.....	51
4 Conclusão.....	62
5 Referências.....	63
6 Tabelas e figuras.....	72
CAPÍTULO 3 – Artigo Científico.....	77
1 Introdução.....	80
2 Material e método.....	83
3 Resultado e discussão.....	87
4 Conclusão.....	92
5 Referências.....	92

6 Tabelas e figuras.....	99
APÊNDICE.....	103
ANEXO - Normas para o envio de artigo à revista Bioresource Technology.....	110

LISTA DE FIGURAS

Pág

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Evolução da concentração de massa celular seca e da absorvância durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial..... 74
- Figura 2 - Evolução dos valores de pH durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial..... 74
- Figura 3 - Evolução da concentração de nitrogênio total durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial..... 75
- Figura 4 - Evolução da concentração de óleos e graxas durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial..... 75
- Figura 5 - Porcentagens de redução da DQO durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial..... 76

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Sistema de microfiltração tangencial utilizado para a obtenção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* cultivada em efluente industrial..... 101

Figura 2 - Diagrama de cor do espaço LCh	102
--	-----

LISTA DE TABELAS

Pág.

CAPÍTULO 1

Tabela 1 -	Principais características taxonômicas dos diferentes gêneros das bactérias púrpuras fotossintetizantes	24
Tabela 2 -	Composição média de aminoácidos essenciais da biomassa de diferentes cepas de <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	27

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Características físicas e químicas do efluente da indústria de processamento de pescado.....	72
Tabela 2 -	Características microbiológicas do efluente da indústria de processamento de pescado.....	73

CAPÍTULO 3

Tabela 1 -	Produtividade e porcentagem da redução da carga poluente do efluente industrial utilizado como substrato para o crescimento de <i>Rubrivivax gelatinosus</i> em dois cultivos, com e sem a utilização da etapa de centrifugação no processo de obtenção de biomassa...	99
Tabela 2 -	Atributos de cor (<i>L</i> , luminosidade; <i>C</i> , saturação; <i>h</i> , tom) para a biomassa de <i>Rubrivivax gelatinosus</i> dos	

processos A e B e um produto pigmentante sintético
comercial.....

100

LISTA DE FOTOS

	Pág
FOTO 1 - Local e condição das coletas das amostras do efluente. A – tela de proteção sobre a calha de saída do resíduo da indústria de processamento de tilápia. B – detalhe do gradeamento na calha de saída do efluente para a separação dos sólidos grosseiros. C – procedimento de coleta do efluente diretamente na calha de saída. D – determinação da temperatura do efluente pelo termômetro de luz infravermelho.....	103
FOTO 2 - <i>Rubrivivax gelatinosus</i> reativado e conservado em meio de Pfennig semi-sólido como cultura de estoque.....	104
FOTO 3 - Preparo do inóculo de <i>Rubrivivax gelatinosus</i>. A – meio de Pfennig líquido contendo o micro-organismo sem crescimento. B – Inóculo de <i>Rubrivivax gelatinosus</i> em meio de Pfennig líquido.....	105
FOTO 4 - Provetas de vidro utilizadas para a determinação das curvas de crescimento, contendo o efluente de indústria de processamento de tilápias inoculado com o micro-organismo <i>Rubrivivax gelatinosus</i>. A – dia zero de cultivo. B – segundo dia do cultivo.....	106
FOTO 5 - Reatores utilizados para a determinação da produtividade do processo de obtenção de biomassa em escala semi-industrial. A – reatores sem efluente demonstrando a	

iluminação interna fornecida por lâmpadas incandescentes de 60 W. B – reatores contendo o efluente industrial inoculado com *Rubrivivax gelatinosus* no dia zero. C – reatores no décimo dia de cultivo e com o crescimento do micro-organismo evidenciado pela mudança da cor. D – visualização da parte superior dos reatores..... 107

FOTO 6 - Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* proveniente do cultivo nos reatores. A – biomassa após a etapa de microfiltração e centrifugação. B – liofilização da biomassa. C – biomassa pulverizada manualmente em almofariz após a fase de liofilização. D – biomassa embalada a vácuo..... 108

FOTO 7 - Amostras do efluente em diferentes condições. 1 – efluente com a bactéria *Rubrivivax gelatinosus*. 2 – efluente descartado após a etapa de microfiltração. 3 – efluente descartado após a etapa de centrifugação..... 109

CRESCIMENTO DE *Rubrivivax gelatinosus* EM EFLUENTE INDUSTRIAL DE ABATE E PROCESSAMENTO DE TILÁPIAS

RESUMO – Uma das aplicações da biotecnologia em prol do desenvolvimento sustentado reside na utilização de subprodutos industriais poluentes como substratos para a produção de substâncias de interesse econômico por meio de micro-organismos. *Rubrivivax gelatinosus* foi cultivada em efluente de indústria de processamento de tilápias com o objetivo de se estudar os parâmetros indicativos de seu crescimento, produção de massa celular e capacidade despoluente e gerar dados para comparar a produtividade alcançada, utilizando-se duas tecnologias de recuperação da biomassa. Inicialmente, o efluente foi submetido à caracterização físico-química e microbiológica, seguido de filtração e tratamento térmico. Cultivos da bactéria realizados no efluente tratado durante 15 dias, sob anaerobiose, $32 \pm 2^\circ\text{C}$ e 1.400 ± 200 lux, utilizando-se inóculo em nível de 1% (v/v) e pH ajustado para 7,0, mostraram que a produção de massa celular ($0,273 \text{ g L}^{-1}$) e a taxa de crescimento específico ($0,188 \text{ h}^{-1}$) foram maiores com 72 e 48 horas de cultivo, respectivamente. Ao final do processo, o pH elevou-se para 8,2 e houve reduções de 28,72%, 38,01% e 42,75% nas concentrações de nitrogênio total e óleos e graxas e na DQO, respectivamente. Posteriormente, o cultivo foi realizado sob anaerobiose, $30 \pm 5^\circ\text{C}$ e 2.000 ± 500 lux, utilizando-se inóculo de 1% (v/v) e pH de 7,0 durante 10 dias, e a recuperação da biomassa foi realizada por meio de centrifugação (processo A) e microfiltração (processo B). A produtividade e a redução da DQO foram, respectivamente, $0,043 \text{ g biomassa L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e 52,51% em A e $0,079 \text{ g biomassa L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e 81,25% em B. O efluente utilizado mostrou-se adequado para o crescimento da bactéria, permitiu a produção de massa celular e reduziu a carga poluente. A microfiltração tangencial foi a melhor metodologia para a obtenção da biomassa e redução da DQO.

Palavras-Chave: Biomassa, Biotecnologia, Bactéria, Indústria pesqueira, Efluentes industriais.

GROWTH OF *Rubrivivax gelatinosus* IN INDUSTRIAL WASTEWATER FROM TILAPIA FISH PROCESSING

SUMMARY – One application of biotechnology that contributes to sustainable development is the utilization of industrial byproducts as substrates for the production of substances by microorganism. Phototropic bacteria *Rubrivivax gelatinosus* was grown in wastewater from tilapia fish slaughter and processing industry for the assessment of growth parameters, cell mass production and organic matter utilization and to provide data for the comparison of productivity rates through the utilization of two different technologies for the biomass recovery. Initially, the effluent was characterized by physical, chemical and microbiological methods and, after that, it was filtered and heat treated in order to support the bacterial growth. Cultivation was carried out under anaerobiosis, $32 \pm 2^\circ\text{C}$ and 1.400 ± 200 lux with an inoculum level at 1% and pH adjustment to 7.0 during 15 days. The results showed that the highest cell mass production (0.273 g L^{-1}) and the highest specific growth rate (0.188 h^{-1}) were accomplished with 72 and 48 hours, respectively. At the end of the cultivation, pH increased to 8.2, total nitrogen was reduced in 28.72%, oil and grease were reduced in 38.01% and COD decreased 42.75%. Subsequently, the bacterial cultivation was carried out under anaerobiosis, $30 \pm 5^\circ\text{C}$ and 2.000 ± 500 lux with an inoculum level at 1% and pH adjustment to 7.0 during 10 days and the biomass recuperation was performed by means of centrifugation (process A) and microfiltration (process B). Productivity and COD decrease were $0.043 \text{ g biomass L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and 52.51% in process A and $0.079 \text{ g biomass L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and 81.25% in process B, respectively. The effluent used in this work was considered to be suitable for the growth of the phototropic bacteria allowing biomass production and pollutant load decrease. The cross-flow microfiltration was the best method for obtaining *Rubrivivax gelatinosus* biomass with higher reduction of organic composition in the industrial effluent.

Keywords: Biomass, Biotechnology, Bacteria, Fishing industry effluents, Industrial effluents.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Antigamente, os poucos efluentes industriais produzidos eram simplesmente jogados nos cursos d'água, onde a depuração se processava por vias naturais, ou seja, um grande volume de água limpa e oxigenada diluía a pouca carga de resíduos industriais e os micro-organismos existentes nos cursos d'água se encarregavam de realizar sua degradação. Com o contínuo desenvolvimento industrial verificado em vários setores, atualmente, um grande volume de efluentes é gerado, o que obriga as indústrias a procurarem por soluções de remediação viáveis e factíveis para evitar danos ambientais, penalidades legais e prejuízos à sua imagem (DARLINGTON et al., 2009; PEREIRA, 2002).

Nesse sentido, diversas formas de tratamento de efluentes industriais têm surgido, sendo que, em algumas delas, novos produtos com diferentes aplicações podem ser obtidos, possibilitando que os gastos despendidos no desenvolvimento e na aplicação de novas tecnologias revertam em novas receitas para a própria indústria geradora. Tratar um resíduo industrial significa transformá-lo de maneira que se possa reutilizá-lo, ou dispô-lo em condições mais seguras e ambientalmente aceitáveis pela legislação (SOUZA; SILVA 2009).

Micro-organismos fotossintetizantes executam importante função de purificação do resíduo industrial líquido. São capazes de utilizar efluentes industriais como substrato para seu crescimento, realizando uma depuração e o consequente tratamento biológico. O ponto importante dessa atividade é que o processo não requer equipamentos complexos e os efluentes industriais não possuem custo adicional de produção. São gerados pela própria indústria durante o beneficiamento da matéria prima. Além disso, a biomassa obtida do processo é rica em proteínas (apresenta excelente composição de aminoácidos essenciais) e possui capacidade pigmentante pela presença de pigmentos carotenoides. Dessa forma, o produto oriundo do tratamento biológico por bactérias fotossintetizantes pode encontrar diferentes formas de aplicação

como, por exemplos, biofertilizantes e aditivos na suplementação de ração animal (GHETA et al., 1998; IZU et al., 2001; KANTACHOTE et al., 2005; PONSANO et al., 2003; PRASERTSAN et al., 1993a; b; ZHENG et al., 2005a; b).

Conhecer e estabelecer as particularidades do crescimento de determinadas espécies de bactérias em efluentes industriais torna-se importante para esses processos biotecnológicos e muitos estudos devem ser conduzidos para transpor essas atividades do nível laboratorial para o industrial. Dessa forma, este projeto de dissertação de mestrado se apóia na vertente de trabalhos empenhados no favorecimento da evolução e do desenvolvimento do setor industrial, mas, principalmente, com respeito ao meio ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TILAPICULTURA

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie exótica nativa do continente africano e da Ásia Menor. Passou a ser a espécie de peixe mais cultivada no Brasil a partir do ano de 2002. No ano de 2004, a sua produção representou cerca de 26% do total produzido pela aquicultura continental nacional (BOSCARDIN, 2008) e, no ano seguinte, sua produção registrou 38%, ou seja, um total de 67.850 toneladas de tilápias produzidas no país (NOGUEIRA, 2007).

Dentre as regiões responsáveis pelas maiores produções, destaca-se a Região Nordeste que, a partir de 2003, lidera o cultivo desta espécie e foi responsável por 41% da produção total no ano de 2004. As Regiões Sul e Sudeste também possuem significativa participação, representadas, principalmente, pelos estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina. A tendência de crescimento nesses estados produtores está ancorada em condições climáticas favoráveis, tecnologia disponível e um mercado crescente de consumo (BOSCARDIN, 2008). Além disso, o destino de toda essa produção divide-se em vários segmentos de mercado: tilápia viva para o mercado vivo ou pesque-pague, tilápias para indústrias frigoríficas, filés para mercados e restaurantes ou filés e peixes eviscerados para exportação.

A produção nacional da tilápia caminha a passos largos para um modelo empresarial e está, aos poucos, deixando de ser uma atividade secundária. Em alguns empreendimentos, a tilapicultura é a única fonte de recursos da empresa. No Brasil, existem grandes criatórios produzindo toneladas de peixes e 11 frigoríficos que abatem e processam tilápia cultivada (SUSSEL, 2007).

O Brasil é o sexto maior produtor e quarto maior exportador de carne de tilápia, sendo os Estados Unidos o principal mercado importador. Apesar do constante aumento de produção verificado nos últimos anos, as empresas do ramo ainda encontram problemas para comercializar seus produtos. No

mercado interno, os altos preços do varejo, a preferência da população por outras fontes de proteínas e a existência do abastecimento proveniente da pesca extrativa são exemplos dessa dificuldade. Entretanto, a maior preocupação das indústrias está nas exportações, devido, principalmente, à instabilidade da taxa cambial e à concorrência de outros países produtores (SUSSEL, 2007).

Uma alternativa utilizada pelos frigoríficos para contornar os fatores desfavoráveis da produção está na utilização de tecnologias para melhorar o aproveitamento dos subprodutos do peixe filetado. O excedente do beneficiamento (couro, vísceras, escamas e a carne que fica junto à espinha dorsal) pode representar quase a metade do volume de matéria prima da indústria e é fonte de nutrientes de baixo custo. A receita obtida com a venda desses subprodutos torna a atividade mais viável e contribui para a preservação ambiental, pois evita-se que sejam despejados no meio ambiente (ARRUDA, 2004).

2.2 OS RESÍDUOS INDUSTRIAIS

Os resíduos gerados pelas indústrias alimentícias, inclusive as que processam pescados, podem ser caracterizados como resíduos sólidos, líquidos e gasosos (PEREIRA, 2002). De forma geral, esses resíduos, ao serem lançados no meio ambiente, ocasionam alterações nas características do solo, dos cursos d'água e do ar atmosférico e, dessa forma, tornam-se prejudiciais às plantas e aos animais, inclusive ao homem.

Os resíduos gasosos podem ser primários, liberados diretamente pelas indústrias, ou secundários, quando os gases primários reagem com os gases atmosféricos e formam moléculas poluentes (PEREIRA, 2002). São alguns exemplos de resíduos gasosos o monóxido de carbono que é prejudicial para ao aparelho respiratório, o dióxido de enxofre que é o principal causador da chuva ácida, o gás sulfídrico, causador de odores desagradáveis e os

clorofluorcarbonos, relacionados com a destruição da camada de ozônio (DERÍSIO, 1992).

Os resíduos sólidos podem originar-se de diversos setores industriais, podendo ser representados, por exemplo, por restos de carnes, esquirolas ósseas, trato digestório, excrementos de animais, coágulos de sangue, cinzas, lodos e óleos (PEREIRA, 2002; POTTER; HOTCHKISS, 1998). Para Russo (2003), os resíduos sólidos, inicialmente, são representados por compostos resultantes da atividade humana e/ou animal que não encontram utilização ou que sejam indesejáveis pelo seu detentor. No entanto, eles podem apresentar alta capacidade de valorização se sofrerem um processamento adequado para uma reutilização consciente.

De acordo com a Norma Brasileira — NBR 9800/1987 (ABNT, 1987), o resíduo líquido ou efluente industrial é o despejo líquido proveniente de vários setores do estabelecimento industrial, compreendendo emanções de todo o processamento da matéria prima, águas poluídas de refrigeração, águas pluviais poluídas e o esgoto doméstico (PEREIRA, 2002).

As características físicas, químicas e biológicas dos efluentes líquidos são variáveis e dependem do tipo de indústria e do processamento empregado, do período de operação, das matérias-primas utilizadas e da composição das águas de abastecimento. A concentração dos poluentes nos efluente deriva das perdas no processo e do consumo de água. Os efluentes líquidos podem ser orgânicos ou inorgânicos, apresentar substâncias dissolvidas ou em suspensão, coloração específica e temperatura baixa ou elevada (GIORDANO, 2004; LIU, 2007; PEREIRA, 2002).

Segundo Pereira (2002) e Giordano (2004), na caracterização físicoquímica dos efluentes industriais são realizadas, comumente, as determinações de temperatura, turbidez, sólidos totais, pH, alcalinidade e metais. Além disso, a matéria orgânica total, que representa o grau de poluição de uma água residuária, é determinada indiretamente pela Demanda Química de Oxigênio (DQO), que representa a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a fração orgânica de uma amostra altamente oxidável por reagentes

químicos em solução ácida (JORDÃO; PESSÔA, 1995). Todo esse conhecimento, incluindo-se as características microbiológicas, é fundamental para definir o tipo de tratamento a ser utilizado, avaliar o enquadramento na legislação ambiental e estimar a capacidade de autodepuração do corpo receptor.

2.3 EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PESCADO

A aquicultura tem sido enfocada e tratada por alguns setores governamentais e não governamentais como uma atividade altamente impactante ao meio ambiente. Esses impactos podem ser decorrentes, por exemplo, dos conflitos gerados pela sedimentação e obstrução dos fluxos naturais de água ocasionados pelos processos de hipernutrição e eutrofização, descarga indevida dos efluentes de viveiros e dos setores industriais, além da introdução e disseminação de espécies exóticas sem o devido controle (CASTILHO et al., 2008).

A indústria de alimentos é caracterizada por apresentar um alto consumo de água nas diferentes etapas do seu processamento industrial (CASANI et al., 2005). Dessa forma, as indústrias de beneficiamento de produtos pesqueiros também são consideradas como um dos setores de maior utilização de água e eliminação de efluentes líquidos para o meio ambiente. O consumo de recursos hídricos pode chegar, em média, a 1,18 litros por quilograma de peixe produzido (SOUZA et al., 2008).

Os efluentes da indústria de pescado são gerados a partir de diversas etapas do processamento, que variam de acordo com os derivados produzidos na indústria. Eles podem se originar da recepção do pescado, do processo de condensação que ocorre nas câmaras frias, dos processos de resfriamento, abate, evisceração, filetagem, salmoura, acondicionamento, cozimento, recravação, autoclavagem e lavagem de latas para limpeza. Também podem proceder da lavagem de pisos, instalações, equipamentos e utensílios utilizados durante as etapas de processamento (GIORDANO, 2004; LIU, 2007).

Para Aspé et al. (1997), o volume de efluente gerado no processamento industrial de peixes marinhos é significativamente grande e de difícil tratamento. Esses autores apontaram um fluxo de 5.000 a 10.000 litros de efluente por tonelada de peixe produzido segundo uma planta industrial de capacidade de produção entre 100 a 1.200 toneladas de pescado. Guerrero et al. (1998) citaram 5.400 litros de geração de efluente por tonelada de peixe produzido e com um conteúdo altamente variável de matéria orgânica e sólidos suspensos. Segundo Afonso e Bórquez (2002), complexos industriais chilenos com capacidade de produção de 100 t de peixe por hora possuem uma vazão entre 20.000 a 40.000 litros por hora. No entanto, a alta concentração orgânica desse tipo de efluente leva à necessidade de diluição junto à água da caldeira antes da descarga final, resultando em uma vazão total de 1 a 1,2 milhões de litros por hora de produção.

As características dos efluentes derivam da composição das matérias primas, das águas de abastecimento e do processo industrial. Alguns trabalhos têm buscado caracterizar as águas residuárias para conhecer sua real condição orgânica e conseqüentemente seu potencial poluidor. Prasertsan et al. (1993a; b), em estudos com efluente proveniente de diferentes processamentos de pescados (atum em conserva, camarões cozidos e frutos do mar congelados), observaram pH variável de 8,3 a 5,3, DQO entre 157.080 e 5.950 mg L⁻¹, sólidos totais entre 82,2 e 19,3 mg L⁻¹ e óleos e graxas entre 32.182 e 666 mg L⁻¹. Em outro trabalho, Aspé et al. (1997) encontraram pH 4,5, DQO de 6.000 mg L⁻¹, sólidos totais de 39.000 mg L⁻¹ e nitrogênio total de 540 mg L⁻¹ para águas residuárias da produção de pescados marinhos em plantas industriais no Chile. Azad et al. (2001; 2003) realizaram a sedimentação do efluente industrial de processamento de sardinhas e encontraram pH 6,3, DQO de 32.000 mg L⁻¹ e nitrogênio total de 10 mg L⁻¹. No Brasil, Giordano (2004) apresentou valores variáveis entre 6,2 e 7,0 de pH, 4.300 mg L⁻¹ de DQO e um teor de óleos e graxas superior a 800 mg L⁻¹.

O processo de tratamento despoluente desses efluentes geralmente compreende etapas físicas que são representadas, principalmente, pelo

peneiramento e gradeamento (muitas vezes realizado na própria calha de despejo). Essa etapa inicial tem por função remover a maior parte dos compostos grosseiros como, por exemplo, as escamas, esquirolas ósseas e os pedaços de peixes oriundos da produção. Os processos químicos, na maioria das vezes, são caracterizados pela adição de produtos químicos responsáveis pela remoção de poluentes ou que os condicionem para etapas posteriores de tratamentos (a clarificação química, por exemplo, se faz para a remoção de óleos emulsionados e sólidos coloidais). Finalmente, os processos biológicos fundamentam-se na transformação dos poluentes dissolvidos e em suspensão, mediada por micro-organismos tais como bactérias, fungos, microalgas e protozoários que, com seu metabolismo, degradam os sólidos produzindo gases e novas células. Este processo simula os fenômenos autodepurativos que ocorrem na natureza e traz consigo, além da consequente despoluição, importante para a indústria, a possibilidade de produção de compostos com aplicações peculiares, originados juntamente com a massa celular bacteriana oriunda da biodigestão que pode ser, posteriormente, separada por meio de técnicas apropriadas (ARVANITOYANNIS; TSERKEZOU, 2009; GIORDANO, 2004; LIU, 2007; POTTER; HOTCHKISS, 1998).

2.4 DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E BIOTECNOLOGIA

O desenvolvimento sustentado, segundo a obra “Nosso futuro comum” (ONU, 1991), é aquele que atende às necessidades do presente sem comprometer a possibilidade de as gerações futuras atenderem às suas próprias necessidades. Atualmente, quando ocorre o desperdício de energia ou matéria, as futuras gerações acabam por perder a oportunidade de utilizá-las em seu benefício.

Os grandes feitos da tão celebrada Revolução Industrial estão começando a ser seriamente questionados, sobretudo porque, na época, não se levou em conta os agravos que poderiam ser direcionados ao meio ambiente (ONU, 1991). O homem moderno estabeleceu, acima de tudo, uma

sociedade que utiliza uma grande quantidade de recursos naturais para sua sobrevivência e, com o atual crescimento da população e a falta de alguns recursos como a água, por exemplo, parece que a humanidade se encaminha para uma época de escassez e, cada vez mais, é necessário poupar a natureza (PEREIRA, 2004).

Um sistema produtivo industrializado utiliza matérias primas, energia e mão de obra para produzir os produtos direcionados aos centros consumidores, que crescem cada vez mais e se tornam mais exigentes. Nesse cenário, a natureza foi considerada pelo homem como uma dispensa de onde se retirava o máximo de recursos naturais e como um depósito de lixo para se jogar todos os resíduos oriundos dos processos produtivos (LUCION et al., 2006). Dessa forma, a não preocupação com degradação ambiental, pode culminar em sérios problemas, desde alterações climáticas, até o comprometimento da saúde dos seres vivos, principalmente, do próprio ser humano.

Segundo Pereira (2004), na aplicação de uma gestão ambiental em sistemas produtivos, incluindo o setor industrial, são utilizadas três ações: a primeira consiste em reduzir o uso de matérias primas para evitar desperdícios. Em seguida, reciclar as matérias primas no próprio processo produtivo e por fim, reutilizar os resíduos e os efluentes industriais de forma consciente.

O termo biotecnologia pode ser definido como a utilização de organismos vivos, células ou componentes celulares para a geração de novos produtos como drogas, vacinas, produtos alimentícios, cosméticos, biocombustíveis, etc. (NAIR, 2007; PRESCOTT et al., 2002). Além disso, esse conceito inclui ainda, o melhoramento genético de organismos em benefício do homem. Gavrilescu e Chisti (2005) definem a biotecnologia como a aplicação de princípios de ciência e engenharia para o processamento de materiais mediados por agentes biológicos. Dessa forma, os tratamentos biológicos de efluentes líquidos representam um importante processo biotecnológico sendo, na verdade, uma das primeiras aplicações da biotecnologia para a humanidade.

Resolver os problemas ambientais ocasionados pelo constante progresso do mundo moderno não é uma tarefa fácil e, às vezes, envolve

projetos complexos e inviáveis financeiramente para as indústrias. Tecnologias de biorremediação para a eliminação de efluentes industriais com a ajuda de micro-organismos, geneticamente modificados ou não, têm sido amplamente estudadas (NAIR, 2007). A microbiologia industrial é a área da microbiologia que utiliza micro-organismos como unidades de produção, ou seja, de interesse em processos industriais, incluindo o tratamento biológico de seus efluentes (GURPILHARES et al., 2008).

No controle da poluição hídrica pelo tratamento de efluentes líquidos sanitários e industriais, podem ser aplicadas técnicas nas quais micro-organismos estão envolvidos na transformação da matéria orgânica, resultando em descontaminação para atender aos requisitos legais vigentes (GIORDANO, 2004; LIU, 2007).

No tratamento biológico de efluentes definido por Gurpilhares et al. (2008) e Giordano (2004), processos bioquímicos de oxidorredução liberam energia para síntese, movimento e respiração dos micro-organismos. Consequentemente, ocorre a remoção e/ou redução de diferentes compostos poluentes presentes no efluente (matéria orgânica, nitrogênio, fósforo, por exemplo). Além disso, o tipo de processo envolvido e o tipo de micro-organismo utilizado no tratamento dependem das condições do cultivo. Algumas bactérias necessitam, por exemplo, de luminosidade e da existência de compostos orgânicos para desenvolver o seu metabolismo conhecido como foto-heterotrófico. A ausência de luz, por sua vez, permite o crescimento de micro-organismos com metabolismo quimiotrófico (GURPILHARES et al., 2008).

2.5 BACTÉRIAS FOTOSSINTETIZANTES

A fotossíntese representa um dos mais importantes processos biológicos e se resume na conversão da energia luminosa em energia química, necessária para a manutenção dos seres vivos. A habilidade de realizar tal processo depende da presença de pigmentos especiais, denominados clorofila, que são encontrados, principalmente, nas plantas e algas e em algumas

bactérias e, nesse caso, recebem a denominação de bacterioclorofilas (BROCK et al., 1994).

Bactérias púrpuras, verdes e as cianobactérias são micro-organismos fotossintetizantes ou fototróficos que se diferenciam quanto ao processo fotossintético. As cianobactérias realizam um processo fotossintético denominado fotossíntese oxigênica, com a produção de oxigênio. As bactérias verdes e púrpuras, ao contrário, realizam uma fotossíntese sem o oxigênio e que é denominada fotossíntese anoxigênica. Além disso, essas bactérias diferenciam-se com base no tipo de pigmento fotossintetizante presente, no sistema de membrana e nas propriedades fisiológicas e bioquímicas (BROCK et al., 1994; ERASO; KAPLAN, 2001).

As bactérias púrpuras representam um grupo versátil de micro-organismos predominantemente aquáticos e que são capazes de crescer na ausência de oxigênio. Uma característica em comum dessas bactérias é a presença de bacterioclorofilas luz-dependentes, muito importantes para a transferência de energia no processo fotossintético. Essas estruturas estão localizadas em uma membrana intracitoplasmática originada a partir da membrana do citoplasma. A maioria dos pigmentos produzidos por elas são as bacterioclorofilas *a* ou *b* e vários carotenoides como a espiriloxantina, rodopinal, esferoidene e outras da série okenone, responsáveis por conferir cor característica às colônias e meios de cultivos. Além disso, são providas de um aparato flagelar que lhes permite o movimento por fototaxia e/ou quimiotaxia quando apresentam crescimento fotoautotrófico e/ou foto-heterotrófico (BROCK et al., 1994; ERASO; KAPLAN, 2001; IMHOFF, 2001a; IMHOFF et al., 2001; HOLT et al., 2000).

De acordo com a sua habilidade ou não em utilizar o enxofre como doador de elétron para a assimilação fototrófica do dióxido de carbono, as bactérias púrpuras são divididas em bactérias púrpuras sulfurosas (BPS) e bactérias púrpuras não sulfurosas (BPNS), respectivamente. De acordo com Garrity et al. (2001) na 2ª Edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, o filo *Proteobacteria* foi elaborado para abrigar bactérias Gram-

negativas com base em análises filogenéticas realizadas na sequência gênica do rRNA 16S e, dessa forma, subdivide-se em 5 classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*. As BPS abrangem as famílias *Chromatiaceae* e *Ectothiorhodospiraceae*, pertencentes à classe *Gammaproteobacteria*. As BPNS, por sua vez, estão divididas em duas classes sendo a *Alphaproteobacteria* detentora da maioria das espécies e a classe *Betaproteobacteria* apresentando um menor grupo de micro-organismos que inclui *Rubrivivax gelatinosus*. (ERASO; KAPLAN, 2001; IMHOFF, 2001a; IMHOFF et al., 2001). A Tabela 1, adaptada de Imhoff (2001a), resume os principais grupos de bactérias púrpuras fotossintetizantes.

A diferença entre bactérias púrpuras e bactérias verdes deve-se ao fato destas últimas não apresentarem a membrana intracitoplasmática; entretanto, possuem organelas não-membranosas denominadas clorossomos que estão associadas à membrana citoplasmática. As bacterioclorofilas deste grupo são *c*, *d* e *e*, em raras vezes a *a*. Os carotenoides presentes são da série clorobactene (BROCK et al., 1994; ERASO; KAPLAN, 2001).

Tabela 1 – Principais características taxonômicas dos diferentes gêneros das bactérias púrpuras fotossintetizantes

CARACTERÍSTICA	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	BPNS	BPNS
Classe filogenética	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>
Bacterioclorofila	Bchl <i>a</i> ou Bchl <i>b</i>	Bchl <i>a</i> ou Bchl <i>b</i>	Bchl <i>a</i>	Bchl <i>a</i> ou Bchl <i>b</i>
Gêneros	<i>Chromatium</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Rhodocyclus</i>	<i>Rhodospirillum</i>
	<i>Allochrochromatium</i>	<i>Halorhodospira</i>	<i>Rhodoferrax</i>	<i>Blastochloris</i>
	<i>Halochromatium</i>	<i>Thiorhodospira</i>	<i>Rubrivivax</i>	<i>Phaeospirillum</i>
	<i>Isochromatium</i>			<i>Rhodobacter</i>
	<i>Lamprobacter</i>			<i>Rhodobium</i>
	<i>Lamprocystis</i>			<i>Rhodocista</i>
	<i>Marichromatium</i>			<i>Rhodomicrobium</i>
	<i>Rhabdochromatium</i>			<i>Rhodopila</i>
	<i>Termochromatium</i>			<i>Rhodoplanes</i>
	<i>Thiocapsa</i>			<i>Rhodopseudomonas</i>
	<i>Thiococcus</i>			<i>Rhodospira</i>
	<i>Thiocystis</i>			<i>Rhodothalassium</i>
	<i>Thiodictyon</i>			<i>Rhodovibrio</i>
	<i>Thiohalocapsa</i>			<i>Rhodovulum</i>
	<i>Thiolamprobum</i>			<i>Roseospira</i>
	<i>Thiopedia</i>			<i>Roseospirillum</i>
	<i>Thiorhodococcus</i>			
	<i>Thiorhodovibrio</i>			
	<i>Thiospirillum</i>			

Fonte: Adaptado de IMHOFF, 2001a.

2.6 BACTERIA FOTOSSINTETIZANTE *Rubrivivax gelatinosus*

BPNS da ordem *Burkholderiales*, família *Comamonadaceae* e gênero *Incertae sedis* XV *Rubrivivax*, inicialmente o nome científico deste micro-organismo era descrito como *Rhodopseudomonas gelatinosa* e posteriormente passou a ser chamado *Rhodocyclus gelatinosus*, conforme observado em alguns trabalhos desenvolvidos por Sasaki e Nagai (1979), Sasaki et al. (1981), Prasertsan et al. (1993a; b) e Ponsano et al. (2002a; b; 2003; 2004a; b). Willens et al. (1991), com base em resultados de estudos de hibridização de DNA-rRNA, sugeriram a transferência do *Rhodocyclus gelatinosus* para um novo gênero *Rubrivivax*, com o nome de *Rubrivivax gelatinosus*.

Bactéria Gram-negativa em forma de bacilo levemente encurvado ou reto, pode medir entre 0,4-0,7 X 1,0-3,0 μm e chegar a 15,0 μm em culturas mais velhas. Muitas cepas mostram uma produção abundante de muco no meio de cultivo, devido à aglomeração estática de suas células. Quando as culturas são novas, observa-se certa motilidade pela presença de flagelos polares e a sua multiplicação ocorre por fissão binária, sendo a temperatura de 30°C e o pH entre 6,0-8,5 ideais para o crescimento. O habitat natural desse micro-organismo é diversificado, sendo encontrado, principalmente, em ambientes aquáticos variáveis, no solo, em valas de esgotos e lodos, além de efluentes industriais (HOLT et al., 2000; IMHOFF, 2001b).

Duas características são importantes na identificação de *Rubrivivax gelatinosus* e na diferenciação entre as BPNS: a capacidade de liquefação da gelatina pela ação de uma protease extracelular e a utilização do citrato como única fonte de carbono para o seu crescimento. Nesse caso, existe uma enzima chave que age sobre o citrato e libera acetato para posteriormente ser utilizado pela bactéria (HOLT et al., 2000; IMHOFF, 2001b).

Esses micro-organismos podem se desenvolver fotoautotroficamente na presença de hidrogênio como fonte doadora de elétrons. Entretanto, preferivelmente, apresentam crescimento foto-heterotrófico em cultivos anóxicos e com uma composição variável de carbono e de compostos

reduzidos de enxofre. Em ambos os casos, são requeridos os fatores de crescimento tiamina e biotina para o desenvolvimento (HOLT et al., 2000). Além disso, é possível ocorrer crescimento quimiotrófico sob condições de microaerofilia e condições aeróbicas, sem a presença de luz e algumas cepas podem adaptar o seu crescimento para se desenvolver anaerobicamente no escuro utilizando o dióxido ou monóxido de carbono como a única fonte de carbono e de energia (HOLT et al., 2000; IMHOFF, 2001b).

Os pigmentos fotossintetizantes presentes nessa bactéria são a bacterioclorofila *a* e os carotenoides da série esferoidene (esferoidene, hidroxiesferoidene e espiriloxantina). Esses componentes são os principais responsáveis pela coloração vermelho púrpura desenvolvida em cultivos desse micro-organismo (BROCK et al., 1994; HOLT et al., 2000; IMHOFF, 2001b; PONSANO et al., 2002a). Outra importante característica de *Rubrivivax gelatinosus* é a rica composição protéica de suas células, apresentando uma quantidade balanceada de aminoácidos essenciais (Tabela 2), carboidratos, lipídeos e cinzas, além de carotenoides, constituindo a biomassa bacteriana (PONSANO, 2000; PONSANO, et al., 2003; SASAKI et al., 1981).

A biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* apresenta característica pigmentante e alto valor nutricional, o que indica sua aplicação como biofertilizante e fonte de suplementação proteica e pigmentante na nutrição animal (PONSANO et al., 2002a; b; 2003; 2004a; b; PRASERTSAN et al., 1993a; b; 1997; SASAKI et al., 1981). Além disso, o metabolismo da bactéria promove o consumo de grande parte da matéria orgânica do substrato utilizado para seu cultivo. Quando esse substrato é representado por efluentes industriais, o cultivo da bactéria torna-se altamente vantajoso para as empresas geradoras sob o aspecto ambiental em função da descontaminação promovida nos resíduos.

Tabela 2 – Composição média de aminoácidos essenciais da biomassa de diferentes cepas de *Rubrivivax gelatinosus*

AMINOÁCIDO	Rubrivivax gelatinosus ⁽¹⁾	Rubrivivax gelatinosus A1 ⁽¹⁾	Rubrivivax gelatinosus R1 ⁽²⁾
Ácido aspártico	NA	NA	5,74
Tirosina	NA	NA	2,90
Serina	NA	NA	2,63
Ácido glutâmico	NA	NA	6,85
Prolina	NA	NA	3,27
Glicina	NA	NA	4,18
Alanina	NA	NA	6,98
Triptofano	NA	NA	1,74
Cisteína	NA	NA	0,59
Valina	3,42	3,75	4,56
Metionina	1,89	1,71	1,40
Isoleucina	2,73	2,96	3,18
Leucina	5,41	5,28	6,80
Treonina	1,99	1,93	3,52
Fenilalanina	3,10	3,05	3,03
Lisina	3,12	3,41	3,61
Histidina	1,13	1,01	1,83

⁽¹⁾ Sasaki et al. (1981) ⁽²⁾ Ponsano et al. (2003)

NA – Não analisado.

2.7 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Rubrivivax gelatinosus*: TRATAMENTO DE EFLUENTES E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

O fator despoluente associado à geração de massa celular desse micro-organismo é fonte de pesquisas importantes no contexto biotecnológico e apresenta grande destaque na literatura internacional.

Sasaki e Nagai (1979), trabalhando com a bactéria fototrófica *Rhodopseudomonas gelatinosa*, encontraram máxima taxa de crescimento específico nas condições de pH 7,0 e 38°C em cultivos aeróbicos e sem luminosidade em meio contendo goma de amido. Posteriormente, estudos com a mesma BPNS sob as mesmas condições de aerobiose no escuro foram direcionados para o tratamento de efluente de uma fábrica de produtos

derivados da soja no Japão. Nesse caso, os autores trabalharam com duas cepas e encontraram, após 40 horas de cultivo, reduções de DQO entre 79 e 81%, proteína solúvel entre 60 e 70% e, adicionalmente, obtiveram, aproximadamente, 10 g L^{-1} de biomassa celular (SASAKI et al., 1981).

Prasertsan et al. (1993a) conduziram pesquisas com efluentes provenientes da indústria de processamento de mariscos. Em seus estudos, estes autores realizaram o isolamento e a identificação da BPNS *Rhodocyclus gelatinosus*. Em seguida, avaliaram diferentes condições de cultivo (aerobiose e anaerobiose com e sem luminosidade), tendo observado máxima síntese de carotenoides em cultivo anaeróbico na presença de luz, embora a produção de biomassa tenha sido superior nos cultivos aeróbicos. Em outro trabalho, estes mesmos autores compararam diferentes substratos para o crescimento dessa bactéria e observaram que o resíduo proveniente da etapa posterior ao cozimento de atuns sob vapor, se mostrou melhor para o crescimento microbiano nas condições de anaerobiose e luminosidade fornecida por lâmpadas de tungstênio a 3.000 lux de intensidade. Além disso, o processo resultou em 86% de remoção da DQO, o que demonstra o potencial da bactéria em descontaminar efluentes dotados de alta carga orgânica (PRASERTSAN et al., 1993b). Posteriormente, esse potencial despoluente e a maximização da produção de biomassa foram avaliados no mesmo tipo de substrato. A adição de extrato de levedura e cloreto de magnésio em cultivo mantido em anaerobiose com intensidade luminosa 3.000 lux e pH 7,0, promoveu os melhores resultados, com $8,14 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa e remoção de 59% na DQO (PRASERTSAN et al., 1997).

Ponsano et al. (2002a) desenvolveram uma metodologia de isolamento de *Rhodocyclus gelatinosus* de efluente de abatedouro de frangos. A identificação desse micro-organismo foi baseada nas seguintes propriedades: desenvolvimento da coloração avermelhada nos cultivos em meio sintético, motilidade positiva, morfologia de bastonetes Gram-negativos ligeiramente curvos, liquefação do meio de gelatina, utilização de citrato como fonte de carbono e produção de pigmentos carotenoides da série espiriloxantina

alternativa e bacterioclorofila *a*, presentes na biomassa. A capacidade pigmentante da massa celular de *Rubrivivax gelatinosus* obtida do resíduo de abatedouro de aves foi, posteriormente, testada em aves de corte (PONSANO et al., 2002b). Nesse trabalho, os autores compararam a biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* com pigmentos sintéticos disponíveis no mercado e confirmaram o potencial pigmentante da biomassa, que conferiu um amarelamento das carcaças dos animais, principalmente na pele, em comparação com a carne. No entanto, os resultados foram menos efetivos do que os obtidos pela utilização dos pigmentos convencionais, que produziram carne e pele mais avermelhadas. Quanto ao desempenho de aves suplementadas com diferentes níveis de biomassa, 300 ppm apresentaram melhores resultados para ganho de peso e conversão alimentar. Entretanto, o consumo da ração não foi influenciado pelos tratamentos (PONSANO et al., 2004a). A pigmentação em gemas de ovos também foi estudada por Ponsano et al. (2004b) e os resultados obtidos mostraram que a biomassa do micro-organismo fotossintetizante foi capaz de promover um aumento da coloração na gema dos ovos em todos os níveis de tratamento a partir de 24 horas de administração, atingindo-se um “plateau” de pigmentação com 20 dias de produção. Polonio (2007) também encontrou intensificação da cor das gemas de galinhas poedeiras suplementadas com a biomassa da bactéria *Rubrivivax gelatinosus*. Nesse trabalho, as gemas tornaram-se mais escuras e avermelhadas, alcançando a preferência dos consumidores locais.

A avaliação da capacidade despoluente de *Rubrivivax gelatinosus* e a produção de biomassa em efluente de abatedouro avícola também foram estudadas por Ponsano et al. (2003). O cultivo do micro-organismo no efluente industrial em questão promoveu uma redução de 90% da DQO. Além disso, os autores determinaram a composição centesimal média da massa celular onde encontraram (base seca) 67,6% de proteína bruta, 27,6% de carboidratos totais, 4,2% de matéria mineral e 0,6% de extrato etéreo. Em outra situação, foi estudado o crescimento fototrófico dessa BPNS em resíduo de abatedouro avícola filtrado e tratado termicamente para a eliminação de micro-organismos

patogênicos. O resultado final proveniente de 10 dias de cultivo apresentou uma redução de 91% da DQO e uma produtividade de 0,085 g biomassa L⁻¹ d⁻¹ (PONSANO et al., 2008).

Diferentes tipos de efluentes também foram testados quanto à redução da carga poluente por *Rubrivivax gelatinosus*. Choorit et al. (2002) promoveram a identificação e o cultivo de BPNS, posteriormente identificada como *Rubrivivax gelatinosus*, em efluente da indústria de processamento de látex de borracha. Neste trabalho, os autores encontraram a maior redução de DQO (57%), depois de 40 horas, quando realizaram o bioaumento da cultura, ou seja, um cultivo misto entre duas cepas do micro-organismo.

Lima et al. (2008) trataram o efluente proveniente de uma indústria de processamento de tilápias com inóculo de 1% de *Rubrivivax gelatinosus* avaliando a produtividade do processo durante 10 dias em escala semi-industrial em 2 reatores biológicos, sob diferentes condições de luminosidade. A redução da DQO foi 78% e 79% e a produtividade 0,04 e 0,06 g biomassa L⁻¹ d⁻¹ para reatores com menor e maior luminosidade, respectivamente.

Portanto, a utilização de micro-organismos como unidades de tratamento de águas residuárias industriais e geração de massas celulares com alto valor nutricional apresenta grande importância biotecnológica. Considerando a escassez de trabalhos referentes ao uso da BPNS *Rubrivivax gelatinosus* em efluente proveniente de complexos industriais de beneficiamento da tilápia, este trabalho de dissertação de mestrado teve como objetivo geral caracterizar o crescimento dessa bactéria em efluente gerado por uma indústria que abate e processa essa espécie de peixe. Adicionalmente, objetivou-se determinar a produtividade do processo de produção de biomassa bacteriana, em escala semi-industrial, com a utilização de dois métodos tecnológicos (centrifugação e microfiltração tangencial) para obter a massa celular e, também, determinar o potencial despoluente do micro-organismo ao crescer no substrato.

A pesquisa originou dois artigos científicos:

- Caracterização do crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* em efluente de indústria de processamento de tilápias,
- Microfiltração tangencial e centrifugação para a determinação da produtividade e redução da DQO de efluente industrial cultivado com *Rubrivivax gelatinosus*.

As etapas mais importantes desse trabalho de dissertação de mestrado foram fotografadas pelo autor e as fotos estão ilustradas na seção “Apêndice”.

As normas para envio dos artigos científicos à revista Bioresource Technology, originados dessa dissertação, estão apresentadas na seção “Anexo”.

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma NBR-9800: **Critérios para lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público de esgoto sanitário**. Rio de Janeiro; ABNT, 1987.

AFONSO, M. D.; BÓRQUEZ, R. 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, 2002.

ARRUDA, L. F. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo**. 2004. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 2004.

ARVANITOYANNIS, I. S.; TSERKEZOU, P. **Waste management in the food industry: potential uses**. Disponível em: <http://www.scitopics.com/Waste_Management_for_the_Food_Industries.html>. Acesso em: 23 mar. 2009.

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

AZAD, S. A.; VIKINESWARY, S.; CHONG, V. C.; RAMACHANDRAN, K. B. *Rhodovulum sulfidophilum* in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p.13-18, 2003.

AZAD, S. A.; VIKINESWARY, S.; RAMACHANDRAN, K. B.; CHONG, V. C. Growth and production of biomass of *Rhodovulum sulfidophilum* in sardine processing wastewater. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 264-268, 2001.

BOSCARDIN, N. R. A produção aquícola brasileira. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, A. J. R.; SOTO, D. (Eds.). **Aqüicultura no Brasil: o desafio é**

crescer. Brasília: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2008, p. 27-73.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINGO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 7th ed. New York: Prentice Hall, 1994.

CASANI, S.; ROUHANYB, S.; KNØCHELA, M. A discussion paper on challenges and limitations to water reuse and hygiene in the food industry. **Water Research**, v. 39, p. 1134–1146, 2005.

CASTILHO, G. G.; PEREIRA, L. A.; PIE, M. R. Aquicultura, segurança alimentar, sanidade e meio ambiente. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, A. J. R.; SOTO, D. (Eds.). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2008, p. 183-208.

CHORIT, W.; THANAKOSET, P.; THONGPRADISTHA, J.; SASAKI, K.; NOPARATNARAPORN, N. Identification and cultivation of photosynthetic bacteria in wastewater from a concentrated latex processing factory. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1055-1058, 2002.

DARLINGTON, R.; STAIKOS, T.; RAHINIFARD, S. Analytical methods for waste minimization in the convenience food industry. **Waste Management**, v. 29, p. 1274-1281, 2009.

DERISIO, J. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental**. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1992.

ERASO, J. M.; KAPLAN, S. **Photoautotrophy**. Encyclopedia of Life Sciences, 2001. Disponível em: <<http://www.nrw.intercience.wiley>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2001. v. 2, pt. B.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 471-499, 2005.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S.; CHONG, V. C. Isolation and growth of the phototropic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain B1 in sago-starch-processing wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 505-511, 1998.

GIORDANO, G. **Tratamento e controle de efluentes industriais**. Departamento de Engenharia Sanitária e Meio Ambiente, UERJ, Rio de Janeiro. 2004. Disponível em <[http://www.ufmt.br/esa/Modulo II Efluentes Industriais/Apost EI 2004 1ABES Mato Grosso UFMT2.pdf](http://www.ufmt.br/esa/Modulo%20II%20Efluentes%20Industriais/Apost%20EI%202004%201ABES%20Mato%20Grosso%20UFMT2.pdf)>. Acesso em: 4 maio 2009.

GURPILHARES, D. B.; HASMANN F. A.; PESSOA JUNIOR, A. Microbiologia industrial: microorganismos como unidade de produção. **Microbiologia in foco**, v. 2, p. 33-43, 2008.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

IMHOFF, J. P., The anoxygenic phototrophic purple bacteria. In: GARRITY, G.M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd. ed. New York: Springer, 2001a. v. 1, p. 631-638.

IMHOFF, J. P. *Genus Incertae Sedis XV Rubrivivax*. In: GARRITY, G.M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd. ed. New York: Springer, 2001b. v. 2, pt.C., p. 749-750.

IMHOFF, J. P.; HIRAISHI, A.; SÜLING, J. Anoxygenic phototrophic purple bacteria. In: GARRITY, G.M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd. ed. New York: Springer, 2001. v. 2, pt. A., p.119-132.

IZU, K.; NAKAJIMA, F.; YAMAMOTO, K.; KURISU, F. Aeration conditions affecting growth of purple nonsulfur bacteria in an organic wastewater

treatment process. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 294–302, 2001.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 3. ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995. v. 1.

KANTACHOTE, D.; TORPEE, S.; UMSAKUL, K. The potencial use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 8, 2005. Disponível em <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue3/full/8/>>. Acesso em: 4 maio 2009.

LIMA, L. K. F.; PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G. Produtividade e redução da carga poluente na obtenção de biomassa em resíduo de processamento de pescado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 21., SIMPÓSIO LATINO AMERICANO E DO CARIBE DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15., 2008. Belo Horizonte. **Anais eletrônicos ...** Campinas: SBCTA, 2008.

LIU, S. X. **Food and agricultural wastewater utilization and treatment**. 1st ed. Ames: Blackwell, 2007.

LUCION, A. P. S.; SIEDEMBERGER, D. R.; MARASCA, E. N.; TEIXEIRA, U. M. Desenvolvimento sustentável. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. v. 9, p. 70-77, 2006.

NAIR, A. J. **Introduction to biotechnology and genetic engineering**. Massachusetts: Infinity Science Press, 2007.

NOGUEIRA, A. **Criação de tilápias em tanques-rede**. Salvador: SEBRAE, Bahia, 2007. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/7227D4D9D30AB6CC832573A9006DF4BC/\\$File/NT0003737A.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/7227D4D9D30AB6CC832573A9006DF4BC/$File/NT0003737A.pdf)>. Acesso em: 10 fev. 2009.

ONU. Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento da Organização das Nações Unidas. **Nosso futuro comum**. 2 ed. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 1991.

PEREIRA, C. M. **Avaliação do potencial do efluente de lagoas de estabilização para utilização na piscicultura**. 2004. 173f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.

PEREIRA, J. A. **Geração de resíduos industriais e controle ambiental**. Centro Tecnológico da Universidade Federal do Pará. 2002. Disponível em <http://www2.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011213_01.pdf>. Acesso em: 4 maio 2009.

POLONIO, L. B. **Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* como suplemento de rações para galinhas poedeiras**. 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba. 2007.

PONSANO, E. H. G. **Avaliação da capacidade pigmentante de biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* em frangos de corte**. 2000. 93f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara. 2000.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 143-147, 2003.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 445-449, 2002a.

PONSANO, E. H. G.; PAULINO, C. Z.; PINTO, M. F. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3836-3842, 2008.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M.; LACAVA, P. M. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler pigmentation. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 77–82, 2002b.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M.; LACAVA, P. M. Performance and color of broilers fed diets containing *Rhodocyclus gelatinosus* biomass. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 237-242, 2004a.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M.; LACAVA, P. M. *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for egg yolk pigmentation. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, p. 421-425, 2004b.

PRASERTSAN, P.; CHORIT, W.; SUWANNO, S. Isolation, Identification and growth condition of photosynthetic bacteria found in seafood processing wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 590-593, 1993a.

PRASERTSAN, P.; CHORIT, W.; SUWANNO, S. Optimization for growth of *Rhodocyclus gelatinosus* in seafood processing effluents. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 593-596, 1993b.

PRASERTSAN, P.; JATURAPORNIPIPAT, M.; SIRIPATANA, C. Utilization and treatment of tune condensate by photosynthetic bacteria. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 2439-2445, 1997.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5th ed. McGraw–Hill, 2002.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. **Food science**. 5th ed. New York: Springer Science, 1998.

RUSSO, M. A. T. **Tratamento de resíduos sólidos**. Departamento de Engenharia Civil, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra. 2003. Disponível em <http://www1.ci.uc.pt/mhidro/edicoes_antigas/Tratamentos_Residuos_Solidos.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2009.

SASAKI, K.; NAGAI, S. The optimum pH and temperature for the aerobic growth of *Rhodopseudomonas gelatinosa* and vitamin B12 and ubiquinone formation on a starch medium. **Journal of Fermentation and Technology**, v. 57, p. 383-386, 1979.

SASAKI, K.; NOPARATNARAPORN, N.; HAYASHI, M.; NISHIZAWA, Y.; NAGAI, S. Single-Cell protein production by treatment of soybean wastes with *Rhodopseudomonas gelatinosa*. **Journal of Fermentation and Technology**, v. 59, p. 471-477, 1981.

SOUZA, M. R.; SILVA, R. J. **A geração de resíduos industriais e sua destinação final**. Disponível em: <http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGE_P1997_T65_01.PDF>. Acesso em: 4 maio 2009.

SOUZA, M. A.; VIDOTTI, R. M.; OLIVEIRA NETO, A. L. Redução no consumo de efluente gerado em abatedouro de tilápia do nilo através da implantação de conceitos de produção mais limpa (P+L). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 34, p. 289-296, 2008.

SUSSEL, F. R. **Para onde vai a tilápia**. Instituto FNP. ANUALPEC, 2007.

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1183-1187, 2005a.

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z.; YANG, Q. Biomass production from glutamate fermentation wastewater by the co-culture of *Candida halophila* and *Rhodothorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1522-1524, 2005b.

WILLENS, A.; GILLIS, M.; DE LEY, J. Transfer of *Rhodocyclus gelatinosus* to *Rubrivivax gelatinosus* gen. nov., comb. nov., and phylogenetic relationships with *Leptothirx*, *Sphaerotilus natans*, *Pseudomonas saccharophila* and *Alcaligenes latus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 65-73, 1991.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO: CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Rubrivivax gelatinosus* EM EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE ABATE E PROCESSAMENTO DE TILÁPIAS

Caracterização do crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* em efluente de indústria de abate e processamento de tilápias

Leandro Kanamaru Franco de Lima^a, Elisa Helena Giglio Ponsano^a

^a Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Unesp. 793 Clóvis Pestana, Araçatuba, SP, 16050-680, Brasil.

Resumo

Uma das aplicações da biotecnologia em prol do desenvolvimento sustentado reside na utilização de subprodutos industriais poluentes como substratos para a produção de substâncias de interesse econômico por meio de micro-organismos. Efluente de indústria de processamento de tilápias foi tratado fisicamente e utilizado como substrato para o crescimento da bactéria fotossintetizante *Rubrivivax gelatinosus* com o objetivo de se caracterizar o crescimento do micro-organismo, avaliando-se, especialmente, sua habilidade em gerar massa celular e reduzir a carga poluente. O cultivo foi realizado durante 15 dias sob condições de anaerobiose, $32 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade de 1.400 ± 200 lux, utilizando-se inóculo em nível de 1% (v/v) e pH ajustado para 7,0. A maior produção de massa celular ($0,273 \text{ g L}^{-1}$) e a máxima taxa de crescimento específico ($0,188 \text{ h}^{-1}$) foram observadas com 72 e 48 horas de cultivo, respectivamente. Ao final do processo, o pH elevou-se para 8,2 e houve

reduções de 28,72% e 38,01% nos teores de nitrogênio total e óleos e graxas, respectivamente. A capacidade despoluente da bactéria foi demonstrada pela redução de 42,75% na demanda química de oxigênio do substrato. Desta forma, o efluente industrial mostrou-se adequado para o crescimento da bactéria fotossintetizante *Rubrivivax gelatinosus* permitindo a produção de massa celular e a diminuição da carga poluente.

Palavras-Chave: Biomassa; Biotecnologia; Demanda química de oxigênio; Efluente de indústria pesqueira; Tratamento de águas residuárias.

Abstract

One application of biotechnology that contributes to sustainable development is the utilization of industrial byproducts as substrates for the production of substances by microorganism. Effluent originated from tilapia industrial processing was physically treated and used as substrate for the growth of the phototropic bacteria *Rubrivivax gelatinosus* with the aim of characterizing the microbial growth and evaluating, especially, its ability to produce biomass and reduce the pollutant load of the substrate. An inoculum at 1% (v/v) was used and the cultivation was carried out at $32 \pm 2^\circ\text{C}$ and 1.400 ± 200 lux for 15 days under anaerobic conditions, after the adjustment of pH to 7.0. The highest production of cell mass (0.273 g L^{-1}) and the highest specific growth rate (0.188 h^{-1}) were observed with 72 and 48 hours of cultivation, respectively. At the end of the process, the pH increased to 8.2 and reductions of 28.72% and 38.01% on total nitrogen and oils and greases contents were observed, respectively.

The ability of the bacterium in removing the substrate pollutant load was demonstrated by the reduction of 42.75% on the chemical oxygen demand. Thus, the industrial effluent was suitable for the growth of the phototropic bacteria *Rubrivivax gelatinosus*, allowing the production of biomass and the reduction of the pollutant load.

Keywords: Biomass; Biotechnology; Chemical oxygen demand; Fishing industry effluents; Wastewater treatment.

1. Introdução

O cultivo da tilápia (*Oreochromis niloticus*) desenvolveu-se de forma bastante significativa no Brasil a partir de 1996 e, desde 2002, esta tornou-se a espécie de peixe mais cultivado no país (Boscardin, 2008). Em 2005, sua produção representou cerca de 38% da produção total de pescados em aquicultura continental brasileira, ou seja, um total de 67.850,5 toneladas (Nogueira, 2007). O destino dessa produção divide-se em vários segmentos de mercado: tilápia viva para o mercado vivo ou pesque-pague, tilápias para indústrias frigoríficas, filés para mercados e restaurantes ou filés e peixes eviscerados para exportação.

Com o contínuo desenvolvimento industrial, principalmente do setor pesqueiro, volumes grandes de efluentes são gerados diariamente durante a produção e, muitas vezes, são despejados em corpos d'água sem o devido tratamento (Giordano, 2004). Segundo Guerrero et al. (1998), a geração de efluente na indústria de pescado é de $5,4 \text{ m}^3 \text{ t}^{-1}$ de peixe processado. Além

disso, o consumo de água durante o beneficiamento está entre os mais altos da indústria alimentícia e pode apresentar em média $1,18 \text{ L kg}^{-1}$ de peixe beneficiado (Souza et al., 2008). Isso obriga as indústrias a buscarem formas viáveis e factíveis para o tratamento de seus resíduos, a fim de evitar danos ambientais, penalidades sob o aspecto legal e prejuízos à sua imagem (Pereira, 2002). Atualmente, verifica-se uma preocupação em busca de harmonia entre o progresso econômico industrial e a preservação/recuperação do meio ambiente, almejando-se um desenvolvimento sustentável, importante para garantir às futuras gerações um ambiente saudável e equilibrado (Lucion et al., 2006).

Muitos processos biotecnológicos utilizam micro-organismos com o intuito de realizar a despoluição de esgotos domésticos e industriais e, adicionalmente, gerar serviços e obter novos produtos (Azevedo, 1998; Gurpilhares et al., 2008). Isto tem se tornado atrativo, principalmente para o setor industrial, onde a utilização de subprodutos pode ser direcionada para a produção de novos alimentos (Zheng et al., 2005) possibilitando que os gastos despendidos na aplicação das tecnologias depurativas revertam em novas receitas para as próprias indústrias.

Bactérias fotossintéticas ou fototróficas podem ser encontradas em diversos ambientes (Choorit et al., 2002). Apresentam grande diversidade de metabolismo e, por esse motivo, são capazes de crescer em meios com diversas composições, incluindo os efluentes industriais (Imhoff e Trüper, 1989). Existem relatos na literatura a respeito da utilização de bactérias fototróficas em resíduos industriais visando à remoção da carga poluente e à produção de

biomassa (Gheta et al., 1998; Azad et al., 2001, 2003; Kantachote et al., 2005; Ponsano et al., 2003, 2008b; Lima et al., 2008). A biomassa produzida por esses organismos apresenta quantidades substanciais de aminoácidos essenciais, vitaminas e carotenoides, que podem encontrar aplicações como, por exemplo, suplemento na ração animal (Sasaki e Nagai, 1979; Prasertsan et al., 1997; Kantachote et al., 2005; Ponsano et al., 2003, 2004a, 2004b).

As bactérias púrpuras não sulfurosas (BPNS) são bactérias fototróficas amplamente distribuídos na natureza. Podem ser encontradas em ambientes aquáticos marinhos ou de água doce e no solo úmido, além de estarem associados a vários tipos de efluentes industriais, onde desempenham um importante papel na remoção de poluentes ambientais (Imhoff e Trüper, 1989). Dentro desse grupo de micro-organismos, poucos estudos têm sido conduzidos com a BPNS *Rubrivivax gelatinosus*. Sasaki et al. (1981) utilizando efluente da indústria de derivados da soja, avaliaram o potencial despoluente deste micro-organismo com a consequente produção de biomassa sob condições de aerobiose e ausência de luz. Segundo Prasertsan et al. (1993a), o crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* sob condições de anaerobiose e com luminosidade apresentou melhores resultados na síntese de pigmentos carotenoides. Estudos realizados com a bactéria em efluente de abatedouro avícola demonstraram sua habilidade em crescer neste resíduo industrial sem a necessidade da adição de qualquer suplementação, reduzindo, assim, sua carga poluente (Ponsano et al. 2003, 2008b). Além disso, o crescimento da bactéria no efluente da indústria avícola foi acompanhado da produção de

biomassa rica em proteínas e em pigmentos carotenoides da série espiriloxantina alternativa, que pode encontrar uso como aditivo alimentar em ração de aves e como ingrediente pigmentante para carcaças e gemas de ovos (Ponsano et al. 2003, 2004a, 2004b).

Efluentes de indústrias de processamento de pescado foram utilizados por Prasertsan et al. (1993a, 1993b, 1997); Azad et al. (2001, 2003) e Lima et al. (2008) como substratos para o crescimento de bactérias fotossintetizantes e os resultados encontrados foram relevantes. Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar o crescimento fotoheterotrófico da bactéria púrpura não sulfurosa *Rubrivivax gelatinosus* em efluente proveniente de indústria de processamento de tilápias, avaliando sua habilidade em gerar massa celular e reduzir a carga poluente do substrato.

2. Material e Método

2.1. Micro-organismo, reativação e inóculo

A bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus* utilizada nesse trabalho foi previamente isolada de efluente de abatedouro avícola e caracterizada com base em testes bioquímicos, morfológicos e pelo espectro de absorção de pigmentos fotossintetizantes (Ponsano et al. 2002) e estava mantida a -20°C em meio de Pfennig semissólido.

As etapas de reativação da cultura de *Rubrivivax gelatinosus* foram realizadas conforme descrito em Ponsano (2000). A liquefação da gelatina e a utilização de citrato de ferro como fonte de carbono também foram

consideradas como características diferenciais para o crescimento desta espécie (Holt et al., 2000).

O inóculo utilizado para a fase de caracterização do crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* foi preparado em duas etapas. Na primeira, uma alçada da cultura foi transferida para meio de Pfennig líquido acrescido de 0,1% das soluções de microelementos, biotina (0,0015%) e tiamina (0,005%), dando origem a um cultivo de pré-enriquecimento que foi inoculado em atmosfera de microaerofilia, temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade de 1.400 ± 200 lux. Na segunda etapa, após observar a mudança de coloração do cultivo de pré-enriquecimento para vermelho púrpura, um inóculo foi transferido em nível de 1% para provetas de vidro contendo o mesmo meio. As vidrarias foram completamente preenchidas para fornecer atmosfera de microaerofilia e incubadas em estufa DBO a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ com 1.400 ± 200 lux. O inóculo foi considerado pronto para o uso ao atingir densidade ótica de aproximadamente 0,5 a 600 nm.

2.2. Caracterização do efluente “in natura” e preparo do substrato

As amostras de efluente utilizadas como substrato no experimento foram obtidas de uma indústria de criação, abate, filetagem e congelamento de tilápias, localizado no município de Buritama-SP, com vazão diária de aproximadamente 10.000 L h^{-1} . As amostras foram colhidas sempre no período de maior produção industrial. Recipientes plásticos descartáveis mantidos sob baixa temperatura em caixas isotérmicas foram utilizados para o transporte do

efluente até o laboratório.

As amostras de efluente “in natura” foram submetidas à caracterização físicoquímica pela determinação dos parâmetros turbidez, sólidos totais, pH, nitrogênio total e óleos e graxas, de acordo com os procedimentos descritos em APHA, AWWA e WPCF (2005). A demanda química de oxigênio (DQO) foi determinada, segundo metodologia adaptado de Jirka e Carter (1975), que inclui a digestão química da amostra (reator de DQO Hach DRB200), seguida de análise colorimétrica com base na curva de calibração armazenada em espectrofotômetro apropriado (Hach DR2800).

Para o preparo do substrato, o efluente “in natura” foi filtrado (filtro rápido Gardena 1731, porosidade 50 µm) e tratado termicamente em bquer de vidro sobre placa aquecedora a 65°C/30 min, seguindo o binômio de tempo/temperatura eleito por Ponsano et al. (2008a). Em seguida, o efluente foi rapidamente resfriado para 25°C, tornando-se apto para ser utilizado como substrato.

A caracterização microbiológica do efluente “in natura” e após o tratamento físico foi conduzida por meio das contagens de mesófilos aeróbios e anaeróbicos facultativos pela técnica de *Pour Plate*, coliformes totais e fecais pelo Número Mais Provável (NMP), bolores e leveduras pela técnica de *Spread Plate* e pesquisa de *Aeromonas* spp e *Salmonella* spp, segundo os procedimentos de APHA, AWWA e WPCF (2005) e Vanderzant e Splittstoesser (1992).

2.3. Preparo da curva de crescimento, avaliação do crescimento e da capacidade despoluente

Um inóculo de *Rubrivivax gelatinosus* foi transferido em nível de 1% (v/v) para o efluente tratado termicamente e já depositado em erlenmeyer esterilizado, seguindo-se uma completa homogeneização. Em seguida, esse substrato inoculado foi distribuído em 15 provetas de vidro esterilizadas (capacidade 0,5 L) que foram fechadas e incubadas em sala com temperatura controlada de $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade de 1.400 ± 200 lux fornecida por lâmpadas incandescentes. Durante 15 dias, a iniciar pelo próprio dia de inóculo (dia zero), uma proveta da curva de crescimento foi utilizada para as análises da avaliação do crescimento e da atividade despoluente da bactéria no substrato.

Para a avaliação do crescimento, foram realizadas as determinações de massa celular e absorvância. Para a obtenção da massa celular seca, o conteúdo de uma das 15 provetas da curva de crescimento foi vigorosamente agitado e, em seguida, 20 mL foram recolhidos e centrifugados a $900 \times g$ (centrífuga ITR) por 15 min. O sobrenadante foi destinado para a determinação da DQO e o *pellet* resultante foi ressuspenso em mais cinco mL de água destilada e centrifugado novamente nas mesmas condições. Essa etapa foi repetida por mais duas vezes, sendo o sobrenadante descartado. Finalmente, o *pellet* foi ressuspenso em mais cinco mL de água destilada e transferido para cadinho de porcelana de peso conhecido e previamente desidratado. Em seguida, foi conduzido à estufa (Fanem) a 105°C durante 24 horas para

obtenção de peso constante. A determinação da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi U-1000/U-1100), utilizando-se o substrato não inoculado como branco. As determinações de pH, nitrogênio total e óleos e graxas também foram realizadas para a avaliação do crescimento, sendo obtidas diretamente do efluente inoculado (APHA, AWWA e WPCF, 2005).

A avaliação da capacidade despoluente do micro-organismo no substrato foi realizada diariamente durante todo o período de crescimento pela determinação da DQO, conforme metodologia já descrita.

Todas as análises foram realizadas em duplicata e provenientes de seis repetições representadas pelas coletas no estabelecimento industrial.

2.4. Espectro de absorção de células vivas

Os espectros de absorção de células vivas foram determinados nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 com a finalidade de monitorar a produção dos oxicarotenoides característicos de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente e, assim, monitorar a possível presença de contaminantes. Para as análises, 3,5 mL de cada cultivo foram vigorosamente homogeneizados com 5 g de sacarose e utilizados para a varredura de 200 a 1000 nm em espectrofotômetro Hitachi U-1000/U-1100. Um volume de 3,5 mL do substrato não inoculado foi adicionado de 5 g de sacarose e utilizado como branco (Ponsano et al., 2008b).

2.5. Determinação da taxa de crescimento específico

A taxa de crescimento específico foi determinada, de acordo com Sasaki

e Nagai (1979), segundo a equação 1:

$$(Eq. 1) G = \frac{\ln W^2 - \ln W^1}{T^2 - T^1} \times 100 ,$$

onde G é a taxa de crescimento específico, W^2 é a massa celular seca no tempo T^2 e W^1 é a massa celular seca no tempo T^1 .

2.6. Análise estatística

Os resultados das análises físicoquímicas do efluente “in natura” e tratado fisicamente foram avaliados pelo teste t paramétrico, utilizando-se software GraphPad InStat Versão 3.06 para verificar a influência do tratamento na composição físicoquímica final do substrato. Adotou-se o nível de significância de 5% (Vieira, 1999).

3. Resultado e Discussão

3.1. Resultados das análises no efluente “in natura” e tratado

A Tab. 1 apresenta os resultados das análises físicoquímicas realizadas nas amostras do efluente do pescado “in natura” e após serem submetidas às etapas de filtração e tratamento térmico.

O conhecimento das características físicoquímicas de um determinado efluente possui grande importância para a sua utilização como substrato no crescimento de micro-organismos desejados. Os sólidos totais, por exemplo, são compostos por substâncias que estão dissolvidas e em suspensão no efluente, podendo ser de composição orgânica e ou inorgânica. O valor da

turbidez permite o conhecimento da transparência dos efluentes e a possível presença de coloides. A importância do pH revela o caráter ácido ou básico dos efluentes e é fundamental para o controle dos processos biotecnológicos, assim como a temperatura. No caso do nitrogênio, um elemento essencial às diversas formas de vida, sua presença pode ser proveniente de detergentes sintéticos utilizados na limpeza dos equipamentos envolvidos no processamento ou aparecer como produtos de degradação de substâncias protéicas e pode causar diversos problemas quando presentes em excesso, inclusive a proliferação de plantas aquáticas nos corpos receptores e nos efluentes industriais. Os óleos e graxas estão comumente presentes nos efluentes, são facilmente oxidados produzindo odores desagradáveis e podem se originar de restaurantes industriais, oficinas mecânicas, casas de caldeiras, equipamentos que utilizem óleo hidráulico, além de matérias primas com composição oleosa como, por exemplo, a gordura de origem vegetal ou animal e os óleos minerais (Giordano, 2004; Liu, 2007). A matéria orgânica, que representa o grau de poluição de uma água residuária, pode ser conhecida indiretamente pela DQO, quantidade de oxigênio necessária para oxidar a fração orgânica de uma amostra que seja oxidável por reagentes químicos em solução ácida (Jordão e Pessôa, 1995).

O tratamento utilizado no efluente “in natura”, promoveu reduções nos valores de sólidos totais, turbidez, pH, óleos e graxas e DQO, revelados na Tab. 1. Embora, essas diminuições não tenham sido estatisticamente significativas ($p > 0,05$), compostos grosseiros como, por exemplo, escamas, muco,

esquírolas ósseas e sujidades em geral, foram retidas durante a filtração. Por outro lado, o aumento verificado no teor de nitrogênio total provavelmente se deve à liberação de compostos como aminoácidos e peptídeos em função da aplicação de calor durante o tratamento térmico, apesar desse aumento também ter sido não significativo ($p > 0,05$).

Sabe-se que as características dos efluentes industriais são inerentes à composição das matérias primas, das águas de abastecimento e do processo industrial (Liu, 2007). Prasertsan et al. (1993b), em estudos com diferentes efluentes de indústria de processamento de pescados, observaram em suas análises físicoquímicas, pH variável de 8,30 a 5,30, DQO entre 157.080 mg L⁻¹ e 5.950 mg L⁻¹, sólidos totais entre 82,22 g L⁻¹ e 19,30 mg L⁻¹ e óleos e graxas de 32.182 mg L⁻¹ a 666 mg L⁻¹. Em estudos realizados por Azad et al. (2001, 2003), pH entre 6,2 e 6,3, DQO de 63.000 mg L⁻¹ e nitrogênio total de 10,88 mg L⁻¹ foram observadas em efluentes “in natura” e não sedimentados de indústria de processamento de sardinha da Malásia. No geral, Giordano (2004) apresenta valores de pH entre 6,2 e 7,0, DQO média de 4.300 mg L⁻¹ e um teor de óleos e graxas superiores a 800 mg L⁻¹ para efluentes proveniente de indústria de pescados.

Os valores de pH encontrados para o efluente em estudo foram superiores aos relatados pela literatura analisada, provavelmente em função do uso de detergentes alcalinos para a lavagem de equipamentos, utensílios e instalações e que acabam por estar presentes nas águas residuárias no ponto de coleta das amostras. Em contrapartida, a DQO encontrada no efluente de

processamento de tilápias se apresentou abaixo dos valores descritos pelos autores citados. Este, no entanto, é um valor variável, altamente influenciado pelo tipo de pescado e pelo tipo de processamento industrial. Na indústria em que foram colhidas as amostras, não faziam parte do efluente as escamas, a carcaça e as vísceras das tilápias, pois, durante a filetagem, esses resíduos eram direcionados para a graxaria onde eram submetidos aos processos de obtenção de farinha de peixe. Prasertsan et al. (1997) já comentavam a respeito da variabilidade de parâmetros físicoquímicos observados em dejetos industriais decorrentes do tipo e tamanho do pescado, tipo de processamento industrial, o local e hora de coleta do efluente.

Os resultados encontrados na avaliação microbiológica do efluente “in natura” e após a aplicação dos tratamentos estão demonstrados na Tab. 2. A presença desses grupos microbianos no efluente cru indica as condições sanitárias envolvidas nos processos de obtenção e processamento de produtos alimentícios (Franco e Landgraf, 1996). Embora os números encontrados não sejam elevados, a inexistência de parâmetros microbiológicos legais referentes a esses micro-organismos indicadores em efluentes líquidos no estágio em que as amostras foram colhidas impede uma discussão aprofundada sobre as condições sanitárias durante as etapas de processamento do pescado. A Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) estabelece as condições e padrões para o lançamento de efluentes em corpos receptores, entretanto, não estabelece limites microbiológicos. De acordo com referida Resolução, os efluentes líquidos de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados

nos corpos de água, direta ou indiretamente, desde que apresentem pH entre 5 e 9, temperatura inferior a 40°C e ausência de materiais flutuantes, dentre outros parâmetros.

Aeromonas sp foi detectada em uma das repetições de coleta do efluente “in natura”. As bactérias que compõem o gênero *Aeromonas* são habitantes naturais de ambientes aquáticos em todo o mundo e podem habitar livremente o intestino dos peixes; sua população possui uma variabilidade sazonal, com maior presença em meses mais quentes do ano, fato que coincide com a época das coletas na indústria (Franco e Landgraf, 1996; Vieira, 2003; APHA, AWWA e WPCF, 2005). Algumas espécies tais como *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, podem ser responsáveis por infecções fatais em peixes, causando perdas econômicas significativas à aquicultura (Vieira, 2003; Maluping et al., 2005) e algumas têm sido descritas como patógenos emergentes responsáveis por infecções intestinal e extraintestinal no homem após o consumo de água ou alimentos contaminados (Vieira, 2003; Pereira et al., 2004; Maluping et al., 2005). Portanto, a presença desse gênero no efluente cru alerta para a necessidade de controles periódicos das águas do criatório a fim de evitar prejuízos financeiros à indústria e riscos à saúde do consumidor.

Salmonella sp também foi detectada em duas das coletas do efluente industrial. Essas bactérias são amplamente distribuídas na natureza, sendo seu principal reservatório, o trato intestinal do homem e animais de sangue quente e sangue frio, exceto peixes, moluscos e crustáceos, os quais podem contaminar-se após a pesca (Vieira, 2003). Os testes bioquímicos utilizados na

identificação da bactéria indicaram a presença de *Salmonella entérica* subsp. *entérica* sorotipo *Typhi*. A ocorrência desse micro-organismo representa um risco potencial para a saúde pública e, além disso, revela condições sanitárias insuficientes durante a manipulação do pescado na indústria, visto que o homem é o reservatório natural deste sorotipo, responsável pelo quadro infeccioso denominado “febre tifoide”, que pode ser transmitida por meio da água e de alimentos contaminados com material fecal humano (Franco e Landgraf, 1996).

O tratamento térmico realizado no efluente foi capaz de eliminar todos os micro-organismos patogênicos. Além disso, propiciou um substrato adequado para o crescimento de *Rubrivivax gelatinosus*, que se desenvolveu fornecendo coloração avermelhada aos cultivos, indício de produção de pigmentos carotenoides da série espiriloxantina alternativa, próprios de seu metabolismo (Ponsano et al., 2002).

3.2. Curvas de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus*

3.2.1. Produção de massa celular bacteriana

A maior produção de massa celular foi observada no terceiro dia, com $0,273 \text{ g L}^{-1}$. O comportamento da massa celular observado na Fig. 1 mostra picos de produção de biomassa que são acompanhados pelos valores de absorvância, paralelamente avaliada. As oscilações aconteceram aproximadamente dentro de um intervalo de 72 horas para ambos os parâmetros. Ponsano et al. (2008), avaliando o crescimento fototrófico de

Rubrivivax gelatinosus durante 12 dias em efluente de abatedouro avícola, também observaram oscilações nas curvas de produção de biomassa e que foram acompanhadas pelo comportamento da absorvância nesse período. Azad et al. (2003), em estudos com resíduos da indústria de processamento de sardinha, demonstraram que a bactéria fotossintetizante *Rhodovulum sulfidophilum*, pré-cultivada em meio sintético enriquecido sob diferentes concentrações de inóculo, apresentou, após 72 horas de cultivo no substrato industrial, diferenças na produção de massa celular. Naquele estudo, as máximas produções de massa celular foram observadas com 120 horas de cultivo quando foram utilizados inóculos a 20% e 30% (v/v) preparados em meio sintético. Inóculos maiores representam maior quantidade de bactérias para utilizarem os nutrientes disponíveis pelo substrato e, conseqüentemente, levam a uma maior produção de massa celular. Entretanto, segundo Prasertsan et al. (1997), a competição existente entre as próprias bactérias e a liberação de alguns produtos metabólicos podem justificar as constantes quedas de produção de biomassa. Esse fato pode explicar os comportamentos de produção de massa celular e da DQO, encontrados nesse estudo.

A composição físico-química do efluente “in natura” utilizado nesse processo biotecnológico pode ter influenciado na baixa produção de massa celular, pois em trabalhos que utilizaram suplementação, inóculos maiores e substratos dotados de altas concentrações de material orgânico, observou-se uma maior produção de massa celular (Prasertsan et al., 1997; Azad et al., 2001; Azad et al., 2003).

Prasertsan et al. (1993a) apontam a presença de oxigênio para favorecer a produção de células devido à completa oxidação dos substratos realizada pelo Ciclo de Krebs. Já em sistemas anaeróbicos, ocorre predominância do catabolismo (uso do material orgânico para gerar energia) sobre o anabolismo (uso do material orgânico para gerar novas células) (Von Sperling, 1995), o que justifica a baixa produção de massa celular encontrada nesse experimento. Além disso, nos sistemas aeróbicos, a presença de oxigênio prejudica a produção de pigmentos carotenoides e atua como agente branqueador (Prasertsan et al., 1993a), o que reforça o uso de atmosfera de anaerobiose ou microaerofilia quando se deseja obter tais pigmentos.

3.2.2. Comportamento do pH, nitrogênio total e óleos e graxas

Na Fig. 2, observa-se que o potencial hidrogeniônico apresentou uma queda inicial seguida de uma elevação que, após o terceiro dia de cultivo, manteve-se entre 7,8 e 8,2. Kantachote et al. (2005) também relataram o aumento de pH em cultivos de bactérias fotossintetizantes, semelhante ao ocorrido nesse trabalho. Segundo estes autores, a amonificação, ou seja, conversão do nitrogênio orgânico em íon amônio, poderia ser uma causa provável para esse aumento de pH. Segundo Liu (2007), águas residuárias de indústria de processamento de pescado contêm quantidades significativas de proteínas que, no tratamento biológico, são convertidas em peptídeos, aminoácidos e amônia, o que, conseqüentemente, leva ao aumento do pH no substrato.

O teor de nitrogênio total avaliado no cultivo da bactéria no substrato apresentou, inicialmente, 935 mg L⁻¹. Do primeiro ao último dia de cultivo, observou-se uma redução total de 28,72%, indicando a possível utilização de compostos nitrogenados para seu metabolismo (Fig. 3). Segundo Oda et al. (2004), BPNS são capazes de secretar proteinases extracelulares em cultivos sob condições de anaerobiose e luminosidade com temperatura de 35°C, o que parece ter ocorrido neste experimento com *Rubrivivax gelatinosus*. Essa atividade representa uma importante ferramenta na redução do nitrogênio existente nos efluentes industriais. A utilização de compostos nitrogenados por bactérias fotossintetizantes representa uma grande vantagem para processos de despoluição de efluentes líquidos industriais, pois a diminuição de nitrogênio total nesses resíduos, antes de ser lançado em corpos d'água, é de fundamental importância para impedir o fenômeno da eutrofização, altamente prejudicial para a vida aquática (Sawayama et al., 2000; Kantachote et al. 2005).

A Fig. 4 apresenta os valores obtidos das análises de óleos e graxas no substrato e demonstra, inicialmente, 1.053 mg L⁻¹. No 4º dia de cultivo, observou-se uma diminuição de 70,21%, decorrente da utilização da matéria orgânica para o metabolismo do micro-organismo. Posteriormente, acréscimos foram observados, sendo que, ao final da curva de crescimento, verificou-se uma redução total de 38,01% do valor inicial ao 15º dia de cultivo. Esse aumento pode ter ocorrido em função da produção de oxicarotenoides bacterianos que apresentam caráter lipídico em função de sua estrutura

derivada de compostos terpenoides (Margalith et al., 1992; Ausich, 1997; Breithaupt, 2007; Ogawa et al., 2007). Portanto, acredita-se que a técnica utilizada para a extração de óleos e graxas, tenha provocado a desintegração da estrutura celular da bactéria e, dessa forma, permitindo a extração dos pigmentos carotenoides juntamente com os demais componentes lipídicos do cultivo. As amostras destinadas para a determinação de óleos e graxas representavam todo o material presente no meio de cultura, incluindo-se o substrato e a massa celular; logo, maiores reduções lipídicas poderiam ser encontradas removendo-se a biomassa do cultivo.

3.2.3. Capacidade despoluente de *Rubrivivax gelatinosus*

Durante os 15 dias de caracterização do crescimento de *Rubrivivax gelatinosus*, o comportamento da DQO, ilustrado na Fig. 5, revelou a capacidade despoluente da bactéria pela redução média de 42,75% do total de matéria orgânica. Além disso, as análises revelaram que o menor valor da DQO, 517 mg L⁻¹, foi observado no sétimo dia do crescimento bacteriano, representando 51,28% da redução em comparação com o valor inicial do cultivo.

Prasertsan et al. (1997), trabalhando com efluente de indústria de processamento de atuns, obteve reduções de DQO entre 24% e 59%, sendo esta última com a necessidade de suplementação do substrato e controle de pH. Azad et al. (2003) alcançaram uma redução na DQO do efluente de indústria de processamento de sardinha da ordem de 83% utilizando

Rhodovulum sulfidophilum. No entanto, estes autores realizaram a autoclavagem do substrato e trabalharam com um inóculo de 10% da bactéria para conseguir tal efeito. Recentemente, Ponsano et al. (2008b) conseguiram uma redução de 91% trabalhando com *Rubrivivax gelatinosus*, em efluente de abatedouro de frangos, porém, incluindo a etapa de microfiltração do substrato para obter a amostra destinada à determinação da DQO. Portanto, a simplicidade no cultivo realizado neste trabalho mostrou-se de grande importância, visto que possibilitou o crescimento da bactéria fotossintetizante aliada à decomposição da matéria orgânica.

3.2.4. Espectro de absorção de células vivas

O espectro de absorção de células vivas foi determinado com o objetivo de verificar a presença de contaminantes no substrato, pela alteração nos picos de absorção característicos dos pigmentos fotossintetizantes de *Rubrivivax gelatinosus*. Os pigmentos fotossintetizantes produzidos pela bactéria incluem a bacterioclorofila *a* e carotenoides da série espiriloxantina alternativa, cujos principais componentes são esferoidene, hidroxiesferoidene e espiriloxantina (Holt et. al. 2000). Os resultados indicaram picos máximos em 380-385, 480, 500-505, 590, 805 e 865 nm, compatíveis com dados apresentados na literatura (Imhoff e Truper, 1989; Prasertsan et al. 1993a; Ponsano et al. 2002; Ponsano et al. 2008b), o que indica que qualquer tipo de contaminante presente no substrato foi suplantado pelo desenvolvimento da bactéria inoculada.

3.2.5. Determinação da taxa de crescimento específico

A maior taxa de crescimento específico, $0,188 \text{ h}^{-1}$, foi observada com 48 horas de cultivo, ou seja, no período inicial da curva de crescimento. Este fato pode ser explicado pela maior disponibilidade de matéria orgânica para o crescimento microbiano no substrato, menor concorrência entre as células pelos compostos orgânicos e pouca produção de metabólitos oriundos do metabolismo no período. Azad et al. (2003) e Ponsano et al. (2008b), trabalhando com micro-organismos fotossintetizantes em efluentes de indústria de processamento de sardinhas e de abatedouro de frangos, respectivamente, também encontraram máximo crescimento celular nesse mesmo período. Além disso, com 48 horas de cultivo, observou-se uma rápida redução da DQO conforme ilustrado na Fig. 5, indicando que os compostos orgânicos consumidos no período foram direcionados para a síntese de células com a consequente despoluição do meio. Getha et al. (1998), trabalhando com resíduo de indústria de alimentos também encontraram maior redução na DQO em período de tempo semelhante.

4. Conclusão

O efluente de indústria de processamento de tilápias apresentou-se como um substrato adequado para o cultivo da bactéria fotossintetizante *Rubrivivax gelatinosus*. A bactéria cresceu no efluente, produziu massa celular, diminuiu o nitrogênio total e reduziu a carga orgânica, evidenciada pelos resultados da concentração de lipídeos e da DQO. A maior produção de massa

celular ocorreu no terceiro dia de cultivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo Nº 07/54732-1) pelo auxílio financeiro prestado na realização desse projeto de pesquisa e à indústria Tilápia do Brasil S/A pelo fornecimento do efluente industrial.

Referências

APHA, AWWA e WPCF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Twenty one ed. American Public Health Association, Washington.

Ausich, R.L., 1997. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. Pure Appl. Chem. 69, 10, 2169–2173.

Azad, S.A., Vikineswary, S., Chong, V.C., Ramachandran, K.B., 2003. *Rhodovulum sulfidophilum* in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. Lett. Appl. Microbiol. 38, 13-18.

Azad, S.A., Vikineswary, S., Ramachandran, K.B., Chong, V.C., 2001. Growth and production of biomass of *Rhodovulum sulfidophilum* in sardine processing

wastewater. Lett. Appl. Microbiol. 33, 264-268.

Azevedo, J.L., 1998. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (Eds.), Ecologia microbiana. Embrapa CNPMA, Jaguariúna, pp. 445-461.

Brasil, 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 18 de março de 2005. 53, 58-63.

Breithaupt, D.E., 2007. Modern application of xanthophylls in animal feeding: a review. Trends Food Sci. Technol. 18, 501-506.

Boscardin, N.R., 2008. A produção aquícola brasileira, In: Ostrensky, A., Borghetti, A.J.R., Soto, D. (Eds.), Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, Brasília, pp. 27-73.

Cecchi, H.M., 2003. Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos, second ed. Unicamp, Campinas.

Choorit, W., Thanakoset, P., Thongpradistha, J., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N., 2002. Identification and cultivation of photosynthetic bacteria in wastewater from a concentrated latex processing factory. *Biotechnol. Lett.* 24, 1055-1058.

Franco, B.D.G.M., Landgraf, M., 1996. *Microbiologia dos alimentos*. Atheneu, São Paulo.

Getha, K., Vikineswary, S., Chong, V.C., 1998. Isolation and growth of the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain B1 in sago-starch-processing wastewater. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14 (4), 505–511.

Giordano, G., 2004. Tratamento e controle de efluentes industriais [Monografia na internet]. Departamento de Engenharia Sanitária e Meio Ambiente, UERJ, Rio de Janeiro. [Citado em 2009 fev. 10] <[http://www.ufmt.br/esa/Modulo II Efluentes Industriais/Apost EI 2004 1ABES Mato Grosso U FMT2.pdf](http://www.ufmt.br/esa/Modulo%20II%20Efluentes%20Industriais/Apost%20EI%202004%201ABES%20Mato%20Grosso%20UFMT2.pdf)>.

Guerrero, L., Omil, F., Méndez, R., Lema, J.M., 1998. Protein recovery during the overall treatment of wastewaters from fish-meal factories. *Bioresour. Technol.* 63, 221-229.

Gurpilhares, D.B., Hasmann F.A., Pessoa Jr, A., 2008. Microbiologia industrial: micro-organismos como unidade de produção. *Microbiologia in foco.* 2, 33-43.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Imhoff, J.P., Trüper, H.G., 1989. Purple nonsulfur bacteria. In: Staley, J.T. (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, eight ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1635–1709.

Jirka, A.M., Carter, M.J., 1975. Micro semi-automated analysis of surface and wastewaters for chemical demand oxygen. *Analyt. Chem.* 47, 1937.

Jordão, E.P., Pessoa, C.A., 1995. *Tratamento de esgotos domésticos*. Third ed. ABES, Rio de Janeiro. (vol.1).

Kantachote, D., Torpee, S., Umsakul, K., 2005. The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electr. J. Biotechnol.* 8, 314–323.

Lima, L.K.F., Pinto, M.F., Ponsano, E.H.G., 2008. Produtividade e redução da carga poluente na obtenção de biomassa em resíduo de processamento de pescado. In: *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos e XV Simpósio Latino Americano e do Caribe de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Belo Horizonte. CD-ROM.

Lucion, A.P.S., Siedemberger, D.R., Marasca, E.N., Teixeira, U.M., 2006. Desenvolvimento Sustentável: o desafio da sociedade contemporânea, Biotec. Ciênc. Desenv. 36, 70-77.

Liu, S.X., 2007. Food and agricultural utilization and treatment. First ed., Blackwell, Ames.

Maluping, R.P., Lavilla-Pitogo C.R., Depaola, A., Janda, J.M., Krovacek, K., Greko, C., 2005. Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* and *Plesiomonas shigelloides* isolated in the Philippines and Thailand. Inter. J. Antimicrobial. Agent. 25, 348-350.

Margalith, P.Z., 1992. Pigment microbiology. Chapman & Hall, New York.

Nogueira, A., 2007. Criação de tilápias em tanques-rede, SEBRAE, Bahia. [Citado em 2009 fev. 10] <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BD_S.nsf/7227D4D9D30AB6CC832573A9006DF4BC/\\$File/NT0003737A.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BD_S.nsf/7227D4D9D30AB6CC832573A9006DF4BC/$File/NT0003737A.pdf)>.

Oda, K., Tanskul, S., Oyama, H., Noparatnaraporn, N., 2004. Purification and characterization of alkaline serine proteinase from photosynthetic bacterium *Rubrivivax gelatinosus* KDDS1. Biosc. Biotechnol. Biochem. 68, 650-655.

Ogawa, M., Maia, E.L., Fernandes, A.C., Nunes, M.L., Oliveira, M.E.B., Freitas,

S.T., 2007. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenoides. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27, 786-792.

Pereira, C.S., Possas, C.A., Viana, C.M., Rodrigues, D.P., 2004. *Aeromonas spp.* e *Pleisiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24, 562-566.

Pereira, J.A., 2002. Geração de resíduos industriais e controle ambiental. [Monografia na internet], Centro Tecnológico da Universidade Federal do Pará. [citado em 2009 feb. 10] <http://www2.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011213_01.pdf>.

Ponsano, E.H.G., 2000. Avaliação da capacidade pigmentante de biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* em frangos de corte. PhD Thesis, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, Brasil.

Ponsano, E.H.G., Lacava, P.M., Pinto, M.F., 2002. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45, 445–449.

Ponsano, E.H.G., Lacava, P.M., Pinto, M.F., 2003. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse

wastewater. Braz. Arch. Biol. Technol. 46 (2), 143–147.

Ponsano, E.H.G., Lima, L.K.F., Pinto, M.F., 2008a. Tratamento térmico de efluente de processamento de pescado para o cultivo de bactéria fotossintetizante. In: Anais do XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos e XV Simpósio Latino Americano e do Caribe de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte. CD-ROM.

Ponsano, E.H.G., Paulino, C.Z., Pinto, M.F., 2008b. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. Bioresour. Technol. 99, 3836-3842.

Ponsano, E.H.G., Pinto, M.F., Garcia Neto, M., Lacava, P.M., 2004a. Performance and color of broilers fed diets containing *Rhodocyclus gelatinosus* biomass. Braz. J. Poult. Sci. 6 (4), 237–242.

Ponsano, E.H.G., Pinto, M.F., Garcia Neto, M., Lacava, P.M., 2004b. *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for egg yolk pigmentation. J. Appl. Poult. Res. 13 (3), 421–425.

Prasertsan, P., Choorit, W., Suwanno, S., 1993a. Isolation, identification and growth conditions of photosynthetic bacteria found in seafood processing wastewater. World J. Microbiol. Biotechnol. 9, 590–592.

Prasertsan, P., Choorit, W., Suwanno, S., 1993b. Optimization for growth of *Rhodocyclus gelatinosus* in seafood processing effluents. World J. Microbiol. Biotechnol. 9, 593-596.

Prasertsan, P., Jaturapornpipat, M., Siripatana, C., 1997. Utilization and treatment of tune condensate by photosynthetic bacteria. Pure Appl. Chem. 69, 2439–2445.

Sasaki, K., Nagai, S., 1979. The optimum pH and temperature for the aerobic growth of *Rhodopseudomonas gelatinosa* and vitamin B12 and ubiquinone formation on a starch medium. J. Ferment. Technol. 57, 383–386.

Sasaki, K., Noparatnaraporn, N., Hayashi, M., Nishizawa, Y., Nagai, S., 1981. Single-Cell protein production by treatment of soybean wastes with *Rhodopseudomonas gelatinosa*. J. Ferment. Technol. 59, 471-477.

Sawayama, S., Hanada, S., Kamagata, Y., 2000. Isolation and characterization of phototrophic bacteria growing in lighted up flow anaerobic sludge blanket reactor. J. Biosci. Bioeng. 89, 396-399.

Souza, M.A., Vidotti, R.M; Oliveira Neto, A.L., 2008. Redução no consumo de efluente gerado em abatedouro de tilápia do nilo através da implantação de conceitos de produção mais limpa (P+L). Bol. Inst. Pesc. 34, 289-296.

Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F., 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3^a ed. American Public Health Association, Washington.

Vieira, S., 1999. Estatística experimental. second ed. Atlas, São Paulo.

Vieira, R.H.S.F., 2003. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado. Varela, São Paulo.

Von Sperling, M., 1995. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. second ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, Belo Horizonte. (vol. 1)

Zheng, S., Yang, M., Yang, Z., 2005. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. Bioresour. Technol. 96, 1183–1187.

Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Características físicas e químicas do efluente de indústria de processamento de pescado¹

Parâmetros físico-químicos²	Efluente “in natura”	Efluente tratado³
Quantidade (L dia ⁻¹)	120.000	-
Vazão (L h ⁻¹)	11.000 a 15.000	-
Temperatura (°C)	20,3 ± 0,23	-
Sólidos totais (g L ⁻¹)	1,5 ± 0,32	1,3 ± 0,26
Turbidez (UT)	35,7 ± 2,25	31,0 ± 0,77
pH	9,4 ± 0,09	9,1 ± 0,06
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹)	813,3 ± 54,65	820 ± 121,74
Óleos e graxas (mg L ⁻¹)	1.166,3 ± 68,52	1.052,3 ± 3,58
DQO (mg L ⁻¹)	1.127,5 ± 33,84	1.074 ± 34,15

¹ Valores médios e respectivos erros padrões das médias provenientes de seis repetições. ² Valores não significativos ($p > 0,05$) entre efluente “in natura” e efluente tratado. ³ Filtração (50 µm)/tratamento térmico (65 °C/30 min).

Tabela 2 - Características microbiológicas do efluente de indústria de processamento de pescado¹

Análises microbiológicas	Efluente “in natura”	Efluente tratado²
Mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativas (UFC* ml ⁻¹)	8,5 x 10 ⁵	7,0
Bolores e leveduras (UFC ml ⁻¹)	4,6 x 10 ³	6,0
Coliformes a 35 °C (NMP** ml ⁻¹)	1,0 x 10 ⁵	<1,0
Coliformes a 45 °C (NMP ml ⁻¹)	0,41	<1,0

¹ Valores médios ²Filtração (50 µm)/tratamento térmico (65 °C/30 min).

* Unidades formadoras de colônias. ** Número Mais Provável.

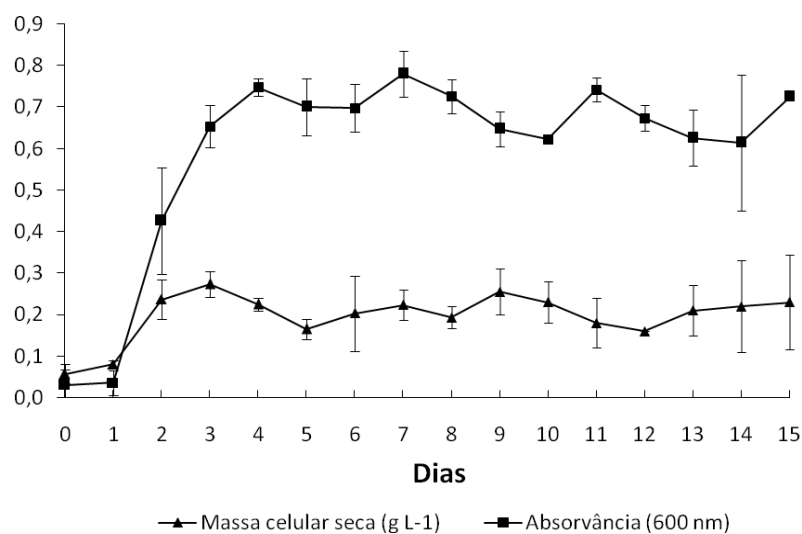


Figura 1. Evolução da concentração de massa celular seca e da absorvância durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial.

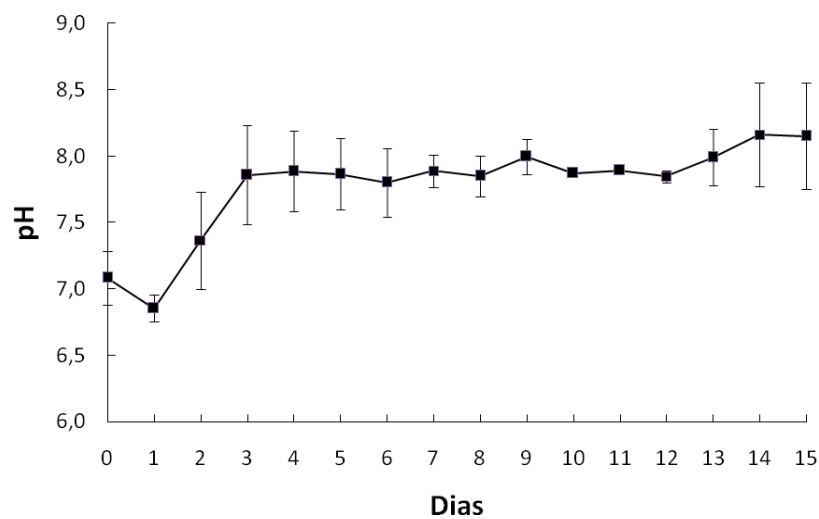


Figura 2. Evolução dos valores de pH durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial.

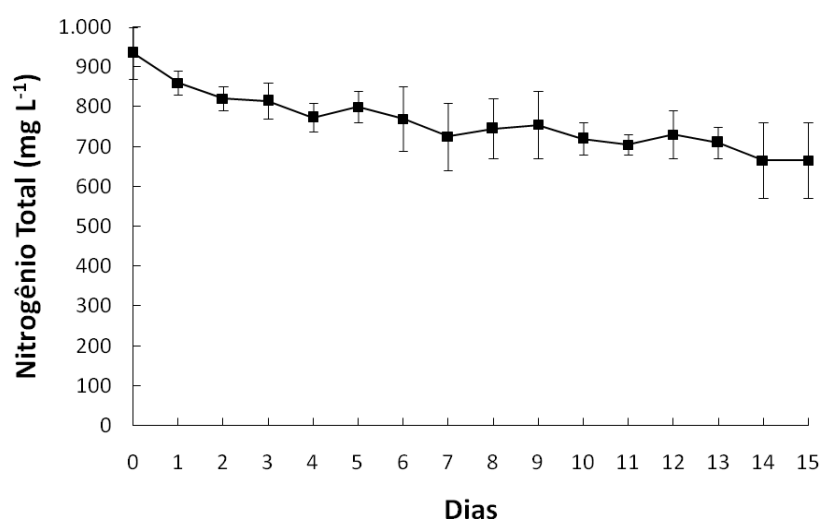


Figura 3. Evolução da concentração de nitrogênio total durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial.

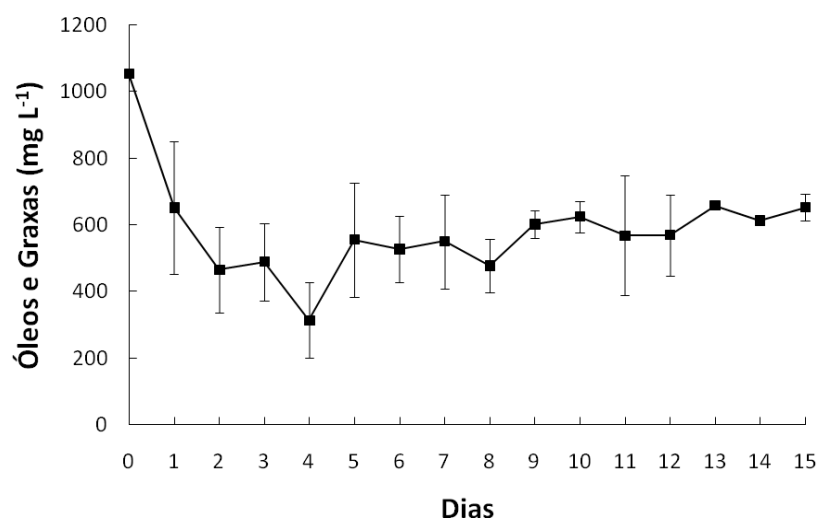


Figura 4. Evolução da concentração de óleos e graxas durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial

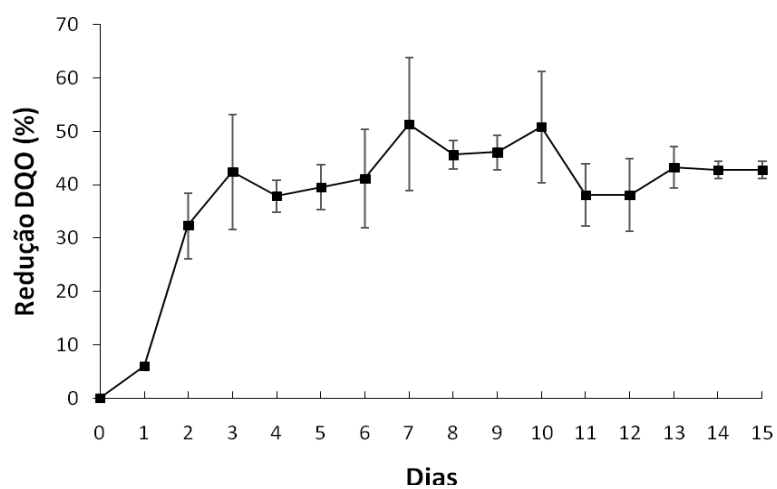


Figura 5. Porcentagens de redução da DQO durante a curva de crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* no efluente industrial.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO: MICROFILTRAÇÃO TANGENCIAL E CENTRIFUGAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E REDUÇÃO DA DQO EM EFLUENTE INDUSTRIAL CULTIVADO COM *Rubrivivax gelatinosus*

**Microfiltração tangencial e centrifugação para a determinação da
produção de biomassa e redução da DQO em efluente industrial cultivado
com *Rubrivivax gelatinosus***

Leandro Kanamaru Franco de Lima^a, Elisa Helena Giglio Ponsano^a

^a Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Curso de Medicina
Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Unesp. 793 Clóvis Pestana,
Araçatuba, SP, 16050-680, Brasil.

Resumo

Ultimamente, tem se observado uma crescente busca por formas viáveis e factíveis para o tratamento de efluentes industriais. A utilização de micro-organismos fotossintetizantes representa uma alternativa biotecnológica atrativa, pois possibilita a redução da carga poluente dos resíduos líquidos e gera uma massa celular com potencial de aplicação. Entretanto, para a remoção da massa celular gerada no processo, é necessário o emprego de tecnologias específicas. Dessa forma, dois processos tecnológicos foram testados com o objetivo de verificar a melhor produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* cultivada em reatores biológicos durante 10 dias. Adicionalmente, avaliou-se a remoção da carga poluente e comparou-se a cor das massas celulares obtidas com a de um produto comercial. Os processos foram denominados A (utilizando-se centrifugação) e B (utilizando-se

microfiltração tangencial) e o cultivo foi realizado sob anaerobiose, temperatura $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e luminosidade 2.000 ± 500 lux fornecida por lâmpadas incandescentes alocadas no interior dos bioreatores. Pelos resultados, observou-se uma produtividade de $0,043 \text{ g biomassa L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e redução de 52,51% da DQO no processo A. Em B, observou-se, respectivamente, $0,079 \text{ g biomassa L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e 81,25%. As biomassas e o produto comercial apresentaram semelhante luminosidade e tonalidade. Entretanto, houve diferença na saturação da cor entre o produto obtido da microfiltração e o comercial. Este trabalho conclui que o sistema de microfiltração por membrana foi o melhor método para a obtenção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, promovendo uma alta redução da matéria orgânica no efluente industrial.

Palavras-Chave: Biotecnologia, bactéria, efluente de indústria pesqueira, demanda química de oxigênio, colorimetria.

Abstract

Recently, there have been an increasing search for viable and feasible ways to treat industrial wastewater. The use of phototropic microorganisms is an attractive biotechnological alternative because it reduces the pollutant load of effluents and provides an useful biomass. However, for the removal of the cell mass raised with the process it is necessary to use specific technologies. Thus, two technological processes were tested in order to determine the higher production of *Rubrivivax gelatinosus* biomass cultivated in two biological reactors for 10 days. Additionally, pollutant load decrease was evaluated and

the colors of biomasses and of a commercial product were compared. The processes were named A (centrifugation process) and B (cross-flow microfiltration). Bacterial cultivation was carried out under anaerobiosis, $30 \pm 5^\circ\text{C}$ and $2,000 \pm 500$ lux provided by incandescent lamps placed inside the bioreactors. Results showed $0.043 \text{ g biomass L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ productivity in process A with COD decrease of 52.51% and $0.079 \text{ g biomass L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ in process B with 81.25% COD reduction. The biomass and the commercial product had similar lightness and hue. However, there was a difference in color saturation between the microfiltration product and the commercial pigmentant. This work concluded that cross-flow microfiltration was the best method for obtaining *Rubrivivax gelatinosus* biomass, providing the higher decrease of organic matter in the industrial effluent.

Keywords: Biotechnology, bacteria, fishing industry effluents, chemical oxygen demand, colorimetry.

1. Introdução

A indústria de alimentos é caracterizada por apresentar um alto consumo de água nas diferentes etapas do seu processamento industrial (Casani et al., 2005). Consequentemente gera-se grande quantidade de resíduos líquidos poluentes em função da presença de sólidos orgânicos cujo despejo em cursos d'água por um longo período, sem o devido tratamento, provoca alterações do ecossistema local, levando ao aparecimento de doenças e mortes de peixes, além de odores desagradáveis (Liu, 2007). Segundo Souza et al. (2008), o

consumo de recursos hídricos em indústrias de processamento de pescados pode chegar, em média, a 1,18 litros por quilograma de peixe produzido. Em relação ao total de efluente líquido gerado, Aspé et al. (1997) relataram um fluxo de 5.000 a 10.000 litros de efluente por tonelada de peixe beneficiado para uma planta industrial de capacidade de produção entre 100 a 1.200 toneladas de peixe. Nesse mesmo trabalho, os autores caracterizaram um efluente proveniente de indústrias que processam pescados e encontraram um pH 4,5, DQO com 6.000 mg L⁻¹, sólidos totais com 39.000 mg L⁻¹ e nitrogênio total com 540 mg L⁻¹ mostrando que essas águas residuárias são detentoras de alta carga poluente e, dessa forma, necessitam de tratamento.

A utilização de bactérias fotossintetizantes para o tratamento biológico de efluentes industriais tem sido estudada, principalmente, pela capacidade despoluente desses micro-organismos e pela geração de uma biomassa bacteriana de alto valor nutricional (Azad et al., 2001; 2003; Choorit et al., 2002; Getha et al., 1998; Kantachote et al., 2005; Ponsano et al., 2003; Sasaki et al., 1981). Para a determinação da produtividade do processo de obtenção da biomassa de cultivos onde se utilizam bactérias fototróficas, há a necessidade do emprego de tecnologias que promovam a remoção da massa celular do substrato. Os trabalhos acima citados fizeram uso da centrifugação como etapa principal para esse processamento.

O sistema de microfiltração tangencial é um processo de filtração por membranas onde o afluente é bombeado por um tubo em direção paralela à superfície de membrana filtrante, gerando uma velocidade de escoamento

tangencial do substrato que impulsiona o conteúdo limitando a formação de um sedimento estático no filtro. Isto confere vantagens em relação à filtração convencional pela maior rapidez no processo (Al-Malack e Anderson, 1997; Vidal, 2006).

A utilização da microfiltração por membranas, segundo Judd e Jefferson (2003), pode ser uma alternativa no tratamento de efluentes domésticos e industriais para a remoção de material orgânico dissolvido e micro-organismos. Estudos conduzidos por Al-Malack e Anderson (1997) e Al-Malack (2003), avaliaram o uso da microfiltração tangencial como alternativa para o tratamento de águas residuárias. Naquele estudo, parâmetros de qualidade do permeado, dificuldades operacionais e aspectos econômicos foram investigados e os resultados mostraram uma melhor qualidade do permeado, representado pela baixa quantidade de material poluente, baixa dificuldade de operação e o custo do sistema se mostrou inferior à utilização de outros tratamentos. Elmaleh e Abdelmoumni (1998) avaliaram a utilização de uma unidade de microfiltração para o pós-tratamento de efluente proveniente de um reator anaeróbico. Os autores encontraram 95% de redução da carga orgânica total e com remoção completa dos sólidos suspensos. Os módulos de microfiltração utilizados possuíam poros de 0,2 e 0,14 μm . Recentemente, Jeison et al. (2008) encontraram resultados satisfatórios trabalhando com membrana filtrante acoplada em reator anaeróbico com o objetivo de aumentar a eficiência de remoção de biomassa de bactérias em efluente sintético salino, detentor de alta concentração de sódio.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de dois processos tecnológicos (centrifugação e microfiltração tangencial) para a recuperação de biomassa e a remoção da carga poluente do efluente de uma indústria de abate e processamento de tilápias.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismo, reativação e preparo do inóculo

A bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus* utilizada nesse trabalho foi previamente isolada de efluente de abatedouro avícola e caracterizada com base em testes bioquímicos, morfológicos e pelo espectro de absorção de pigmentos fotossintetizantes (Ponsano et al., 2002) e estava mantida a -20°C em meio de Pfennig semissólido. As etapas de reativação da bactéria foram realizadas conforme descrito em Ponsano (2000). A liquefação da gelatina e a utilização de citrato de ferro como fonte de carbono foram consideradas como características diferenciais para o crescimento desta espécie (Holt et al., 2000).

O preparo do inóculo foi desenvolvido em duas fases. Na primeira, uma alçada da cultura-estoque da bactéria foi transferida para tubos contendo meio de Pfennig líquido acrescido de 0,1% das soluções de microelementos, biotina (0,0015%) e tiamina (0,005%). Esse cultivo, denominado de pré-enriquecimento, foi incubado em anaerobiose, temperatura $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade 1.400 ± 200 lux. A segunda fase iniciou-se após ter sido observado o crescimento do micro-organismo nos tubos pela alteração da coloração do meio para a cor rosa. Nessa etapa, o cultivo de pré-

enriquecimento foi adicionado, em nível de 1%, a provetas de vidro que continham o mesmo meio sintético. Foram mantidas as mesmas condições de incubação. O inóculo pronto para o uso foi considerado ao atingir densidade ótica de aproximadamente 0,5 a 600 nm avaliado em espectrofotômetro (Hitachi U-1000/U-1100). Foi considerado como branco, o meio Pfennig líquido sem o cultivo da bactéria.

2.2. Substrato para o crescimento da bactéria

As amostras de efluente foram obtidas no período de maior produção industrial de uma indústria de criação, abate, filetagem e congelamento de tilápias localizado no município de Buritama-SP e com vazão diária de aproximadamente 10.000 L h⁻¹. Galões plásticos de 50 litros, mantidos sob baixa temperatura em caixas isotérmicas, foram utilizados para o transporte das amostras até o laboratório. Em seguida, o efluente “in natura” foi filtrado em filtro rápido (Gardena 1731 de porosidade 50 µm), para a remoção dos sólidos grosseiros, e tratado termicamente a 65°C/30 min em tanque de pasteurização lenta (Incomar), seguido de resfriamento para 4°C, estando apto a ser utilizado como substrato para o crescimento do micro-organismo nos reatores.

2.3. Reatores e as condições dos cultivos

Dois reatores foram elaborados fixando-se uma coluna de vidro com dimensões (base x largura x altura) 0,25 m x 0,25 m x 0,84 m a uma caixa de vidro de dimensões 0,48 m x 0,49 m x 0,64 m (Figura 1). Dessa forma, o

volume total disponível para o cultivo no substrato era de 110 litros. Dentro da coluna de vidro foram colocadas duas lâmpadas incandescentes de 60 W para fornecer luminosidade dentro do reator. A atmosfera de anaerobiose foi obtida preenchendo-se completamente os reatores com o substrato, seguida da colocação de uma tampa de vidro sobre o cultivo.

O inóculo de *Rubrivivax gelatinosus* preparado conforme descrito em 2.1 foi transferido em nível de 1% (v/v) para os reatores contendo o efluente previamente tratado, segundo os processos descritos no item 2.2. Os cultivos foram realizados durante 10 dias, em temperatura $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e sob luminosidade 2.000 ± 500 lux.

2.4. Obtenção da biomassa e determinação da produtividade

Após os 10 dias de cultivo, o conteúdo do reator A (processo A) foi centrifugado a $3.400 \times g$ durante 30 min a 5°C (INCIBRÁS SPIN VI), dando origem a um sobrenadante que foi descartado e a um resíduo que foi congelado e liofilizado a -40°C (LIOBRÁS L101). O cultivo do reator B (processo B) foi submetido a um sistema tangencial de microfiltração (Figura 1) com unidade de filtração de $0,75 \text{ m}^2$, porosidade de $0,2 \mu\text{m}$, vazão de $1,5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ e pressão de 1,5 bar (FRINGS). O permeado gerado nessa etapa foi descartado e o concentrado foi congelado e liofilizado a -40°C (LIOBRÁS L101). O material obtido da liofilização foi pulverizado manualmente em almofariz, obtendo-se a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* que foi pesada e armazenada a vácuo e ao abrigo da luz. O procedimento foi repetido por quatro

vezes.

Para determinar a produtividade de ambos os processos de obtenção da biomassa, utilizou-se a equação a seguir (Aiba, 1982):

$$\text{(Eq. 2) Produtividade} = \text{g biomassa L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$$

*2.5. Potencial despoluente de *Rubrivivax gelatinosus**

A avaliação da capacidade despoluente do micro-organismo no substrato foi realizada pela determinação da demanda química de oxigênio (DQO) no efluente cru, no sobrenadante proveniente da centrifugação (processo A) e no permeado obtido da microfiltração (processo B). A DQO foi determinada, segundo metodologia adaptado de Jirka e Carter (1975), que inclui a digestão química da amostra (reator de DQO Hach DRB200), seguida de análise colorimétrica com base na curva de calibração armazenada em espectrofotômetro apropriado (Hach DR2800). Todas as análises foram realizadas em duplicata e provenientes de quatro repetições.

2.6. Determinação da cor da biomassa

A medida dos atributos de cor (*L* - luminosidade, *C* - saturação e *h* - tom) das amostras de biomassa provenientes dos processos A e B foram obtidas pela média de três pulsos consecutivos da câmara ótica do espectrofotômetro HUNTER LAB MINISCAN XE PLUS, calibrado com padrões branco e preto, utilizando-se área de abertura de visão de uma polegada, iluminante D₆₅ e

ângulo de 10° para o observador (Farkas, 2003). Essa metodologia também foi realizada em um pigmento sintético comercial para efeito comparativo com as biomassas obtidas dos processos.

2.7. Análise estatística

Os resultados de produtividade e redução da DQO obtidos nos processos A e B, foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney utilizando-se o software GraphPad InStat, Versão 3.06. Para os atributos de cor *L*, *C* e *h*, os valores resultantes da comparação das biomassas obtidas dos processos A e B com um pigmento sintético comercial, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis no SAS (1998). Adotou-se um nível de significância de 5% (Vieira, 1999).

3. Resultado e Discussão

*3.1. Produtividade e capacidade despoluente de *Rubrivivax gelatinosus**

As médias e o desvio padrão das produtividades dos processos A e B, bem como as porcentagens de redução da DQO obtidas durante os 10 dias de cultivo estão apresentadas na Tabela 1. Os resultados revelaram que a produtividade ($p=0,0143$) e a porcentagem de redução da DQO ($p=0,0286$), obtidas com a utilização da centrifugação, foram estatisticamente menor em relação à utilização da microfiltração no processo de obtenção da biomassa.

Ambas as tecnologias utilizadas nesse trabalho podem ser empregadas para a separação das fases sólida e líquida de um determinado substrato (Judd e Jefferson, 2003; Woon e Leng, 2007). A centrifugação faz o uso da rotação de alta velocidade para gerar uma força centrífuga que promove a separação

dos sólidos suspensos e dos sólidos não dissolvidos pelas diferenças das densidades desses materiais contidos em um meio específico (Woon e Leng, 2007). A microfiltração tangencial representa uma tecnologia de filtração por membranas onde o efluente industrial é forçado a passar por uma membrana filtrante em direção paralela a esta pela aplicação de uma força motriz e a sua saída é separada em duas linhas distintas, por onde saem o permeado (parcela que passa pela membrana) e o concentrado (parcela que fica enriquecida com solutos ou sólidos retidos pela membrana) (Al-Malack e Anderson, 1997; Vidal, 2006). O permeado geralmente é representado por água e sólidos dissolvidos e os constituintes removidos no concentrado são sólidos solúveis totais, bactérias, cistos e oocistos de protozoários (Tchobanoglous et al., 2003).

Rubrivivax gelatinosus é uma bactéria em forma de bacilo levemente encurvado ou reto medindo entre 0,4-0,7 X 1,0-3,0 µm. Culturas mais velhas desse micro-organismo podem chegar a 15,0 µm (Holt et al., 2000). Os resultados desse trabalho indicaram que a utilização da microfiltração com porosidade inferior ao tamanho da bactéria (0,2 µm) possibilitou uma melhor recuperação da sua massa celular no substrato e, conseqüentemente, uma maior produtividade. Por outro lado, na centrifugação, essa produtividade foi menor, provavelmente por causa das perdas de biomassa presente no sobrenadante descartado, evidenciado pela sua coloração levemente avermelhada.

Al-Malack et al. (1998) utilizaram um sistema de microfiltração tangencial para tratamento de efluente. Os resultados demonstraram alta remoção de

sólidos suspensos, algas e algumas bactérias que, para os autores, foram influenciados pelo pequeno tamanho dos poros da membrana utilizada. As algas, por exemplo, podem apresentar tamanho maior que 10 μm e em trabalhos conduzidos por Miqdadi (1992), a utilização desse tipo de microfiltração para a remoção desses organismos, tem sido reportada (Al-Malack et al., 1998).

O processo de centrifugação pode apresentar, durante a sua operação, algumas vantagens e desvantagens em relação à microfiltração tangencial, segundo Woon e Leng (2007). Na microfiltração tangencial, podem ocorrer fenômenos de cisalhamento celular. Além disso, a aplicação da microfiltração em processos biológicos pode ser influenciada pelo entupimento da membrana, causada por *debris* celulares que, podem diminuir o fluxo do permeado e prejudicar a eficiência do processo (Frenander e Jonsson, 1996; Krstic et al., 2001). Apesar da centrifugação não gerar esses problemas, o custo operacional e a necessidade do fracionamento da amostra, o que eleva o tempo de resposta da análise, representam entraves para sua utilização (Vidal, 2006; Woon e Leng, 2007).

A menor redução da DQO no processo A aconteceu devido à menor recuperação da biomassa após a etapa de centrifugação, ou seja, uma pequena quantidade da massa celular de *Rubrivivax gelatinosus* (matéria orgânica) estava presente no sobrenadante destinado à análise da DQO. A presença desse material contribuiu para o aumento da matéria orgânica detectada no teste, interferindo no resultado final. Trabalhos que estudaram

efluentes industriais para o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes e que apresentaram excelentes reduções de DQO (acima de 70%) utilizaram a etapa de microfiltração para a separação da biomassa do substrato industrial (Lima et al. 2008; Ponsano et al. 2008). Por outro lado, Choorit et al. (2002), em um estudo com cultivos contendo culturas mistas de bactérias púrpuras não sulfurosas em efluente da indústria de látex de borracha, encontraram uma redução de 57% de DQO, semelhante ao encontrado nesse trabalho pela utilização da centrifugação para a separação da massa celular bacteriana do sobrenadante destinado para a avaliação da DQO.

3.2. Análise de cor da biomassa

Os parâmetros de definição da cor das biomassas obtidas nos processos A e B, e do produto pigmentante comercial composto por 10% de cantaxantina estão apresentados na Tabela 2.

O diagrama de cor do espaço *LCh* consiste em uma esfera com três coordenadas, *L*, *C* e *h*, conforme representado na Figura 2. O eixo vertical *L* (*Lightness*) indica a luminosidade da cor e varia de zero, no limite inferior (preto absoluto) a 100, no topo (branco absoluto). As coordenadas cilíndricas *h* (*hue*) e *C* (*Chroma*) indicam a cromaticidade da cor. O eixo circular *h* define o tom da cor e pode ser visualizado realizando-se um corte horizontal no diagrama do espaço *LCh*. Tomando-se como ponto inicial 0° o eixo horizontal *+a* (vermelho), à medida que se aumenta o ângulo de tom (*h*) no sentido anti-horário, têm-se as mudanças de tom, onde 90° corresponde a *+b* (amarelo), 180° corresponde

a $-a$ (verde) e 270° a $-b$ (azul), passando, dessa forma, por todas as cores do arco íris. O eixo C define a saturação ou a intensidade da cor e é representado pela distância radial do centro do espaço até o ponto da cor, variando de zero até 100 ou mais, conforme se caminha para as extremidades. Quanto mais os valores de C se aproximam das extremidades do diagrama, maior é a intensidade da cor (Farkas, 2003; Graphic quality consultancy, 2009; Hunterlab, 2009).

Os resultados indicaram semelhanças de luminosidade e tonalidade de cor entre as biomassas obtidas dos processos A e B e o produto comercial pigmentante ($p>0,05$). A saturação da cor da biomassa recuperada pelo sistema de membrana filtrante apresentou-se menor em relação ao produto pigmentante comercial ($p<0,05$). Isso se justifica pelo fato de que a microfiltração tangencial promove a retenção de alguns solutos e sólidos gordurosos, que provavelmente entraram na composição dessa biomassa e alteraram a intensidade da cor (Al-Malack e Anderson, 1997; Vidal, 2006).

O conhecimento desses atributos de cor em biomassas oriundas do metabolismo de micro-organismos fotossintetizantes apresenta grande importância pela carência de dados disponíveis na literatura. Os animais são incapazes de sintetizar oxicarotenoides, o que os torna totalmente dependentes do suprimento alimentar desses componentes a fim de atingir a pigmentação desejada pelo mercado consumidor (Henckel, 1992). Segundo Takahashi et al. (2008), pigmentos sintéticos são amplamente empregados como aditivos alimentares para conferir pigmentação em criações de salmonídeos, peixes

ornamentais e, recentemente, trutas. Dessa forma, processos utilizados para a obtenção de biomassas pigmentantes de bactérias fotossintetizantes representam possíveis alternativas biotecnológicas, uma vez que conferem às indústrias a possibilidade de viabilizar novos produtos gerados do próprio resíduo industrial.

4. Conclusão

O sistema de microfiltração tangencial utilizado favoreceu a maior obtenção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* e a maior remoção da carga poluente. Além disso, a biomassa obtida desse processo apresentou atributos de cor semelhante a um produto sintético comercial de característica pigmentante.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo Nº 07/54732-1) pelo auxílio financeiro prestado na realização desse projeto de pesquisa e à indústria Tilápia do Brasil S/A pelo fornecimento do efluente industrial.

Referências

Aiba, S., 1982. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. Adv. Biochem. Eng. 23, 85-156.

Al-Malack, M.H., 2003. Technical and economic aspects of cross-flow microfiltration. *Desalination*. 155, 89-94.

Al-Malack, M.H., Anderson, G.K., 1997. Use of cross-flow microfiltration in wastewater treatment. *Wat. Res.* 31, 3064-3072.

Al-Malack, M.H., Anderson, G.K., Almasi, A., 1998. Treatment of anoxic pond effluent using cross-flow microfiltration. *Wat. Res.* 32, 3738-3746.

Aspé, E., Martí, M.C., Roeckel, M., 1997. Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum. *Wat. Res.* 31, 2147-2160.

Azad, S.A., Vikineswary, S., Chong, V.C., Ramachandran, K.B., 2003. *Rhodovulum sulfidophilum* in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 13-18.

Azad, S.A., Vikineswary, S., Ramachandran, K.B., Chong, V.C., 2001. Growth and production of biomass of *Rhodovulum sulfidophilum* in sardine processing wastewater. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 264-268.

Casani, S., Rouhanyb, S., Knøchela, M., 2005. A discussion paper on challenges and limitations to water reuse and hygiene in the food industry. *Wat. Res.* 39, 1134-1146.

Choorit, W., Thanakoset, P., Thongpradistha, J., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N., 2002. Identification and cultivation of photosynthetic bacteria in wastewater from a concentrated latex processing factory. *Biotechnol. Lett.* 24, 1055-1058.

Elmaleh, S., Abdelmoumni, L., 1998. Experimental test to evaluate performance of an anaerobic reactor provided with an external membrane unit. *Wat. Sci. Technol.* 38, 385-392.

Farkas, C., 2003. Colorimetria e aparência na indústria: tecnocor, uma parceria de sucesso. Campinas: Tecnocor.

Getha, K., Vikineswary, S., Chong, V.C., 1998. Isolation and growth of the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain B1 in sago-starch-processing wastewater. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 505-511.

Graphic quality consultancy, 2009. Colour Management from image to print. [Citado em 2009 ago. 20] <http://www.colourphil.co.uk/lab_lch_colour_space.html>.

Hencken, H., 1992. Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Sci.* 71, 711-717.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., 2000. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, ninth ed. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia.

Hunterlab, 2001. Principios básicos de medida y percepción de color. [Citado em 2009 ago. 20] <<http://www.hunterlab.com/pdf/color-s.pdf>>.

Jeison, D., Kremer, B., Lier, J.B.V., 2008. Application of membrane enhanced biomass retention to the anaerobic treatment of acidified wastewater under extreme saline conditions. *Separ. Purif. Technol.* 64, 198-205.

Jirka, A.M., Carter, M.J., 1975. Micro semi-automated analysis of surface and wastewaters for chemical demand oxygen *Analyt. Chem.* 4 (8), 1937.

Judd, S., Jefferson, B., 2003. *Membranes for industrial wastewater recovery and re-use*. Elsevier Science, New York.

Kantachote, D., Torpee, S., Umsakul, K., 2005. The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electr. J. Biotechnol.* 8 (3), 314–323.

Krstic, D.M., Markov, S.L., Tekic, M.N., 2001. Membrane fouling during cross-flow microfiltration of *Polyporus squamosus* fermentation broth. *Biochem. Eng. J.* 9, 103-109.

Lima, L.K.F., Pinto, M.F., Ponsano, E.H.G., 2008. Produtividade e redução da carga poluente na obtenção de biomassa em resíduo de processamento de pescado. In: *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de*

Alimentos e XV Simpósio Latino Americano e do Caribe de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte. CD-ROM.

Liu, S.X., 2007. Food and agricultural utilization and treatment. First ed., Blackwell, Ames.

Frenander, U., Jonsson, A.S., 1996. Cell harvesting by cross-flow microfiltration using a shear-enhanced module. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 397-403.

Miqdadi, I.M.A., 1992. Removal of algae from facultative pond effluent. PhD Thesis, University of Newcastle upon Tyne, U.K.

Ponsano, E.H.G., 2000. Avaliação da capacidade pigmentante de biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* em frangos de corte. PhD Thesis, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, Brasil.

Ponsano, E.H.G., Lacava, P.M., Pinto, M.F., 2003. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46, 143–147.

Ponsano, E.H.G., Lacava, P.M., Pinto, M.F., 2002. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45, 445–449.

Ponsano, E.H.G., Paulino, C.Z., Pinto, M.F., 2008. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. *Bioresour. Technol.* 99, 3836-3842.

SAS Institute, 1998. SAS (Statistical Analysis System). User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Sasaki, K., Nagai, S., 1981. Single-Cell protein production by treatment of soybean wastes with *Rhodopseudomonas gelatinosa*. *J. Ferment. Technol.* 59, 471-477.

Souza, M.A., Vidotti, R.M., Oliveira Neto, A.L., 2008. Redução no consumo de efluente gerado em abatedouro de tilápia do nilo através da implantação de conceitos de produção mais limpa (P+L). *Bol. Inst. Pesc.* 34 (2), 289-296.

Takahashi, N.S., Tsukamoto, R.Y., Tabat, Y.A., Rigolino, M.G., 2008. Truta salmonada: processo produtivo em constante aprimoramento no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, jan/feb., 28-33.

Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, D., 2003. Wastewater engineering: treatment disposal and reuse. Fourth ed. Mc-Graw Hill.

Vidal, C.M.S., 2006. Avaliação da microfiltração tangencial com alternativa de

tratamento avançado de efluente gerado em sistema de tratamento de esgoto sanitário constituído de reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) seguido de tanque de aeração. PhD Thesis, Escola de Engenharia de São Carlo, USP, São Carlos, Brasil.

Vieira, S., 1999. Estatística experimental. second ed. Atlas, São Paulo.

Woon, W., Leung, F., 2007. Centrifugal separations in biotechnology. Academic Press, Hardbound.

Tabelas e figuras

Tabela 1 – Produtividade e porcentagem de redução da carga poluente de efluente industrial utilizado como substrato para o crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* em dois cultivos com e sem a utilização da etapa de centrifugação no processo de obtenção de biomassa¹

Cultivo de <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	Produtividade ² (g biomassa L ⁻¹ dia ⁻¹)	Redução da DQO ² (%)
Processo A	0,043±0,01	52,51±11,03
Processo B	0,079±0,01	81,25±3,03

¹ Valores médios e respectivos desvios padrão. ² Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os processos A e B.

Tabela 2 – Atributos de cor (*L*, luminosidade; *C*, saturação; *h*, tom) para a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* dos processos A e B e um produto pigmentante sintético comercial¹

Produto pigmentante	<i>L</i>		<i>C</i>		<i>h</i>	
	$\bar{X} \pm S$	<i>Md</i>	$\bar{X} \pm S$	<i>Md</i>	$\bar{X} \pm S$	<i>Md</i>
Produtividade A	21,07±1,6	20,8 ^a	13,62±3,4	14,4 ^{ab}	21,19±7,3	18,0 ^a
Produtividade B	21,84±5,7	24,9 ^a	11,36±0,4	11,5 ^a	27,39±10,4	27,3 ^a
Produto comercial	22,25±0,6	22,2 ^a	16,6±0,1	16,6 ^b	21,58±0,5	21,7 ^a

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). $\bar{X}$ – média; *S* – desvio padrão; *Md* – mediana.

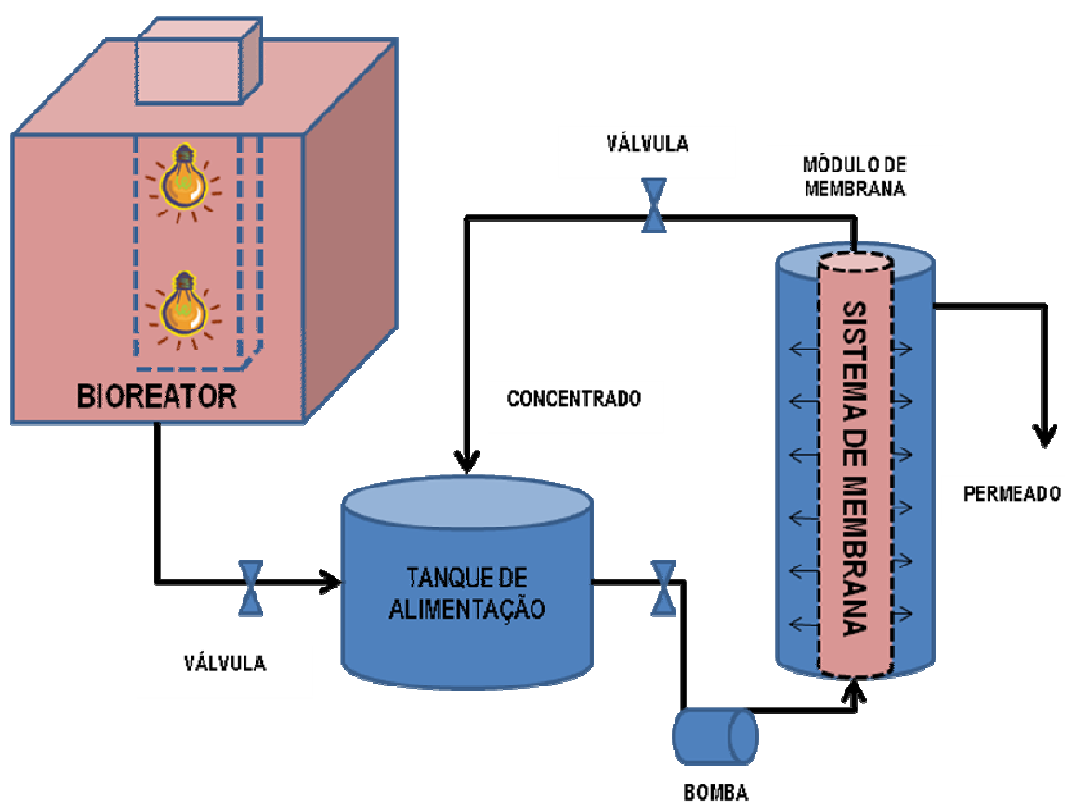


Figura 1 – Sistema de microfiltração tangencial utilizado para a obtenção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* cultivada em efluente industrial.

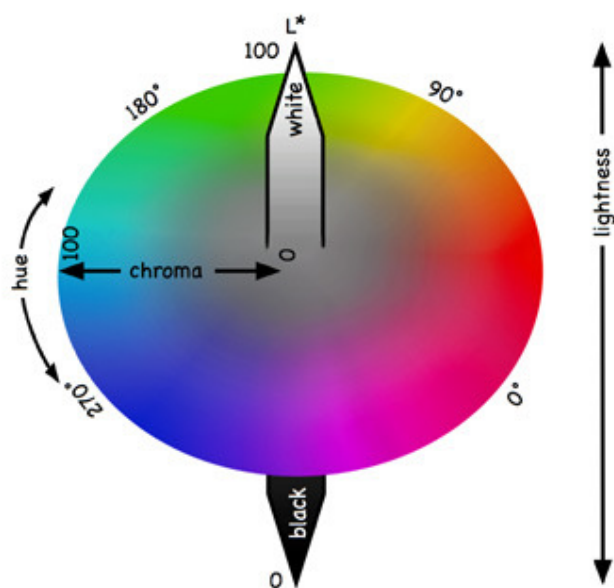


Figura 2 – Diagrama de cor do espaço LCh (Fonte: Graphic quality consultancy).

APÊNDICE



FOTO 1. Local e condição das coletas das amostras do efluente. A – tela de proteção sobre a calha de saída do resíduo da indústria de processamento de tilápia. B – detalhe do gradeamento na calha de saída do efluente para a separação dos sólidos grosseiros. C – procedimento de coleta do efluente diretamente na calha de saída. D – determinação da temperatura do efluente pelo termômetro de luz infravermelho.



FOTO 2. *Rubrivivax gelatinosus* reativado e conservado em meio de Pfennig semi-sólido como cultura de estoque.



FOTO 3. Preparo do inóculo de *Rubrivivax gelatinosus*. A – meio de Pfennig líquido contendo o micro-organismo sem crescimento. B – Inóculo de *Rubrivivax gelatinosus* em meio de Pfennig líquido.



FOTO 4. Provetas de vidro utilizadas para a determinação das curvas de crescimento contendo o efluente da indústria de processamento de tilápias inoculado com o micro-organismo *Rubrivivax gelatinosus*. A – Antes do cultivo. B – segundo dia do cultivo.

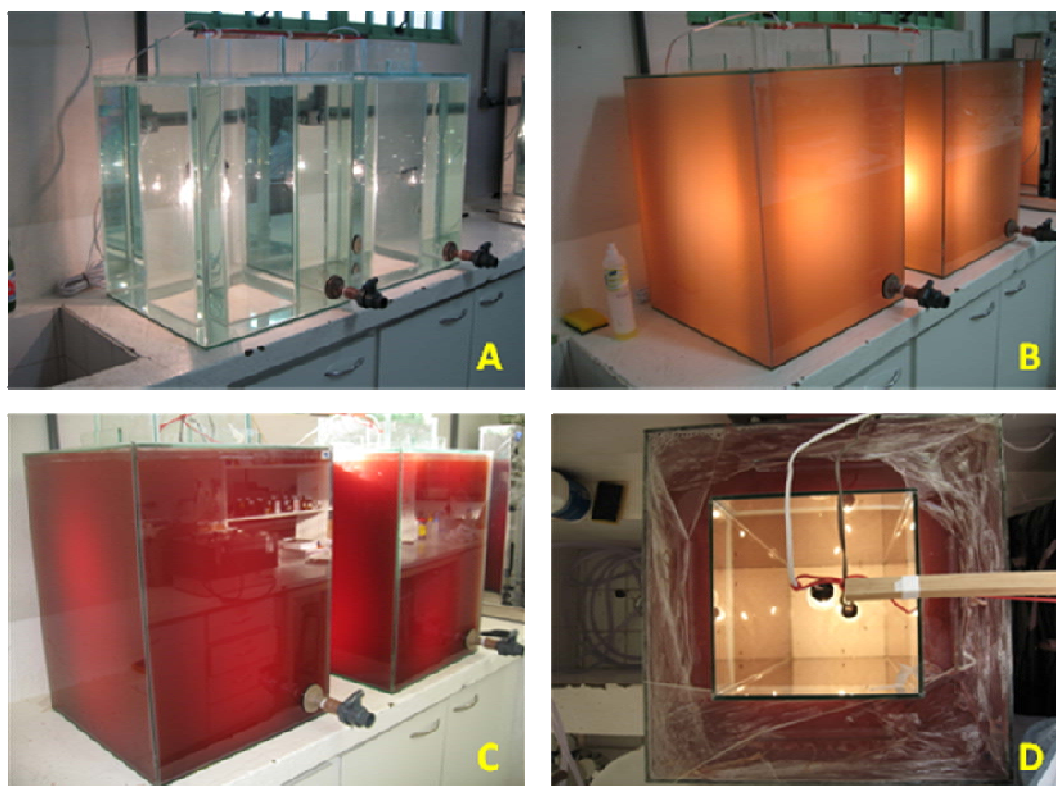


FOTO 5. Reatores utilizados para a determinação da produtividade do processo de obtenção de biomassa em escala semi-industrial. A – reatores sem efluente demonstrando a iluminação interna fornecida por lâmpadas incandescentes de 60 W. B – reatores contendo o efluente industrial inoculado com *Rubrivivax gelatinosus* no dia zero. C – reatores no décimo dia de cultivo, com o crescimento do micro-organismo evidenciado pela mudança da cor. D – visualização da parte superior dos reatores.

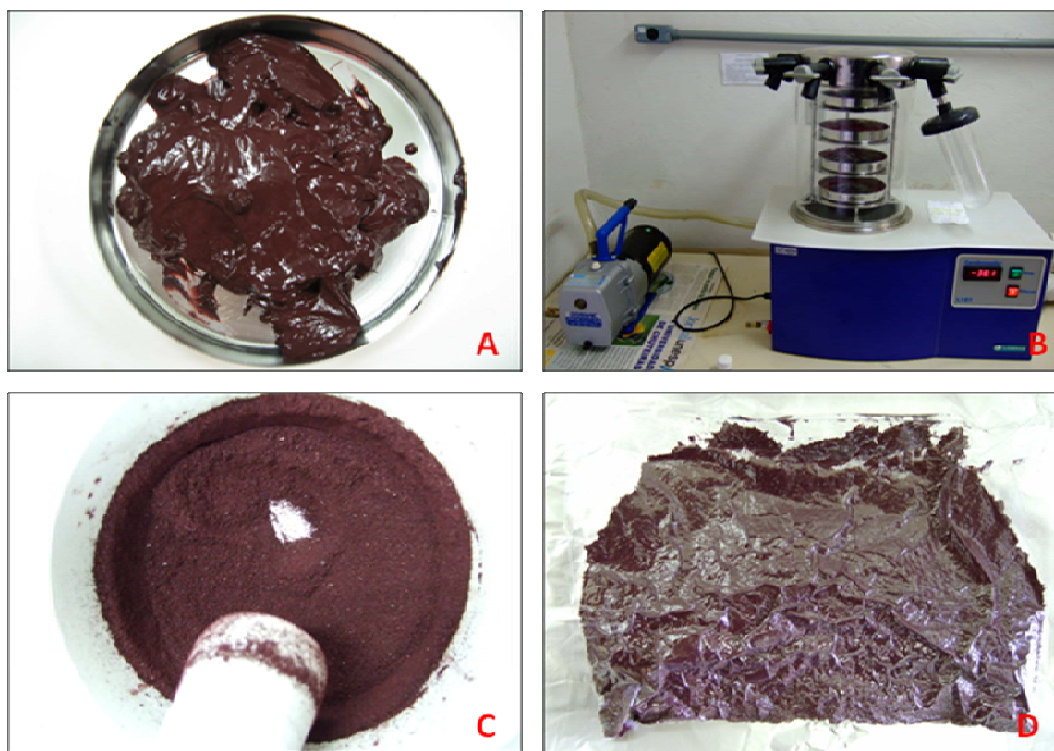


FOTO 6. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* proveniente do cultivo nos reatores. A – biomassa após a etapa de microfiltração e centrifugação. B – liofilização da biomassa. C – biomassa pulverizada manualmente em almofariz após a fase de liofilização. D – biomassa embalada a vácuo.

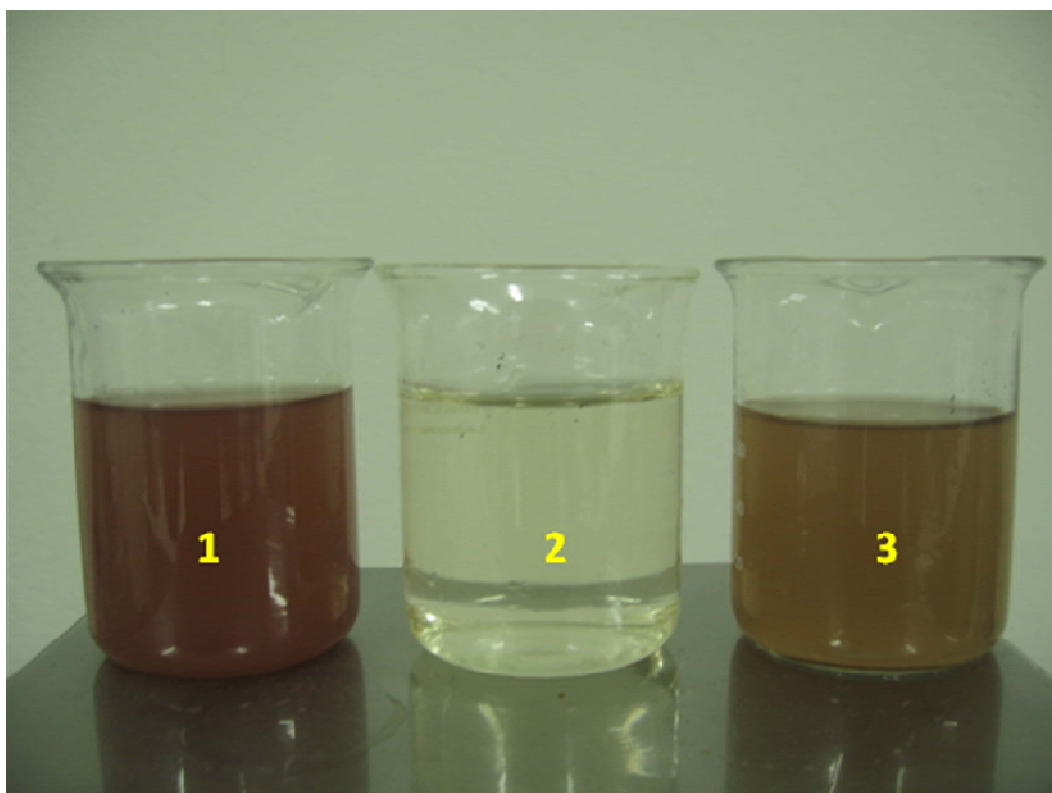


FOTO 7. Amostras do efluente em diferentes condições. 1 – efluente com a bactéria *Rubrivivax gelatinosus*. 2 – efluente descartado após a etapa de microfiltração. 3 – efluente descartado após etapa de centrifugação.

ANEXO – Normas para o envio de artigo à revista Bioresource Technology